

**Universidad ORT Uruguay  
Facultad de Ingeniería**

# **Expresión recombinante de BM86, Subolesina y P0, y evaluación de su inmunogenicidad en bovinos**

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

**Camila López 200304  
María Victoria Falco 200393**

**Tutor: Sebastián Rodríguez  
Co-tutor: Carlos Sanguinetti**

**2021**

# DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Nosotras, Camila López y María Victoria Falco, declaramos que el trabajo que se presenta en esta obra es de nuestra propia mano. Podemos asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizábamos el Proyecto de Grado;
- 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.



CAMILA LÓPEZ



VICTORIA FALCO

2 de marzo de 2021

# **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, queremos agradecer a nuestro tutor Sebastián Rodríguez y co-tutor Carlos Sanguinetti, por su dirección en la realización de este proyecto. Sus conocimientos fueron indispensables para los logros obtenidos.

A todas las personas del Laboratorio de Biotecnología ORT, por la amabilidad y disposición a ayudar frente a cualquier duda surgida.

Por último, un especial agradecimiento a nuestras familias y amigos, por su aliento y sostén incondicional durante la carrera y ejecución del presente proyecto. Son parte fundamental del éxito del mismo.

## RESUMEN

Las garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* representan un importante problema en la industria ganadera por su implicancia en la transmisión de la tristeza bovina. Dicha enfermedad, junto a las consecuencias asociadas al parasitismo de los ácaros, genera pérdidas de hasta US\$45 millones anuales en el Uruguay. Por tal motivo, el control de esta garrapata es de suma importancia tanto para los productores involucrados, como para el país.

Para la prevención de esta enfermedad se distinguen dos opciones, la erradicación de la garrapata, o la inmunización de los vacunos a temprana edad. Para el último escenario, en Uruguay se administran dos vacunas diferentes, sin embargo, las mismas evitan la aparición de síntomas en caso de infección, pero no eliminan los problemas del parasitismo de estos ácaros en sí.

Existen dos vacunas comerciales diseñadas para la erradicación de las garrapatas mencionadas, las cuales se componen de un antígeno denominado BM86 presente naturalmente en estos ácaros. No obstante, las mismas no son efectivas en nuestro país por el alto grado de variabilidad entre las secuencias de este antígeno en las distintas regiones geográficas.

Puesto esto, el objetivo de este trabajo fue lograr expresar de forma recombinante tres antígenos candidatos para la formulación de una vacuna contra las garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* nativas. Con este fin se produjeron las proteínas BM86, Subolesina y Subolesina-P0 en dos escalas distintas de producción, y se analizó su inmunogenicidad en vacunos.

## **PALABRAS CLAVE**

Garrapata, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, tristeza bovina, vacuna, antígeno, proteínas recombinantes, BM86, Subolesina, P0, inducción, biorreactor, anticuerpos, respuesta humoral.

# ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b>   | <b>9</b>  |
| <b>1.1. <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i></b>   | <b>9</b>  |
| 1.1.1. Generalidades   | 9         |
| 1.1.2. Morfología general  | 9         |
| 1.1.3. Ciclo de vida y generaciones  | 9         |
| <b>1.2. Importancia económica de las garrapatas <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> en el Uruguay</b> | <b>11</b> |
| 1.2.1 Tristeza parasitaria   | 11        |
| <b>1.3. Estrategias de control o erradicación de las garrapatas</b>  | <b>12</b> |
| 1.3.1. Acaricidas  | 12        |
| 1.3.2. Reguladores biológicos  | 13        |
| 1.3.3. Vacunas   | 13        |
| 1.3.3.1 Proteínas recombinantes  | 14        |
| 1.3.3.1.1. Proteínas quiméricas  | 14        |
| <b>1.4. Vacunas contra <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i></b>  | <b>15</b> |
| 1.4.1. Antígenos comúnmente utilizados en vacunas anti garrapatas <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> | 16        |
| 1.4.1.1. BM86  | 16        |
| 1.4.1.2. Subolesina  | 16        |
| 1.4.1.3. P0  | 17        |
| 1.4.2. Antecedentes de vacunas contra <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>                             | 17        |
| 1.4.3. Problemática de las vacunas existentes  | 17        |
| <b>1.5. El proyecto</b>  | <b>18</b> |
| <b>2. OBJETIVOS</b>  | <b>19</b> |
| <b>2.1. Objetivo general</b>   | <b>19</b> |
| <b>2.2. Objetivos específicos</b>  | <b>19</b> |
| <b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>   | <b>20</b> |
| <b>3.1. Secuencias y plásmidos utilizados</b>  | <b>20</b> |
| <b>3.2. Verificación de los insertos clonados</b>  | <b>20</b> |
| <b>3.3. Generación de Bancos Maestro y de Trabajo</b>  | <b>21</b> |
| <b>3.4. Expresión de antígenos a escala matraz</b>   | <b>22</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3.5. Expresión de antígenos a escala fermentador</b>   | <b>22</b> |
| <b>3.6. Disrupción celular</b>  | <b>23</b> |
| <b>3.7. Preparación y análisis de muestras</b>  | <b>23</b> |
| <b>3.8. Lavado y solubilización de los cuerpos de inclusión</b>   | <b>24</b> |
| <b>3.9. Purificación de los antígenos mediante IMAC</b>   | <b>24</b> |
| <b>3.10. Análisis de sueros de los vacunos inmunizados con los antígenos de interés</b>                                 | <b>25</b> |
| 3.10.1. Obtención de los sueros   | 25        |
| 3.10.2. Western Blot para la detección de anticuerpos   | 25        |
| 3.10.3. ELISA para la detección de anticuerpos  | 26        |
| <b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>  | <b>27</b> |
| <b>4.1. Verificación de los insertos clonados</b>   | <b>27</b> |
| <b>4.2. Generación de Bancos Maestros y de Trabajo de las cepas bacterianas para su uso en experimentos posteriores</b> | <b>28</b> |
| <b>4.3. Expresión de los antígenos a escala matraz</b>  | <b>29</b> |
| 4.3.1. Curvas de crecimiento a escala matraz  | 29        |
| 4.3.2. Inducciones en la cepa <i>E.coli</i> BL21 DE3  | 31        |
| 4.3.3. Inducciones en la cepa <i>E.coli</i> Rosetta-gami DE3  | 33        |
| <b>4.4. Expresión de los antígenos a escala fermentador</b>   | <b>34</b> |
| <b>4.5. Purificación de los antígenos</b>   | <b>37</b> |
| <b>4.6 Análisis de sueros provenientes de bovinos inmunizados con los antígenos de interés</b>                          | <b>42</b> |
| 4.6.1. Análisis de sueros mediante Western Blot   | 42        |
| 4.6.2. Análisis de sueros mediante ELISA  | 45        |
| <b>5. CONCLUSIONES</b>  | <b>49</b> |
| <b>6. PERSPECTIVAS</b>  | <b>50</b> |
| <b>7. REFERENCIAS</b>   | <b>51</b> |
| <b>8. ANEXOS</b>  | <b>57</b> |
| <b>8.1. Anexo 1: Secuencias codificantes de los antígenos utilizados</b>  | <b>57</b> |
| 8.1.1. Subolesina   | 57        |
| 8.1.2 Bm86  | 57        |
| 8.1.3 Subolesina P0   | 57        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>8.2 Anexo 2: Vector pET-28a</b>   | <b>58</b> |
| <b>8.3. Anexo 3: Protocolo para la generación de bacterias electrocompetentes</b>        | <b>58</b> |
| <b>8.4 Anexo 4: Medio SOC</b>  | <b>59</b> |
| <b>8.5 Anexo 5: Medio Luria-Bertani (LB)-Agar</b>  | <b>59</b> |
| <b>8.6 Anexo 6: Medio LB</b>   | <b>60</b> |
| <b>8.7 Anexo 7: Medio ZYM-5052</b>   | <b>60</b> |
| <b>8.8 Anexo 8: Tampón fosfato salino (PBS) 1X</b>                                       | <b>60</b> |
| <b>8.9 Anexo 9: Digestiones de los plásmidos</b>   | <b>60</b> |
| <b>8.10 Anexo 10: Expresiones en matraz de los antígenos con diferentes condiciones.</b> | <b>61</b> |

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

### 1.1.1. Generalidades

Las garrapatas, como se conocen popularmente a los Ixodoideos, son una superfamilia de ácaros. Específicamente, la especie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es la garrapata que infecta al ganado bovino de prácticamente todas las regiones ganaderas del mundo, produciendo pérdidas millonarias para los productores (1, 2). Se le denominan ectoparásitos ya que se alimentan de la sangre de los organismos que parasitan desde el exterior de los mismos, y debido a que les es imposible nutrirse a partir de la sangre de otros animales, solo viven y se reproducen en donde habitan bovinos (1, 3).

### 1.1.2. Morfología general

Estas garrapatas se caracterizan por presentar un cuerpo aplanado de entre 1 a 10 mm, llegando a alcanzar tamaños más grandes cuando ingieren sangre. Su cabeza o también denominada capítulo, se encuentra formada por una sustancia quitinosa que le permite proteger su sistema nervioso. En ella se encuentran dos órganos denominados quelíceros, que le permiten rasgar la piel del hospedero para luego introducir una estructura dentada denominada hipostoma que le permite la succión. Al lado del mismo se encuentran dos apéndices que actúan como soporte permitiéndole a la garrapata adherirse al animal que parasita (4, 5).

Su cuerpo está cubierto por un escudo que abarca toda la superficie dorsal en los machos (Figura 1) y solo una parte en las hembras (Figura 2), para permitirles llenarse con hasta 2 cm<sup>3</sup> de sangre. Dichas garrapatas poseen ocho patas, cuatro de cada lado de su cuerpo, a excepción de las larvas que solo presentan seis (4, 5).



Figura 1. Macho *B. microplus* (5)



Figura 2. Hembra *B. microplus* (5)

### 1.1.3. Ciclo de vida y generaciones

La mayor parte de su vida concurre en el suelo, donde se encuentran en forma de huevos o larvas,

en un periodo que puede durar entre 100 y 300 días. Luego las mismas se adhieren a la vaca y permanecen allí durante 21 días aproximadamente, donde se alimentan, desarrollan y copulan. Pasado ese tiempo, las garrapatas llenas de sangre y los huevos caen al suelo, donde ponen los mismos y luego mueren, en una fase extraparasitaria que puede durar entre 2 a 10 meses (3, 6) (Figura 3).

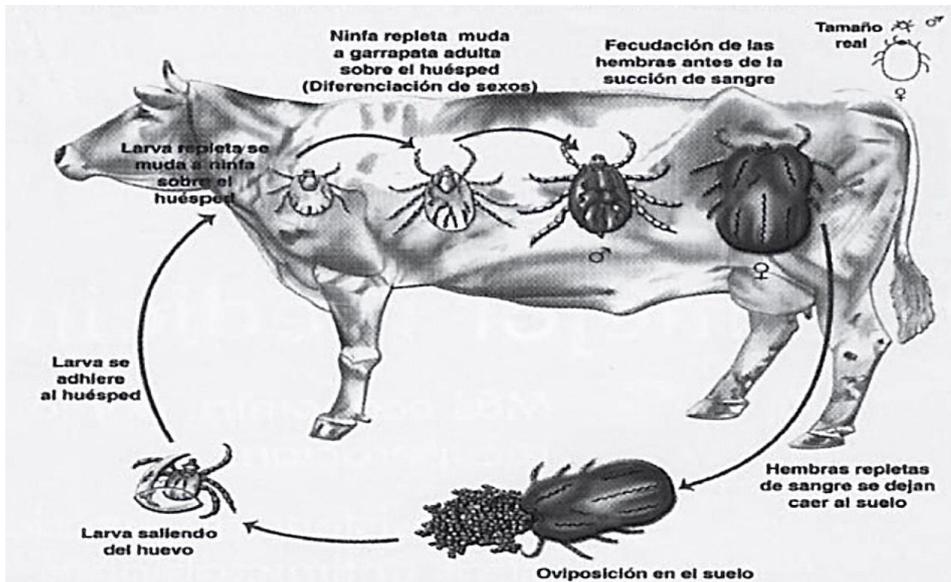


Figura 3. Ciclo biológico de la garrapata (4).

En promedio, existen tres generaciones de garrapatas por año en nuestro país, las cuales se encuentran representadas en la figura 4. La primera surge de agosto a noviembre, la segunda desde diciembre hasta febrero, y la tercera desde marzo hasta mayo. Durante los meses comprendidos entre diciembre y abril, en Uruguay se da el periodo más favorable para el desarrollo de estos parásitos, ya que las condiciones ideales para su crecimiento son temperaturas de 27°C y una humedad relativa de 90%. Cuando se dan estas circunstancias, una generación se puede desarrollar en solamente dos meses. Las otras dos generaciones anuales, demoran más tiempo en completar su desarrollo debido a que las condiciones estacionales no son las ideales. Gracias a esto, la tercera generación, es la que presenta un mayor número de garrapatas (2, 6).

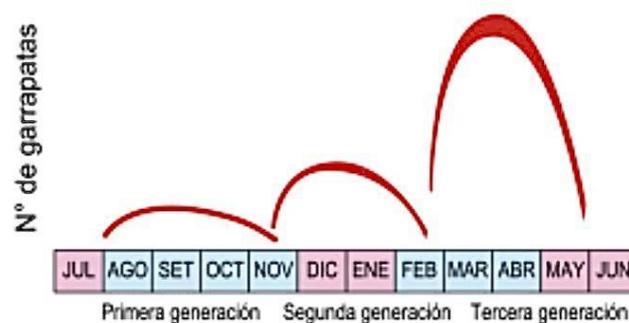


Figura 4. Generaciones de garrapatas (6)

## 1.2. Importancia económica de las garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en el Uruguay

En Uruguay existen casi 4 vacunos por habitante, y esta relación de cantidad de cabezas de ganado por persona, representa una de las más altas a nivel mundial. En nuestro país se encuentran más de 38 mil establecimientos ganaderos repartidos en aproximadamente 16,4 millones de hectáreas de pastoreo, representando más del 90% de la superficie del territorio uruguayo (7, 8). A su vez, el sector agroindustrial tiene una participación de aproximadamente un 80% en las exportaciones de bienes del país, quedando demostrado así, la importancia que tiene la ganadería en el Uruguay (8).

Cada año, la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* genera grandes pérdidas económicas tanto en Uruguay, como en el mundo. Dichos daños económicos están asociados a distintos aspectos; por un lado, se encuentran los daños directos ocasionados por las fijaciones de las garrapatas, como la inyección de toxinas, y la morbilidad y mortalidad ocasionadas por los patógenos que ellas transmiten. Por otra parte, se destacan los daños en los productos bovinos, como la obtención de insecticidas en la carne y en la leche y la reducción de la producción de esta última. Esto, sumado a los gastos relacionados a los productos químicos necesarios para combatir esta garrapata, genera pérdidas económicas superiores a los U\$S 45 millones anuales en nuestro país (9, 10).

### 1.2.1 Tristeza parasitaria

Casi la tercera parte de las pérdidas económicas son consecuencia de la enfermedad denominada Tristeza bovina o Tristeza parasitaria la cual es transmitida a través de las garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. La misma es causada por parásitos microscópicos denominados hemoparásitos, ya que se encuentran dentro de los glóbulos rojos de los bovinos. En nuestro país, existen tres hemoparásitos diferentes que causan esta enfermedad, denominados *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale*. Los dos primeros generan babesiosis y son exclusivamente transmitidos por las garrapatas, y el último genera anaplasmosis, pudiendo ser transmitido por estos ectoparásitos, como también por tábanos y por el mal uso de agujas (6, 11).

Esta enfermedad puede ser transmitida por las garrapatas desde el primer momento que suben a los vacunos y comienzan a parasitar en forma de larvas. La misma es más frecuente durante el otoño, debido a la mayor presencia de parásitos en los campos, pero aun así, durante todo el año existe la posibilidad de que el ganado se infecte. Los tres tipos de hemoparásitos afectan generalmente a los animales adultos, ya que en los terneros la glándula denominada Timo, la cual desaparece con el tiempo, les confiere una fuerte inmunidad. Si los mismos se infectan antes de los ocho o nueve meses, adquieren inmunidad de por vida frente a los hemoparásitos con los cuales estuvieron infectados (6, 11).

Tanto la babesiosis como la anaplasmosis comparten síntomas similares, como decaimiento, fiebre, mucosas amarillas (ictericia), anemia, y en casos graves, la muerte (6, 11). Para realizar un correcto tratamiento primero se debe identificar si el animal enfermo presenta un caso de babesiosis o anaplasmosis. Si se trata de la primera situación, se le puede administrar al vacuno Imidocarb, el cual ejerce un efecto profiláctico contra dicha enfermedad, y en el segundo caso, en general se le administra al animal el antibiótico tetraciclina (6, 11, 12, 13).

Para la prevención de la Tristeza Bovina, en nuestro país existen dos opciones: lograr la erradicación de la garrapata, o vacunar a los terneros antes de los 9 meses de edad. Para esto último existen dos vacunas disponibles, ambas conteniendo cepas atenuadas de *Babesia* y *Anaplasma centrale*. Las dos son eficientes y le confieren al animal inmunidad de por vida contra estos patógenos (6, 11).

Dicho esto, se debe mencionar que las vacunas descritas, están diseñadas para evitar que los vacunos presenten síntomas de Tristeza Bovina cuando se infectan con los microorganismos mencionados. La misma no impide que las garrapatas se sigan desarrollando y se alimenten de la sangre de las vacas. Es decir, las mismas no logran el control ni la erradicación de la garrapata en el predio donde se encuentran los bovinos. Esto disminuye las pérdidas generadas por la enfermedad, pero no evita el resto de las mencionadas anteriormente, como las relacionadas con el parasitismo de los ácaros, con los productos utilizados para el control de los mismos, ni las pérdidas por daños en los productos bovinos.

Considerando los motivos mencionados, es de suma importancia tener planteada una estrategia para atacar la presencia de las garrapatas, y así, disminuir lo más posible las pérdidas económicas que se puedan dar por estos parásitos. Debido a tal importancia, el control de esta garrapata está establecido por la Ley N° 18.268. Dicha ley trata temas como la estrategia de lucha que se debe aplicar, criterios para categorizar áreas que presenten riesgos epidemiológicos, y como debe ser el trato de los residuos biológicos provenientes del tránsito de animales infestados con garrapatas (2, 3, 14).

### **1.3. Estrategias de control o erradicación de las garrapatas**

Hoy en día, existen diferentes estrategias implementadas para el control de las garrapatas en establecimientos ganaderos. Se debe estipular desde un principio si lo que se quiere es eliminar por completo el parásito (Plan de erradicación) o simplemente controlarlo para reducir su presencia a un nivel en el que no cause pérdidas económicas significativas (Plan de control). El aspecto que difiere entre un plan y el otro es simplemente la frecuencia en que se aplicará el tratamiento elegido para el control de las garrapatas. En cuanto a los aspectos económicos, el control de erradicación presenta beneficios ampliamente superiores en relación al plan de control, sin embargo, la aplicación del primero requiere de medidas más complejas, como personal disponible, buenas instalaciones y capacidad de juntar todo el ganado manteniéndolo libre (presencia de alambrados, linderos y lugar para tránsito de animales) (2, 3).

A continuación, se detallan distintas estrategias que se pueden aplicar para el control de las garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en un establecimiento ganadero infectado.

#### **1.3.1. Acaricidas**

Los acaricidas, como la ivermectina, fipronil y amitraz, constituyen la principal forma de control utilizada actualmente en nuestro país debido a su relativa sencillez al aplicarlos y su duradero y rápido efecto, además de ser una de las opciones más económicas para los productores (3, 6). La mayoría de los acaricidas utilizados interactúan con los quimiorreceptores de los órganos nerviosos de las garrapatas, desencadenando parálisis y luego la muerte de las mismas (6).

A pesar de las ventajas mencionadas, estos químicos presentan algunos inconvenientes que hacen que los mismos no sean ideales. Dentro de ellos se puede destacar la contaminación ambiental que generan. Por dicho motivo, cuando se utiliza este tipo de producto, solo se aplica el mismo a las vacas a tratar, y no se distribuye en el predio donde estas están ubicadas. Esto a su vez genera, que el tratamiento esté siendo aplicado a una pequeña cantidad de garrapatas de la generación, ya que la mayoría se encuentra en el suelo en forma de huevos o larvas, como fue mencionado anteriormente (3, 4).

A su vez, otra desventaja a destacar, es la generación de resistencia a estos químicos por parte de los ectoparásitos. Se ha demostrado que las garrapatas tienen la capacidad de adaptarse a los

acaricidas utilizados en un período de pocos años, generando así, que las mismas sean resistentes a los productos, y la estrategia de control ya no sea eficaz (3). Debido a esto, muchas veces se utiliza la estrategia denominada “Tratamiento generacional”, la cual consiste en tratar cada generación de garrapata con un acaricida distinto y así lograr que la aparición de resistencia disminuya o se entelezca en el tiempo (6).

Por otro lado, el control químico tiene como desventaja la aparición de residuos de los mismos en los productos de origen vacuno, como lo son la carne y la leche, generando pérdidas económicas debido a la contaminación (4).

### 1.3.2. Reguladores biológicos

Dentro de esta categoría, se encuentran especies de insectos, hongos, bacterias y virus que actúan como depredadores de las garrapatas, atacando en las distintas etapas de su ciclo de vida, y en consecuencia disminuyendo la cantidad de las mismas (4).

La utilización de hongos entomopatógenos, como las especies *M.anisopliae*, *B. bassiana* y *Verticillium lecanii*, es una de las alternativas más utilizadas dentro de este tipo de control, ya que no presenta riesgo de contaminación ambiental y no genera residuos en los productos bovinos. Sin embargo, para la utilización de dichos hongos, se debe tener en cuenta que no todas las cepas de garrapatas tienen la misma susceptibilidad frente a los mismos. A su vez, la eficiencia que se obtiene dentro de un laboratorio cuando se testean los hongos, no es la misma que cuando el proceso ocurre en la naturaleza ya que las distintas condiciones ambientales afectan el comportamiento de los mismos (3, 4).

### 1.3.3. Vacunas

Las vacunas son productos biológicos diseñados para generar inmunidad contra una enfermedad, estimulando una respuesta humoral y memoria inmunitaria (15).

El componente activo de las vacunas se denomina “antígeno”, y es el responsable de generar una respuesta inmune en el organismo que recibe la misma. Estos antígenos pueden ser bacterias, virus, o componentes de ellos como proteínas y azúcares. Además del mismo, en muchos casos, es necesaria la utilización de adyuvantes para aumentar la respuesta inmune que se genera frente al antígeno utilizado, como emulsiones de agua y aceite. A su vez, para lograr la estabilidad de la vacuna a lo largo del tiempo, se utilizan estabilizadores como azúcar o gelatina. De esta forma se evitan cambios en el componente antigénico de las mismas. Por último, para inhibir la aparición de bacterias u hongos indeseados en la composición de las vacunas, se utilizan conservantes como el timerosal, el cual es ampliamente utilizado para este propósito (15, 16).

Existen diferentes tipos de vacunas, las cuales se diferencian en su composición antigénica. Dentro de ellas se destacan cuatro categorías por su amplia utilización y se detallan a continuación:

- Las **vacunas vivas atenuadas** contienen el organismo causante de la enfermedad debilitado, es decir, el mismo no tiene patogenicidad. Se crea una respuesta inmunitaria fuerte y de larga duración. Con solo una o dos dosis en algunos casos, es suficiente para una inmunidad de por vida (17).
- Las **vacunas inactivadas** contienen el microorganismo inactivado, es decir, sin vida. La respuesta que se genera no es tan fuerte como en el caso anterior, y son necesarias varias

dosis para mantener la inmunidad (17).

- Las **vacunas con toxoides** están compuestas por toxinas liberadas por los microorganismos causantes de determinadas enfermedades. Por lo tanto, producen inmunidad contra la toxina, en lugar de todo el germen (17).
- Las **vacunas de subunidades recombinantes, polisacáridos y/o combinadas** están compuesta por unidades específicas de los organismos que causan las enfermedades, como proteínas, o azúcares. Las mismas generan respuestas inmunitarias dirigidas a dichas moléculas. La limitación de las mismas es que requieren de refuerzos para una protección continua de las enfermedades (17, 18, 19).

### 1.3.3.1 Proteínas recombinantes

Para la producción de vacunas con proteínas, se utiliza la tecnología de ADN recombinante. De esta manera se obtienen una gran cantidad de proteínas recombinantes en organismos que naturalmente no las producen, gracias a la inserción del ADN foráneo correspondiente (18, 19).

Las bacterias son uno de los microorganismos más utilizados para la expresión de estas proteínas. Específicamente, *E.coli* es ampliamente utilizada ya que es una bacteria sencilla de cultivar y de modificar genéticamente, además de ser un sistema de expresión rápido, económico y de alto rendimiento. A pesar de estas virtudes, tiene como desventaja su incapacidad para realizar modificaciones postraduccionales debido a que se clasifica como un organismo procarionta (18, 19).

Por otra parte, se debe mencionar que cuando una proteína es sobreexpresada en estas bacterias, en muchas ocasiones las moléculas se agregan entre ellas formando lo que se denominan cuerpos de inclusión. Este fenómeno, a su vez, está influenciado por las condiciones de inducción del cultivo. Cuando esto ocurre, en la mayoría de los casos se procede con la solubilización de los mismos y el posterior plegamiento de las proteínas, para la obtención de las mismas solubles y con su correcta forma. De esta manera, al utilizar estas proteínas como antígenos para la formulación de una vacuna, se logra la obtención de anticuerpos específicos para epítopes de las mismas en su forma nativa.

Sin embargo, existe otra opción no utilizada normalmente por la falta de evidencias científicas, la cual consiste en la formulación de vacunas directamente con los cuerpos de inclusión. Debido a la presencia de proteínas con su conformación no nativa en los mismos, hace que su uso en vacunas destinadas a generar anticuerpos de alta afinidad no sea efectivo. A pesar de esto, los cuerpos de inclusión exhiben propiedades únicas, como estabilidad mecánica y térmica debido a su naturaleza intrínseca de partículas, biocompatibilidad, alto contenido antigénico, baja toxicidad y relativa resistencia a las proteasas. A su vez, se ha demostrado que los cuerpos de inclusión tienen la capacidad para inducir respuestas celulares antígeno-específicas CD8 + y CD4 + T. Dicho esto, la formulación de vacunas con los mismos parece prometedora, ya que se evitan de esta manera los pasos de purificación de las proteínas recombinantes obtenidas (20).

#### 1.3.3.1.1. Proteínas quiméricas

Las proteínas quiméricas consisten en polipéptidos formados por dos o más proteínas naturalmente diferentes. Las mismas pueden evolucionar de forma natural cuando una translocación cromosómica, duplicación de genes o transposición crea una nueva secuencia codificante que contiene partes o segmentos completos de dos genes diferentes. Naturalmente se encuentran con frecuencia en las células tumorales donde pueden funcionar como proteínas oncogénicas. A su vez, también se pueden generar proteínas sintéticas quiméricas, o de fusión, usando la tecnología de ADN recombinante.

Dichas proteínas de fusión tienen varias aplicaciones comerciales potenciales, incluido su desarrollo como proteínas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades, su uso como proteínas de diagnóstico, en la purificación de proteínas para facilitar un proceso posterior, entre otras (21).

La mayoría de las proteínas de fusión contienen conectores peptídicos o también llamados "linkers", que acoplan dos o más dominios para formar las proteínas de fusión. Estos enlazadores pueden ser flexibles o rígidos, o pueden diseñarse para que se puedan escindir por proteasas (21, 22).

Gracias al conocimiento en estructuras de proteínas y su plegamiento, se pueden diseñar y construir proteínas quiméricas que compartan rasgos de dos o más proteínas para que posean nuevas actividades biológicas. Esto es muy útil para el caso de las vacunas con proteínas recombinantes, donde los antígenos que se desean utilizar son proteínas demasiado pequeñas que no llegan a generar inmunidad. En estas situaciones, se pueden fusionar las mismas a proteínas de mayor tamaño para que la proteína quimérica final sea capaz de activar el sistema inmune del huésped conteniendo epítopes inmunogénicos del péptido pequeño (21, 22).

#### **1.4. Vacunas contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

Cuando se desea realizar una vacuna contra algún tipo de garrapata, se debe tener en cuenta que estos ácaros, al no ser un microorganismo, no pueden ser incluidos en la formulación de una vacuna de tipo inactivada, o viva atenuada. Por lo tanto, una vacuna basada en proteínas recombinantes, se presenta como una excelente opción.

Para que las vacunas contra estas garrapatas sean exitosas, se deben detectar moléculas que sean de vital importancia para los ectoparásitos. Una vez identificadas, es necesario clonaras y expresarlas para la formulación de una vacuna, la cual luego de inyectada en los bovinos generará anticuerpos que bloqueen dichas moléculas, cuando las garrapatas se alimenten de la sangre de los mismos (3, 4).

Esta es una opción prometedora frente al uso de acaricidas, ya que presenta ventajas como la acción específica y sostenida en el tiempo, un menor gasto económico en comparación al manejo químico, y a su vez no permite la aparición de residuos en los productos vacunos, la aparición de resistencia en las garrapatas, ni contaminación ambiental (4).

Este tipo de tratamiento tiene como aspecto negativo el hecho de que la garrapata debe picar a la vaca e ingerir su sangre, para que la vacuna tenga el efecto deseado. Sin embargo, dicha desventaja no parece de suma importancia cuando se compara con el hecho de que esta opción no genera resistencia en los parásitos, ni una contaminación ambiental significativa.

Por estos motivos, el uso de vacunas para combatir las garrapatas y las enfermedades relacionadas a ellas, es una opción que está cobrando fuerza en los últimos años. Las mismas pueden estar dirigidas directamente al control de la garrapata, es decir, compuestas con antígenos que pertenecen a las mismas, o pueden estar diseñadas para combatir específicamente las enfermedades asociadas, utilizando antígenos que se encuentren en los patógenos responsables. Cabe destacar que si se diseña una vacuna que se dirija a la eliminación de las garrapatas, consecuentemente se frena la transmisión de las enfermedades que ellas presentan, y a su vez, existen algunos antígenos de estos ectoparásitos que no sólo desencadenan el control de la garrapata, sino también que están relacionados específicamente con la infección de patógenos y su transmisión (23).

#### **1.4.1. Antígenos comúnmente utilizados en vacunas anti garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

En los últimos 80 años, se han estudiado diferentes antígenos provenientes de macerados completos de garrapatas, extractos de sus glándulas salivales, su intestino y/o sus cutículas (24). Los mismos se pueden clasificar en dos categorías; en primer lugar existen los denominados “antígenos expuestos”, los cuales están implicados en la resistencia que se adquiere de forma natural frente a la infestación de las garrapatas debido a su presencia en los procesos habituales como son la fijación de la garrapata y la alimentación. Por otro lado, se encuentran los “antígenos ocultos”, referenciando de esta manera a los que se encuentran justamente ocultos de forma natural al sistema inmune del ganado (4).

La ventaja de estos últimos frente a los primeros, radica en que, gracias a la falta de contacto entre los mismos y el sistema inmunológico del ganado, las garrapatas no desarrollan una estrategia para evadir la respuesta inmune del animal, y no evolucionan junto a ellas (4).

Para que los antígenos seleccionados sean exitosos en el control de la garrapata, deben cumplir con ciertas características como, que los anticuerpos generados en el hospedador sean capaces de acceder al antígeno en la garrapata en cantidades suficientes, que el complejo antígeno-anticuerpo formado inhiba la acción de la proteína e induzca cambios biológicos en el parásito que afecte su funcionamiento, y en lo posible, que la proteína tenga epítopes conservados en las distintas cepas de garrapatas, para que la vacuna proteja contra todas ellas (23).

##### **1.4.1.1. BM86**

BM86 fue la primera glicoproteína identificada con propiedades inmunogénicas contra la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, y fue aislada del epitelio intestinal de una cepa australiana de este parásito. Es una proteína de membrana de 86 kDa, que pudo ser aislada de estas garrapatas en todas sus etapas de desarrollo (5, 24, 25).

Se sabe que la misma está involucrada en procesos digestivos, ya que cuando es bloqueada por anticuerpos, las garrapatas tienen deficiencia en estas funciones, disminuyen su peso y terminan perdiendo la capacidad de reproducirse. A su vez, los anticuerpos, además de bloquear su función, activan el sistema de complemento desencadenando la lisis celular. (23, 24, 25).

Esta glicoproteína ya ha sido expresada exitosamente en *Escherichia coli*, en células de insectos mediante un vector de baculovirus, y en *Pichia pastoris*. A su vez, se ha demostrado que presenta efectividad en todas las formas recombinantes como partículas, cuerpos de inclusión y antígenos solubles (5).

##### **1.4.1.2. Subolesina**

La Subolesina es un factor de transcripción involucrada en la regulación génica de las garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Cuando la misma es deficiente se alteran distintos procesos celulares, desencadenando la degeneración del intestino, de la glándula salival y de los tejidos reproductivos y embrionarios, además de causar esterilidad en machos. También está involucrada en la expresión de genes del sistema inmune innato, y por lo tanto en la respuesta de las garrapatas frente a los patógenos. A su vez, a pesar de no estar reportado el mecanismo molecular por el cual el anticuerpo reconoce a este antígeno, ya que el mismo se encuentra en el citoplasma celular, esta reportada su eficacia para su utilización como antígeno en una vacuna contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (26, 27).

Es una proteína altamente conservada a lo largo de la evolución; característica que, junto con las mencionadas anteriormente, la hace ser exitosa para su utilización como antígeno en vacunas contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Cabe destacar que ya ha sido demostrado que la combinación de esta proteína con BM86 genera una mayor eficiencia en la protección del ganado contra las garrapatas debido a una sinergia entre ambos antígenos (23).

#### 1.4.1.3. P0

P0 es una proteína citoplasmática y un componente estructural de los ribosomas. Juega un rol importante en la regulación de la transcripción proteica al ser esencial para la unión de la subunidad 60s de los ribosomas. Su ausencia genera que dichas subunidades sean defectuosas, provocando una pérdida de la síntesis de proteínas y desencadenando la muerte celular (28, 29).

En las garrapatas *Rhipicephalus spp*, existe una región de la secuencia de esta proteína que es significativamente diferente a su secuencia ortóloga en el hospedador de estas garrapatas, es decir, los bovinos. Se ha reportado que un péptido codificado por 20 AA pertenecientes a esta región es eficiente para su utilización como antígeno en una vacuna contra *Rhipicephalus spp*. Al igual que sucede con Subolesina, no se conoce el mecanismo molecular por el cual los anticuerpos reconocen este antígeno, ya que el mismo se encuentra en el citoplasma celular. Sin embargo, esta reportado que cuando se administra el mismo a los vacunos, se observa una alta mortalidad de las garrapatas, una significativa reducción del peso de las mismas y del tamaño de los huevos, y a su vez, no hay presencia de reactividad cruzada de los anticuerpos generados con la proteína P0 de las vacas. Por otra parte, la secuencia de este péptido en diferentes especies de garrapatas es altamente conservada (28).

Debido a su pequeño tamaño, el péptido en general es fusionado a alguna molécula de tamaño más grande para que el mismo aumente su inmunogenicidad. KLH es una proteína carrier de gran tamaño usualmente utilizada para este motivo, debido a que es un antígeno dependiente de células T altamente inmunogénico, y que no genera interferencia con el antígeno al que se encuentra unido. Dicha proteína ha sido fusionada junto a P0 para aumentar su inmunogenicidad, pero la misma podría ser reemplazada con cualquier proteína que cumpla con sus mismas características (29, 30). A su vez, la manipulación de un péptido tan pequeño, sería prácticamente imposible dentro del laboratorio, por lo que la fusión del mismo a una proteína de mayor tamaño, permite la verificación de su expresión y purificación.

#### 1.4.2. Antecedentes de vacunas contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Ya se encuentran en el mercado vacunas contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Las dos primeras que fueron comercializadas coinciden en su antígeno; la glicoproteína BM86. La primera en ser lanzada al mercado corresponde a la vacuna **Gavac™** de origen cubano, en el año 1993. La segunda, denominada **TickGARD™**, fue comercializada un año después, en Australia. La primera, tuvo un resultado exitoso cuando fue probada en países como Cuba, Brasil, Argentina, Colombia y México, y la segunda también fue catalogada como eficaz, cuando fue testeada en territorio australiano. En ambos casos, se obtuvo una alta mortalidad de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, debido a la reducción de su fertilidad (5).

#### 1.4.3. Problemática de las vacunas existentes

A pesar de ser exitosas en la eliminación de las garrapatas, estas vacunas no presentan el 100% de efectividad en ningún caso. Se debe mencionar que tanto la vacuna de origen cubano como la de

origen australiano tienen aproximadamente un 80% de efectividad, habiéndose testeado la misma en pruebas de campo y laboratorio. Dicha efectividad, expresada por la respuesta de anticuerpos que induce la vacunación se va a manifestar por una reducción en el número de garrapatas, el peso y la capacidad reproductiva (4).

Sin embargo, el porcentaje mencionado disminuye cuando las mismas son utilizadas en regiones externas a las que fueron creadas. Este último aspecto se atribuye a las diferencias en las secuencias que existen en la proteína BM86 a lo largo del mundo. La proteína BM86 es codificada por un gen con alto grado de polimorfismo en distintas poblaciones de garrapatas, y ha sido demostrado que una diferencia de al menos 2,8% en su secuencia, es suficiente para que la vacuna no sea eficaz (4, 31).

Para sobrellevar este problema, es necesario que las secuencias antigénicas de la proteína BM86 que compone la vacuna, sean lo suficientemente similares a las que presentan las garrapatas autóctonas del lugar en donde será utilizada la misma. Para esto, se debe realizar un muestreo de las garrapatas provenientes del lugar, y mediante un alineamiento de secuencias a través de un estudio bioinformático, obtener una secuencia consenso para poder generar las proteínas recombinantes adecuadas, y así lograr una vacuna con los antígenos reales de la región establecida.

Por este motivo, siguen los estudios en todo el mundo para la fabricación de vacunas contra la garrapata *Rhipicephalus microplus*. Además de las vacunas comerciales mencionadas, existen varias patentes que basan sus invenciones en formulaciones inyectables para este propósito. Dos de las más actuales datan del 2016, una proponiendo una formulación con Subolesina y BM86, y otra proponiendo P0 como antígeno (25, 32).

### **1.5. El proyecto**

En Uruguay, gracias a un estudio bioinformático realizado, ya son conocidas las secuencias antigénicas autóctonas de BM86 y Subolesina (33, 34, 35). En relación a esta última, se ha observado que presenta un menor grado de polimorfismo que BM86, no evidenciando diferencias entre las poblaciones nativas analizadas y las de otras regiones geográficas (35). A partir de tales datos, se sintetizaron plásmidos con dichas secuencias por separado, además de un plásmido con la secuencia de Subolesina unida a P0. Esto último corresponde a la creación de una proteína quimérica, donde los genes estructurales de dos proteínas distintas se fusionan en un plásmido de expresión mediante una secuencia "linker". De esta forma las mismas se expresan juntas, obteniéndose así una única proteína final (21).

Se espera que en nuestro proyecto, se logren expresar de forma recombinante dichas proteínas y se estudie su inmunogenicidad en ganado, para la potencial fabricación de una vacuna contra *Rhipicephalus microplus*, eficaz en el Uruguay.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

Generar insumos para su uso en una potencial vacuna contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

### **2.2. Objetivos específicos**

- Verificar la presencia de los insertos de interés en los plásmidos utilizados
- Estudiar la expresión de los antígenos BM86, Subolesina y Subolesina-P0 a escala matraz
- Testear la expresión de los antígenos en biorreactor de 5 L
- Purificar los antígenos
- Analizar sueros de bovinos inmunizados con los antígenos de interés

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Secuencias y plásmidos utilizados

La obtención de las secuencias nucleotídicas de BM86, Subolesina y P0 utilizadas en este proyecto, fueron obtenidas mediante análisis polimórficos previamente realizados de poblaciones de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* nativas (36). Cabe destacar que dichas secuencias corresponden a epítopes inmunogénicos de las proteínas mencionadas, y no a las moléculas completas. A su vez, tales secuencias coinciden con las regiones de mayor variabilidad (Anexo 1).

Se debe mencionar que la secuencia de P0 fue fusionada a la de Subolesina con el fin de expresar una única proteína de mayor tamaño. De esta manera, se obtiene una proteína quimérica con epítopes de ambos antígenos, pero de un tamaño lo suficientemente grande como para poder manipular y verificar la expresión del péptido. Dicha fusión se generó mediante un linker compuesto por los aminoácidos glicina y serina, los cuales, por su pequeño tamaño y polaridad, le brindan a la proteína gran flexibilidad. El mismo contiene la siguiente secuencia: (GGGGS)<sub>3</sub> (22).

En la Tabla 1 se encuentran las características generales de los antígenos utilizados.

**Tabla 1. Antígenos utilizados**

| Nombre del antígeno | Peso molecular (kDa) | Tamaño del gen (kb) | Tipo de antígeno | Localización                    | Función                 |
|---------------------|----------------------|---------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------|
| Subolesina          | 18                   | 0,49                | Expuesto         | Glándulas salivales             | Factor de transcripción |
| BM86                | 29,8                 | 0,8                 | Oculto           | Microvellosidades del intestino | Procesos digestivos     |
| Subolesina-P0       | 22,2                 | 0,6                 | Oculto           | Subunidad ribosómica (P0)       | Síntesis proteica (P0)  |

Cada una de las secuencias antigénicas fueron clonadas en un plásmido de expresión pET28a de 5,4 Kb (Anexo 2) construidos artificialmente por la empresa GENSCRIPT. Cada plásmido contiene un promotor *lac* con el fin de que los mismos puedan ser inducidos con isopropil-D tiogalactopiranosido (IPTG). A su vez, presentan resistencia al antibiótico Kanamicina (Kana), y una secuencia His-tag para la posterior purificación de las proteínas recombinantes mediante una cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC). Según la información provista por la empresa GENSCRIPT, las secuencias inmunogénicas previamente descritas se encuentran clonadas entre los sitios de corte de las enzimas de restricción NdeI y BamHI.

#### 3.2. Verificación de los insertos clonados

La verificación de la presencia de los insertos de interés en los plásmidos utilizados se realizó mediante digestiones enzimáticas de los mismos con diferentes enzimas. Primeramente, se realizó una extracción de ADN plasmídico a partir de bacterias *E.coli* DH5α transformadas con los diferentes plásmidos, con el Kit de extracción de ADN ZR Plasmid Miniprep™ - Classic. Luego de cuantificados

los mismos, se prosiguió con las reacciones enzimáticas. Los plásmidos fueron digeridos con tres pares de enzimas diferentes: a) NdeI y BamHI, b) NdeI y EcoRI, c) NdeI y XhoI. Previo a esto se analizaron las secuencias nucleotídicas de los insertos mediante el programa "Nebcutter" para corroborar que los mismos no contuvieran los sitios diana de las enzimas a utilizar.

Cabe destacar que, en cada experimento, los plásmidos fueron digeridos tanto con cada enzima por separado, como con las dos enzimas juntas de cada par mencionado. Las condiciones utilizadas en cada digestión fueron las recomendadas por el protocolo adjunto de cada enzima de Thermo. En el caso de las dobles digestiones, las mismas también fueron corroboradas mediante el programa "Double Digest" de la misma marca. Mediante el mismo, se determinó el buffer indicado para las digestiones y la relación de cada enzima a utilizar.

Los productos obtenidos de las digestiones fueron analizados mediante una electroforesis en gel de agarosa 1% con Good View. Las muestras se corrieron junto al marcador de peso GeneRuler DNA Ladder Mix #SM0331.

### **3.3. Generación de Bancos Maestro y de Trabajo**

Para el mantenimiento de los tres plásmidos recombinantes se utilizó la cepa bacteriana *E.coli* DH5 $\alpha$ , y para la expresión de los mismos, bacterias *E.coli* BL21 DE3 y *E.coli* Rosetta-Gami DE3.

En primer lugar, se transformaron bacterias *E.coli* DH5 $\alpha$  electrocompetentes (Anexo 3) por medio de electroporación con los distintos plásmidos. Para cada reacción se agregó 1  $\mu$ L del plásmido correspondiente a 50  $\mu$ L de bacterias electrocompetentes. La mezcla se incubó en hielo durante 60 segundos y se transfirió a una celda de electroporación para proceder con la transformación. Luego de generado el pulso eléctrico se agregó inmediatamente 1 ml de medio SOC (Anexo 4). La mezcla se mantuvo en agitación a 37°C durante 1 hora. Se realizaron los respectivos controles de viabilidad, creciendo bacterias electroporadas sin el agregado de ADN exógeno, en medio LB sin kanamicina, y un control para verificar la efectividad del antibiótico, inoculado en medio LB con kanamicina, bacterias no resistentes a la misma.

Luego del tiempo establecido se plaquearon diferentes volúmenes de las células transformadas en medio Luria-Bertani (LB)-Agar (Anexo 5) con Kanamicina (50 $\mu$ g/mL) y el control de viabilidad en medio LB-Agar sin antibiótico. Dichas placas fueron incubadas durante 24 horas a 37°C. Posteriormente, a partir de las colonias aisladas obtenidas, se realizaron precultivos de cada cepa y se crecieron durante 16 horas en medio LB (Anexo 6) con Kana (50 $\mu$ g/mL), a 37°C y 200 rpm de agitación. Los precultivos se congelaron a -80°C en glicerol 30% generando de esta manera los bancos maestros de cada transformante DH5 $\alpha$  con los respectivos plásmidos. Para la obtención de los bancos de trabajo, se repitió tal procedimiento partiendo de precultivos de los bancos maestro de las bacterias mencionadas.

Procediendo con la generación de los bancos de las bacterias BL21 y Rosetta-gami, primeramente se realizaron extracciones de ADN plasmídico a partir de precultivos provenientes de cada banco de trabajo de las transformantes de DH5 $\alpha$  generadas, mediante el kit de extracción de ADN ZYMO ZR Plasmid Miniprep <sup>TM</sup> - *Classic* según su protocolo lo indica. Los plásmidos obtenidos fueron cuantificados para luego proceder con la electroporación de bacterias BL21 DE3 y Rosetta-gami DE3 electrocompetentes como se describió anteriormente. Para la generación de bancos maestros y de trabajo de estas bacterias con los diferentes plásmidos se repitió la metodología anteriormente descrita.

### 3.4. Expresión de antígenos a escala matraz

La cinética de crecimiento de las tres transformantes de *E.coli* BL21 DE3 generadas, se analizó mediante curvas de crecimiento de las mismas. Con este fin se inocularon tres matraces Erlenmeyer con 2 ml de precultivo de cada bacteria transformada. Dichos matraces de 250 ml contenían 120 mL de medio de cultivo LB y kana 50 µg/mL. Los cultivos se mantuvieron a 37°C con una agitación de 200 rpm permitiendo el crecimiento de los mismos. El seguimiento de la cinética de crecimiento de los cultivos, fue monitoreado mediante medidas de absorbancia con el fin de determinar la densidad óptica (OD) a 600 nm.

Luego de conocer el crecimiento de dichas bacterias, se prosiguió con la expresión de las proteínas de interés en matraces de 250 ml. Para esto se realizaron precultivos de cada transformante de BL21 de la manera mencionada anteriormente, y luego de 16 horas de incubación los mismos se escalaron a matraces Erlenmeyer con 50 mL de medio de cultivo LB y Kana 50 µg/mL. Estos cultivos se mantuvieron a 37°C, con 200 rpm de agitación hasta llegar a una densidad óptica de entre 0,6 a 0,8 a 600 nm. En dicho momento, fue agregado el IPTG 1mM para la inducción de las proteínas de interés. Se testearon distintas condiciones de temperaturas (18°C y 37°C) y diferentes tiempos de inducción (3 h, 4 h y 16 h).

Al cumplirse el tiempo estipulado para cada condición ensayada, los cultivos fueron centrifugados a 5000 rpm durante 10 minutos. Se descartaron los sobrenadantes y las células obtenidas se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso. Se realizaron en paralelo los respectivos controles, sin el agregado de IPTG.

El protocolo previamente descrito fue aplicado también para las bacterias *E.coli* Rosetta-gami DE3, analizando solo la inducción a 37 °C durante 3 h. De esta forma fue analizada la expresión de los plásmidos en dicha cepa y comparada con las de BL21.

### 3.5. Expresión de antígenos a escala fermentador

La expresión de los antígenos en una escala mayor, se llevó a cabo en un biorreactor Sartorius de Biostat® A de 5 L como el que se observa en la Figura 5 (37). El mismo consta de una camisa térmica para la regulación automática de la temperatura, medidor de pH y corrección automática del mismo, paletas para la agitación y un sistema de inyección de gases.

En dicho biorreactor se realizaron las correspondientes fermentaciones para cada antígeno, en dos medios de cultivo diferentes. Por un lado, se analizaron las expresiones de los antígenos en medio LB con IPTG, y por otro, se cultivaron las bacterias en un medio autoinductor ZYM-5052 (Anexo 7). En todos los casos el volumen final de las fermentaciones fue de 3 L. Para llevar a cabo lo mencionado, se partió de un precultivo de cada transformante de BL21 obtenida, y luego de 16 h los mismos fueron escalados a matraces Erlenmeyer de 1L conteniendo 400 ml de medio LB con kanamicina (100 µg/ml). Los cultivos se mantuvieron en agitación a 200 rpm y 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6-0,8. Una vez alcanzada la OD deseada, se inoculó el fermentador con 400 ml del cultivo con la bacteria de interés.

En los casos en los que se usó LB como medio de cultivo, la temperatura se mantuvo constante a 37°C y se adiciono 1 mM de IPTG cuando los cultivos alcanzaron la OD deseada. Los mismos se mantuvieron en agitación durante un tiempo de 3 horas adicionales. En los casos donde el medio utilizado fue el autoinductor (ZYM-5052), los cultivos se incubaron durante 16 horas a 37°C, disminuyendo la temperatura a 25 °C durante la noche. En todos los casos, la agitación se mantuvo constante en 200 rpm y se corrigió el pH manteniéndolo en 6,8 de manera automática, utilizando HCl y NaOH 1M.

Pasado el tiempo de inducción estipulado para cada condición ensayada, se cosecharon los cultivos y se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos. Luego se descartaron los sobrenadantes y los pellets celulares fueron conservados a -20°C.



**Figura 5. Biorreactor Sartorius BIOSTAT A de 5 L utilizado en el proyecto.**

En el caso de las bacterias BL21BM86, se realizó un análisis específico de la expresión de BM86 a lo largo del tiempo. Para esto se tomaron muestras del cultivo durante diferentes tiempos de la inducción, para su posterior disrupción celular y análisis mediante una electroforesis SDS-PAGE.

### **3.6. Disrupción celular**

La obtención de los componentes intracelulares de los diferentes cultivos, tanto a escala matraz como a escala fermentador, se realizó mediante la utilización de buffers de lisis y posterior sonicado.

Se probaron dos tipos de buffers de lisis: Buffer A (Buffer fosfato de sodio 20 mM pH 7,2; NaCl 100 mM; Lisozima 1 mg/ml; PMSF 1 mM) a escala matraz y Buffer B (Tampón fosfato salino 1X (PBS) (Anexo 8); y PMSF 1 mM) a escala fermentador. En ambos casos la proporción utilizada fue de 25 ml de buffer por gramo de pellet obtenido. Los pellets fueron resuspendidos en los buffers y se incubaron durante 30 minutos a 4°C. A continuación, se sonicaron las muestras, manteniéndose en hielo, con las siguientes condiciones de sonicado: 10s ON, 10s OFF, durante 3 minutos con una amplitud de 30%. Seguidamente las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm y a 4°C, durante 40 minutos.

Tanto las fracciones solubles como insolubles fueron analizadas mediante una electroforesis SDS-PAGE.

### **3.7. Preparación y análisis de muestras**

Las muestras provenientes de las fracciones solubles se prepararon con buffer de carga 6X y se incubaron a 95°C por 10 minutos. Por otro lado, 60 mg de cada fracción insoluble, se resuspendieron en 200 µl de SDS 10% y se incubaron a 95°C por 10 minutos. A continuación, se prepararon con buffer de carga 6X y se volvieron a incubar a 95° durante el mismo tiempo.

En el caso de las fracciones insolubles obtenidas del fermentador, las mismas fueron diluidas cinco veces previo a ser preparadas con el buffer de carga.

El análisis de todas las muestras proteicas se realizó mediante electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12%. Las muestras preparadas se corrieron junto a un marcador de peso molecular detallado en cada caso.

La visualización de las muestras se llevó a cabo mediante la tinción de los geles con azul de coomassie y posterior revelado con solución decolorante.

### **3.8. Lavado y solubilización de los cuerpos de inclusión**

El lavado y solubilización de los cuerpos de inclusión donde se encuentran nuestros antígenos de interés se llevó a cabo un protocolo preestablecido (38). Para analizar el paso del lavado se lavaron los cuerpos de inclusión provenientes de un cultivo de Subolesina. Los cuerpos de inclusión encontrados en las fracciones insolubles provenientes de las expresiones de BM86 y Subolesina-PO, fueron solubilizados directamente sin pasar por el primer tratamiento.

El aislamiento de los cuerpos de inclusión, es decir el lavado de los mismos, las fracciones insolubles de las muestras de Subolesina previamente sonicadas se trataron con fosfato de sodio 20 mM pH 7,2, urea 2 M, NaCl 0,5 M y Tritón X-100 2%. Posteriormente fueron sonicadas nuevamente con el mismo programa anteriormente utilizado y centrifugadas a 13000 rpm, durante 40 minutos a 4°C. Los pellets obtenidos fueron lavados por segunda vez con la mezcla anteriormente descrita, pero en este caso sin urea. Los mismos se centrifugaron con las mismas condiciones y los pellets obtenidos se almacenaron a -20°C para ser usados posteriormente.

Seguidamente, los cuerpos de inclusión obtenidos de cada inducción (ya sean los que fueron lavados, como los que no) fueron solubilizados con el fin de lograr la obtención de las proteínas de interés de forma soluble, y con sus colas de histidinas expuestas para su posterior purificación mediante IMAC. Por dicho motivo, los cuerpos de inclusión obtenidos de cada antígeno fueron incubados con 5 ml de 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM Imidazol, 6 M Urea, 1 mM 2-mercaptoetanol pH 8.0 por cada 100 ml de cultivo. Luego de 30 minutos de incubación, cada uno de ellos fue centrifugado a 13000 rpm durante 20 minutos para separar las proteínas solubles del resto de componentes de la mezcla. Una vez recogidos los sobrenadantes, se les realizó un cambio de buffer mediante una membrana de diálisis con 14 kDa de tamaño de poro, para eliminar la urea presente en los mismos e intercambiar dicho buffer por PBS 1X. De esta forma las proteínas quedan solubles, prontas para ser purificadas mediante una cromatografía de afinidad por metales inmovilizados.

### **3.9. Purificación de los antígenos mediante IMAC**

La purificación de las proteínas de interés se llevó a cabo mediante una cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) para cada antígeno. Como matriz se utilizó 1 g de ácido iminodiacético (IDA) previamente lavado con agua destilada y respetando la relación 1g de matriz cada 20 ml de muestra a purificar. Luego se cargó cada columna con 3 volúmenes de una solución de sulfato de níquel (NiSO<sub>4</sub>) 100mM, y a continuación se equilibraron las mismas con 5 volúmenes de PBS 1X, ya que en dicho buffer se encontraban resuspendidas las muestras a purificar. Posteriormente, se

adicionaron 20 ml de la muestra de interés (aplicado) y seguidamente, las columnas se mantuvieron en agitación suave durante 30 minutos con el fin de que las muestras se adhirieran completamente al níquel de la matriz. Transcurrido dicho tiempo, se recolectaron los percolados y se lavaron las columnas con 5ml de PBS 1X (lavado).

La recuperación de las proteínas en estudio fue realizada mediante el uso de un competidor, el Imidazol. La muestra unida a cada columna se eluyó con un gradiente de este compuesto, utilizando tres concentraciones diferentes: 20 mM, 250 mM y 500 mM. Posteriormente al agregado de cada solución, la columna se incubó durante 30 min en agitación. Cada eluido fue recolectado para luego ser analizado por electroforesis SDS-PAGE.

Como control, se realizó el mismo protocolo con una fracción soluble de Betalactamasa, la cual es sabido contiene una cola de histidinas para su purificación.

Las muestras del aplicado, percolado, lavado, eluidos y resina fueron preparadas y analizadas como se menciona anteriormente en la sección 3.7.

### **3.10. Análisis de sueros de los vacunos inmunizados con los antígenos de interés**

Con el fin de analizar la inmunogenicidad de los antígenos de interés, se inmunizaron vacunos de entre 6 y 12 meses de edad. Se analizaron 5 formulaciones diferentes, asignando tres vacunos para cada una de ellas. Se testearon los tres antígenos por separado, los tres antígenos juntos y como control se utilizó PBS con adyuvante (adyuvante incompleto de Freund). Los animales fueron inoculados los días 0 (primera inmunización), 20 y 40 (boosters) en forma subcutánea con aproximadamente 100 µg de cuerpos de inclusión de cada antígeno, los cuales se encontraban dentro las fracciones insolubles de las inducciones de los mismos. La cuantificación aproximada de los antígenos de interés se realizó mediante la comparación de las intensidades de bandas de sobreexpresión de los mismos, con respecto a un estándar proteico de concentración conocida (BSA 1mg/ml) analizados en una SDS-PAGE. La cuantificación se llevó a cabo con el programa ImageJ y los datos obtenidos fueron procesados con el fin de conocer de manera aproximada la concentración proteica presente en cada muestra.

Las vacunas se formularon mezclando 1 ml de cada solución antigénica en PBS 1X con 1 ml de adyuvante incompleto de Freund (AIF). En el caso de los controles, se utilizó dicha emulsión sin antígeno. Posteriormente las mezclas fueron vortexeadas durante 10 minutos. Se corroboró la correcta emulsión de los componentes de cada vacuna colocando una gota de las mismas sobre agua y verificando que estas flotaban y conservaban su morfología.

#### **3.10.1. Obtención de los sueros**

Los sangrados de los vacunos fueron realizados los días 0, 20, 40 y 60. Para el análisis de los mismos, se realizaron pools de los sueros de los tres vacunos de cada condición. Las muestras de sangre obtenidas fueron centrifugadas a 3000 rpm por 20 minutos. El suero obtenido se almacenó a -20°C hasta su posterior utilización.

#### **3.10.2. Western Blot para la detección de anticuerpos**

Para el análisis de los sueros obtenidos mediante Western Blot se utilizó el equipo de transferencia iBlot® de Invitrogen. Para esto se realizó primeramente una electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida al 12% con las fracciones insolubles de los antígenos y las proteínas solubles y

purificadas mediante IMAC. Luego de la obtención de los geles, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa según las indicaciones del equipo. De esta forma se obtuvieron 4 membranas distintas para ser incubadas con diferentes sueros provenientes de las inoculaciones de los tres antígenos por separado (día 60), y los del día 0. Una vez transferidas las proteínas, las membranas fueron bloqueadas con una solución compuesta por PBS-Tween 20 0,1% y leche descremada en polvo al 5%. Luego de 16 horas de bloqueo a 4°C las membranas fueron lavadas con PBS-Tween 20 0,05% durante 15 minutos para luego ser incubadas con los sueros correspondientes durante una hora a temperatura ambiente. Cabe destacar que los sueros se utilizaron con una dilución 1 en 500. Una vez transcurrido el tiempo dispuesto, las membranas fueron lavadas nuevamente tal como se mencionó anteriormente. A continuación, las mismas fueron incubadas con un anticuerpo secundario anti-IgG bovina conjugado a fosfatasa alcalina (1/1000). Dicha incubación se realizó durante 45 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente las membranas fueron lavadas nuevamente y se revelaron con la solución NBT/BCIP (nitro-azul tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3'-indol fosfato) durante un tiempo aproximado de 10 minutos.

### **3.10.3. ELISA para la detección de anticuerpos**

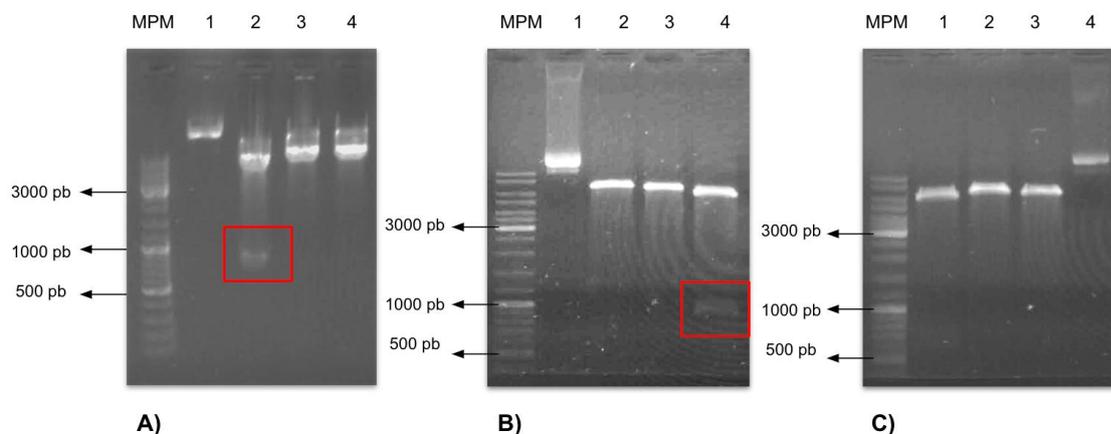
Para llevar a cabo esta técnica, se sensibilizaron placas de ELISA con 100µl de la solución antigénica (6 mg/ml) correspondiente para cada suero. Para el análisis del suero correspondiente a las vacas inoculadas con los tres antígenos, se mezclaron en partes iguales las tres soluciones de cada antígeno. Posteriormente, las placas se incubaron durante 16 horas a 4°C. Luego se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 20 0,1% para seguidamente bloquear la placa con 300 µl de PBS-Tween 20 0,05 % y leche descremada en polvo al 5%. Dicha incubación también se realizó durante 16 horas a 4°C. Posteriormente se lavaron las placas tal como se mencionó anteriormente y se colocaron 100 µl de diluciones seriadas al medio de los sueros correspondientes a las 5 condiciones inoculadas y al tiempo 0, desde una dilución 1/500 a 1/32000 en PBS-Tween 20 0.5%. Cabe destacar que a su vez, se compararon los sueros obtenidos del sangrado del día 20, con los del día 60 (suero final). En el caso de Subolesina, se toma como suero final el correspondiente al sangrado del día 40. Luego de una hora de incubación a 37°C, los pocillos se lavaron de la forma mencionada y se agregaron 100 µl del anticuerpo secundario anti-IgG bovino conjugado a fosfatasa alcalina. Las placas se incubaron nuevamente a 37 °C durante 45 minutos y se volvieron a lavar. El revelado se realizó con 100 µl de Solución de revelado (10 mg de PNPP (p-nitrofenil fosfato-sal disódica) en 10 ml de buffer tris 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> mM pH 9,5). Las placas se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente y seguidamente se detuvo el revelado con 50 µl de NaOH 1M. Se realizó la lectura de absorbancia de cada placa a 405 nm y los datos obtenidos fueron analizados con el programa Prisma 9.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Verificación de los insertos clonados

Con el fin de conocer si los plásmidos obtenidos de la empresa GENSCRIPT contenían los insertos de interés, se realizaron diferentes digestiones enzimáticas de los mismos. Para cada par enzimático utilizado, además de las digestiones dobles, se realizaron como control digestiones simples con cada una de las enzimas.

La primera digestión de los plásmidos se realizó con las enzimas NdeI y BamHI. Dicha elección responde a la información brindada por la empresa responsable de la síntesis de los mismos, la cual reportó que los insertos se encontraban clonados con dichas enzimas. Dicho esto, se espera la liberación del inserto de BM86 de 0,80 Kb, de Subolesina de 0,49 Kb y de Subolesina-P0 de 0,60 Kb. A pesar de esto, en ninguno de los tres casos logró ser liberado el inserto de interés (Anexo 9A). Por el motivo descrito, se continuó con las digestiones de los plásmidos utilizando diferentes enzimas. En la Figura 6A, se observa la digestión de pET28a/SUBO-P0 con NdeI y EcoRI y en la Figura 6 B y C, las digestiones de pET28a/BM86 y pET28a/SUBO con NdeI y XhoI respectivamente.



**Figura 6. Digestiones enzimáticas de pET28a/SUBO-P0 (A), pET28a/BM86 (B) y pET28a/SUBO (C).** **A)** MPM: Marcador de peso molecular GeneRuler DNA Ladder Mix #SM0331; 1: pET28a/SUBO-P0 sin digerir; 2: pET28a/SUBO-P0 digerido con NdeI y EcoRI; 3: pET28a/SUBO-P0 digerido con NdeI; 4: pET28a/SUBO-P0 digerido con EcoRI. **B)** MPM: GeneRuler DNA Ladder Mix #SM0331; 1: pET28a/BM86 sin digerir; 2: pET28a/BM86 digerido con NdeI; 3: pET28a/BM86 digerido con XhoI; 4: pET28a/BM86 digerido con NdeI y XhoI. **C)** MPM: GeneRuler DNA Ladder Mix #SM0331; 1: pET28a/SUBO digerido con NdeI y XhoI; 2: pET28a/SUBO digerido con NdeI; 3: pET28a/SUBO digerido con XhoI; 4: pET28a/SUBO sin digerir.

La liberación de los insertos con las enzimas NdeI y EcoRI solo fue exitosa para la digestión de pET28a/SUBO-P0, cuyos resultados se observan en la Figura 6A. En el carril 1, se observa el plásmido pET28a/SUBO-P0 sin digerir. En el carril 2 se observa la muestra correspondiente a la doble digestión de dicho plásmido. Consecutivamente, en los carriles 3 y 4 se observa el plásmido linealizado con las enzimas NdeI y EcoRI respectivamente. Se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler DNA Ladder Mix #SM0331 representado en la figura como MPM. Para el caso de las digestiones de pET28a/BM86 y pET28a/SUBO con estas mismas enzimas, no se observaron los insertos de interés liberados (Anexo 9B).

En relación a los carriles correspondientes a las dos digestiones simples (carril 4 y 5), se logra visualizar en cada uno una banda con un peso mayor a los 3000 pb, tamaño que corresponde a la

última banda correctamente definida del marcador de peso molecular. Por su parte, el plásmido contiene un tamaño total de 6000 pb (5400 pb de pET28a y 600 pb de Subo-P0). A su vez, las bandas visualizadas se encuentran en un peso menor que el plásmido sin linealizar, el cual se encuentra en el carril 1. Se debe destacar que cuando los plásmidos no se encuentran linealizados, los mismos se visualizan en un tamaño mayor al real en los geles de electroforesis.

En el carril 2, donde se encuentra la doble digestión de pET28a/SUBO-P0, se visualiza claramente una banda entre los pesos correspondientes a 500 pb y 1000 pb. La misma puede corresponder al inserto de Subo-P0 ya que el mismo tiene 600pb. A su vez, el resto del plásmido se observa como una banda de tamaño menor a las del plásmido linealizado, por lo que se demuestra que la doble digestión liberó un fragmento del plásmido original.

En otro orden, se realizaron digestiones de los plásmidos pET28a/BM86 y pET28a/SUBO con las enzimas NdeI y XhoI. Debido a que los pares de enzimas anteriores no lograron liberar los insertos de interés en dichos plásmidos, se eligieron estas últimas enzimas ya que sus sitios de corte se encuentran uno en cada extremo del sitio de multiclonado. De esta forma nos aseguramos que los genes de nuestro interés se encuentren al menos dentro del fragmento liberado por dichas enzimas. Los resultados de las digestiones de pET28a/BM86 y pET28a/SUBO se muestran en la Figura 6B y 6C respectivamente.

Puesto que pET28a/BM86 presenta 6200 pb y que pET28a/SUBO tiene 5890 pb, se puede deducir que las bandas observadas en los carriles de las digestiones simples de ambos plásmidos se encuentran en los tamaños esperados. Por otro lado, en el caso de las dobles digestiones, se observa una banda con un tamaño ligeramente menor a los plásmidos linealizados respectivamente, por lo que podría significar que liberaron un fragmento de los mismos. Sin embargo, en el carril 1 de la Figura 6C (doble digestión de pET28a/SUBO) no se logra visualizar una banda del tamaño esperado del inserto de Subolesina, como sí sucede en el caso del carril 4 de la Figura 6B, donde en la altura correspondiente a 800 pb se visualiza una banda que podría corresponder al inserto de BM86. Puesto que el tamaño del inserto de Subolesina es de 490 pb, y la banda más chica que se visualiza del marcador corresponde a 500 pb, se podría deducir que el inserto no se visualiza debido a que sobrepasó el límite inferior del gel. A su vez, el pequeño tamaño del inserto, o una baja concentración del mismo son factores que pueden haber impedido su visualización en el gel. Por estos motivos se continuaron con los experimentos posteriores, como las expresiones proteicas, donde se confirmará si pET28a/SUBO realmente contiene el gen del antígeno Subolesina.

De todas maneras, sería pertinente realizar una secuenciación de los insertos liberados de Subolesina-P0 y BM86, así como del plásmido linealizado de Subolesina, para corroborar que efectivamente los insertos de interés se encuentren en los plásmidos utilizados.

#### **4.2. Generación de Bancos Maestros y de Trabajo de las cepas bacterianas para su uso en experimentos posteriores**

A partir de los plásmidos obtenidos de la empresa GENSCRIPT, y de las cepas bacterianas *E.coli* DH5 $\alpha$ , *E.coli* BL21 DE3, y *E.coli* Rosetta-gami DE3, las cuales fueron adquiridas del stock del Laboratorio de Biotecnología ORT, se generaron los bancos maestros y de trabajo mediante una transformación bacteriana por la técnica de electroporación. Los transformantes obtenidos se detallan en la Tabla 2.

**Tabla 2. Cepas bacterianas generadas.**

|                | <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ | <i>E.coli</i> BL21 DE3 | <i>E.coli</i> Rosetta Gami DE3 |
|----------------|----------------------------|------------------------|--------------------------------|
| pET28a/BM86    | DH5 $\alpha$ BM86          | BL21BM86               | RosettaBM86                    |
| pET28a/SUBO    | DH5 $\alpha$ SUBO          | BL21SUBO               | RosettaSUBO                    |
| pET28a/SUBO-P0 | DH5 $\alpha$ SUBOP0        | BL21SUBOP0             | RosettaSUBOP0                  |

Se debe mencionar que las bacterias de la cepa *E.coli* DH5 $\alpha$  fueron utilizadas para el mantenimiento de los plásmidos a lo largo del tiempo, ya que la misma contiene mutaciones para la deficiencia de endonucleasas evitando que digieran el plásmido insertado y resultando en una mayor estabilidad del mismo (39, 40).

Por otro lado *E.coli* BL21 DE3 y *E.coli* Rosetta-gami DE3 se utilizaron como cepas de expresión para la obtención de las proteínas recombinantes requeridas. Esta elección se debe a que las mismas presentan deficiencia en algunas proteasas lo que evita la degradación de proteínas. A su vez, contienen una copia cromosómica de la T7 ARN Polimerasa la cual es utilizada en expresiones bajo la inducción del promotor *lac*. En adición, Rosetta-gami contiene tARNs para la expresión de codones raros, en especial cuando se requieren expresar proteínas eucariotas. En conclusión, estas características hacen a las últimas dos cepas mencionadas, ideales para la expresión de proteínas reguladas bajo el control del promotor *lac* (41, 42).

La utilización de dos cepas diferentes de expresión, se realizó con la intención de comparar la eficiencia de expresión en cada una de ellas.

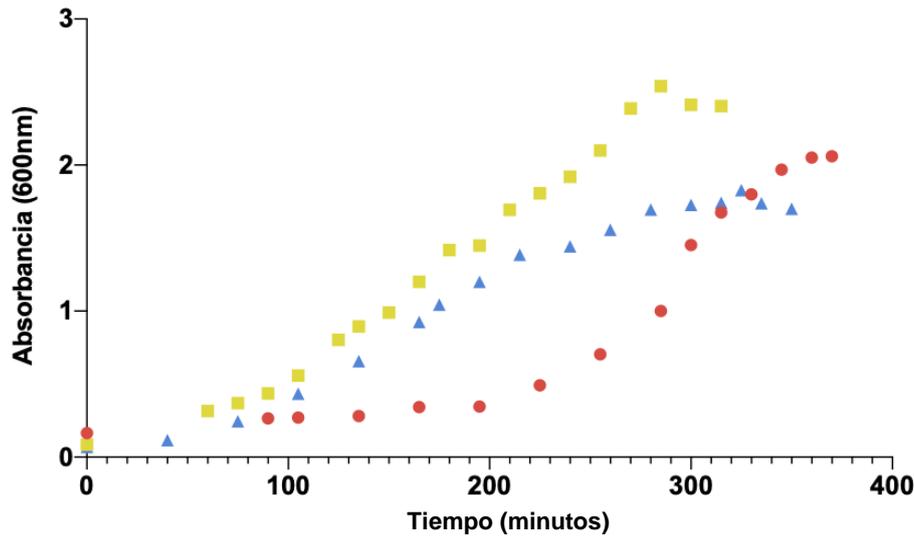
### **4.3. Expresión de los antígenos a escala matraz**

Una vez analizados los plásmidos y generadas las cepas de expresión, se continuo con las inducciones a nivel matraz de los diferentes antígenos. Las mismas se realizaron con el propósito estudiar bajo qué condiciones y en qué forma se expresaban los antígenos de interés.

#### **4.3.1. Curvas de crecimiento a escala matraz**

Con el fin de determinar si la presencia de los diferentes plásmidos en las distintas transformantes de *E.coli* BL21, o la expresión basal de alguna proteína afectaban de alguna manera el crecimiento de las bacterias, se procedió con un análisis de su cinética de crecimiento. Está demostrado, que la producción de proteínas recombinantes genera estrés a las células transformadas afectando directamente el crecimiento celular. El mismo, puede estar asociado directamente a las propiedades específicas de las proteínas en cuestión, a los niveles de transcripción y transducción, y a las condiciones de inducción (43).

Por estos motivos, se realizó una curva de crecimiento de cada una de las transformantes de *E.coli* BL21, tomando medidas de absorbancia a 600 nm a lo largo del tiempo. En la Figura 7 se expone la gráfica obtenida con dichos datos.



**Figura 7. Curvas de crecimiento de las diferentes transformantes de *E.coli* BL21. Círculo rojo: Subolesina; Cuadrado amarillo: BM86; Triángulo azul: Subolesina-P0.**

A partir de las curvas de crecimiento obtenidas, se logra observar que los tres cultivos presentarían un crecimiento exponencial. Igualmente se debería estudiar durante un tiempo más prolongado el crecimiento de los cultivos ya que la fase estacionaria no logra observarse en su totalidad, sino que simplemente se visualiza un decaimiento de la fase exponencial.

Para el caso de BL21BM86 y BL21SUBO-P0, no se logra distinguir la duración de la fase de adaptación y ambos cultivos crecen exponencialmente hasta alcanzar un decaimiento de esta fase en una OD de 2,3 aproximadamente para BL21BM86 (270 min), y 1,7 para el caso de BL21SUBO-P0 (320 min).

En el caso de BL21SUBO, se observa que su fase de adaptación es más extendida en el tiempo en comparación con BL21BM86 y BL21SUBO-P0, durando aproximadamente 200 minutos. Esto demuestra que el crecimiento del primero sucede de manera más lenta en comparación a los últimos, quienes se adaptan más fácilmente y rápidamente a las condiciones del cultivo.

Sin embargo, si se compara el fin de las fases exponenciales y el inicio de las fases estacionarias de los cultivos, se puede observar que Subolesina comienza a detener su crecimiento en una OD aproximada de 2, concentración intermedia a 2,3 y 1,7 correspondientes al fin de las fases exponenciales de BL21BM86 y BL21SUBO-P0 respectivamente. Esto demuestra que, a pesar de que BL21SUBO demora más tiempo en adaptarse a las condiciones de cultivo, llega a crecer hasta una OD intermedia de los restantes.

Como se puede observar, a pesar de estar creciendo la misma cepa bacteriana bajo iguales condiciones de temperatura y agitación, es decir *E.coli* BL21 DE3, las tres transformantes presentan un crecimiento diferente. Como se mencionó, BL21SUBO presenta una fase de adaptación más prolongada en comparación con las dos transformantes restantes. Esto puede deberse al pequeño tamaño de Subolesina, el cual podría permitirle a la bacteria generar una expresión basal de la proteína, ocasionando estrés a la célula hospedadora y dificultando su adaptación al medio (43).

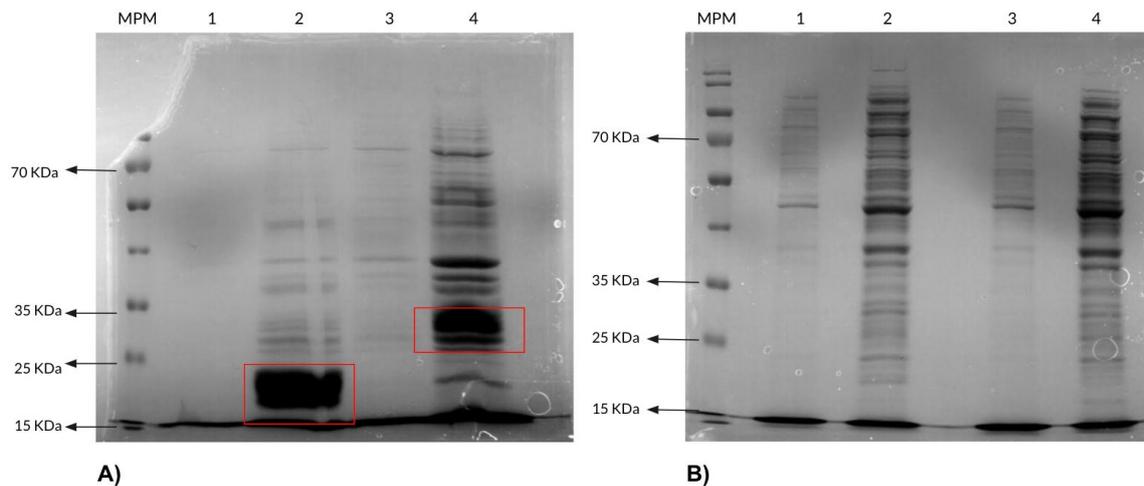
Posteriormente, para continuar con las expresiones de las proteínas, se eligió una OD de entre 0,6 y

0,8 para la inducción de los tres cultivos, puesto que esta reportado como el momento apropiado para el agregado del agente inductor (44). A su vez, dicha OD corresponde en todos los casos, a la fase exponencial de nuestros cultivos.

#### 4.3.2. Inducciones en la cepa *E.coli* BL21 DE3

Para la expresión de los antígenos en estudio, se utilizaron bacterias *E.coli* BL21 transformadas con los plásmidos correspondientes tal como fue mencionado anteriormente. La densidad óptica elegida para la inducción de las proteínas fue un rango de entre 0,6-0,8, puesto que corresponde al momento generalmente propuesto para la inducción de proteínas en *E.coli* (44). Luego de las inducciones, los cultivos fueron centrifugados y lisados, para repetir el primer paso nuevamente. De este último procedimiento se obtuvieron las fracciones insolubles y solubles de los tres cultivos con sus respectivos controles, las cuales fueron analizadas en geles de poliacrilamida 12%.

Tal como se especificó en la sección “Materiales y Métodos”, se testearon distintas condiciones de tiempos: 3, 4 y 16 h y temperaturas: 37 y 18 °C. A continuación, se detallan los resultados de las muestras obtenidas a partir de las inducciones de 3 horas a 37°C con 1mM de IPTG utilizando como buffer de lisis la opción A (Buffer fosfato de sodio 20 mM pH 7,2; 100 mM de HCl; Lisozima 1 mg/ml; PMSF 1 mM). En la Figura 8 se exponen las corridas electroforéticas obtenidas con las muestras de las inducciones de BL21BM86 y BL21SUBO.



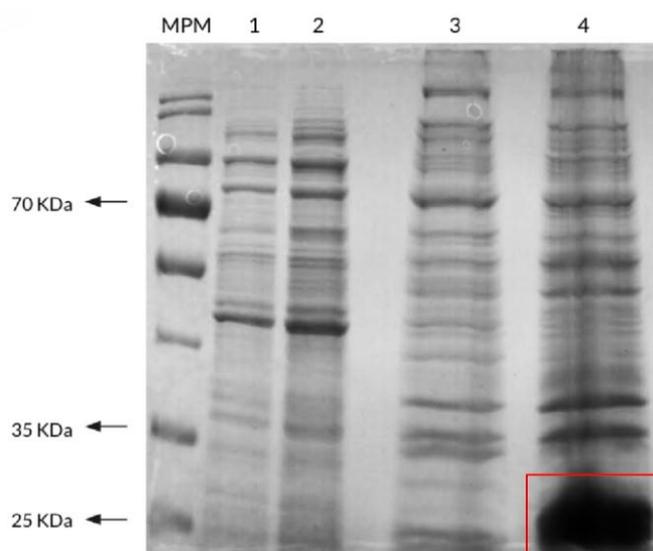
**Figura 8. Análisis de fracciones insolubles (FI) (A) y solubles (FS) (B) de las inducciones de las cepas BL21BM86 y BL21SUBO en SDS-PAGE. A) MPM: PageRuler Prestained Protein Ladder #26616; 1: FI de BL21SUBO control; 2: FI de BL21SUBO inducción; 3: FI de BL21BM86 control; 4: FI de BL21BM86 inducción. B) MPM: PageRuler Prestained Protein Ladder #26616; 1: FS de BL21SUBO control; 2: FS de BL21SUBO inducción; 3: FS de BL21BM86 control; 4: FS de BL21BM86 inducción.**

En la Figura 8A se visualizan las fracciones insolubles de las inducciones con sus respectivos controles. Se observa la sobreexpresión de una proteína tanto en el carril 2, como en el 4. En ambos casos, estas bandas de tamaño considerado coinciden con los pesos esperados. Por un lado, en el carril 2, el cual corresponde a la fracción insoluble (FI) de la inducción de Subolesina, la banda mencionada se encuentra a la altura correspondiente a un tamaño entre 15 kDa y 25 kDa, coincidiendo con el tamaño del antígeno Subolesina de 18 kDa. Por otro lado, en el carril 4, la banda de sobreexpresión se encuentra ubicada entre los tamaños de 25 kDa y 35 kDa, lo cual concuerda

con el peso del antígeno de BM86 de 29,8 kDa. Al observar los carriles 1 y 3 de esta figura, se distingue claramente la falta de sobreexpresión de alguna proteína en los tamaños esperados, y por lo tanto, sin la presencia de IPTG en el cultivo celular los antígenos de interés no son expresados.

En comparación, en la Figura 8B, donde se visualizan las fracciones solubles de los cultivos de BM86 y Subolesina (inducciones y controles), en ningún caso se divide alguna proteína sobreexpresada en los tamaños esperados. Puesto esto, se deduce que los antígenos son expresados en las fracciones insolubles, bajo la forma de cuerpos de inclusión. A su vez, se observa el correcto funcionamiento del buffer de lisis y sonicado, debido a la cantidad de proteínas presentes en las fracciones solubles.

Por otra parte, en la Figura 9, se observa una electroforesis SDS-PAGE con las muestras de la fracción soluble e insoluble de la inducción del cultivo BL21SUBO-P0 con sus respectivos controles.



**Figura 9. Análisis de fracciones solubles (FS) e insolubles (FI) de la inducción de BL21SUBO-P0 en SDS-PAGE. MPM:** PageRuler Prestained Protein Ladder #26616; **1:** FS BL21SUBO-P0 control; **2:** FS BL21SUBO-P0 inducción; **3:** FI BL21SUBO-P0 control; **4:** FI BL21SUBO-P0 inducción

Como se puede apreciar, al igual que en los casos de BM86 y Subolesina, en este caso se observa una banda de sobreexpresión en la fracción insoluble de la inducción del cultivo de BL21SUBO-P0 (carril 4). La misma se encuentra en un tamaño de aproximadamente 25 kDa. Por su parte, el antígeno de Subolesina-P0 pesa alrededor de 22 kDa, por lo que teniendo en cuenta el tamaño de la banda (recuadrada en rojo), producto de la sobreexpresión, se podría considerar que esta se encuentra en el peso esperado para dicho antígeno. Dicho esto, se puede deducir que, bajo las condiciones establecidas, Subolesina-P0 es también expresada la fracción insoluble bajo la forma de cuerpos de inclusión.

En cuanto a los resultados generales obtenidos de las inducciones en matraz, se pueden detallar varios puntos. Primeramente, como fue aclarado, los resultados informados corresponden a las inducciones de 3 horas a 37 °C con 1mM de IPTG y buffer de lisis "A". Sin embargo, tal como se detalló en la metodología, se estudiaron diferentes condiciones para las expresiones de las proteínas con el fin de verificar primero, si las proteínas de interés eran expresadas, y segundo, para determinar si en alguna condición, las mismas eran obtenidas en la fracción soluble de los cultivos. Se ha reportado que, en muchas ocasiones, una misma proteína es expresada en diferentes fracciones debido a que las mismas poseen distintas condiciones óptimas de inducción. Existen múltiples variables posibles a optimizar que están relacionadas a minimizar el estrés metabólico para la célula,

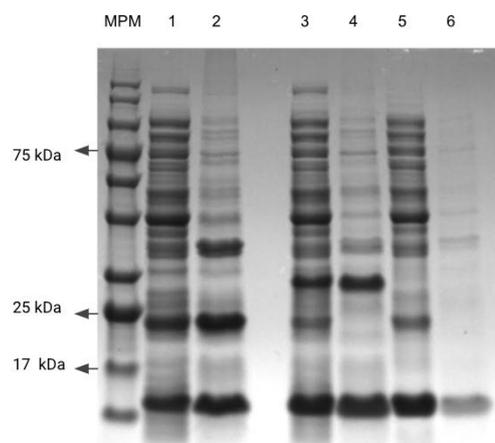
las cuales podrían influir en la forma de expresión de las proteínas de interés. Algunas de estas condiciones podrían ser la temperatura de inducción o la temperatura posterior a la misma, el tiempo posterior a la inducción, la concentración del agente inductor, y la composición del medio de cultivo (45).

Dicho esto, se debe destacar que dichas inducciones arrojaron resultados similares. En todos los casos de temperatura y tiempos analizados, se obtuvo la expresión de las proteínas en las fracciones insolubles de los cultivos (Anexo 10). Por lo tanto, se advierte que en ningún caso la expresión de los antígenos ocurre en las fracciones solubles obtenidas. Esto en general sucede, cuando existe la alta expresión de determinadas proteínas en bacterias recombinantes, bajo condiciones que no permiten el óptimo plegamiento de las mismas. De esta forma, se obtienen agregados de proteínas generando los denominados cuerpos de inclusión. Estos agregados proteicos son altamente específicos y están compuestos fundamentalmente por la proteína recombinante de interés (46). En muchas ocasiones es difícil encontrar las condiciones óptimas para la expresión de los antígenos en las fracciones solubles, y por lo tanto se debe aplicar una metodología de solubilización de los cuerpos de inclusión para la obtención de las proteínas de manera soluble (45).

En conclusión, las condiciones seleccionadas para la expresión de los antígenos fueron 3 horas de inducción a una temperatura de 37 °C, ya que las mismas representan al menor tiempo probado y la temperatura óptima de crecimiento de *E.coli* BL21 para dicho tiempo (47).

#### 4.3.3. Inducciones en la cepa *E.coli* Rosetta-gami DE3

Debido a la obtención de las proteínas de interés bajo la forma de cuerpos de inclusión en *E.coli* BL21, se realizó una expresión en *E.coli* Rosetta-gami de cada antígeno, para verificar si en las mismas, las proteínas se expresaban de forma soluble. De esta forma se evitarían los pasos de solubilización y replegamiento de las proteínas, y los costos económicos asociados a dichos procedimientos. Las condiciones utilizadas fueron las elegidas para las inducciones en *E.coli* BL21 DE3: 3 h a 37°C. Los resultados se observan en la Figura 10.



**Figura 10. Análisis de las inducciones en *E.coli* Rosetta Gami a 37°C y 3 h en SDS-PAGE. MPM:** AccuRuler RGB Prestained Protein Ladder. **1:** FS BM86; **2:** FI BM86; **3:** FS Subolesina; **4:** FI Subolesina; **5:** FS Subolesina-P0; **6:** FI Subolesina-P0.

En este caso, no se obtuvieron las proteínas de interés en ninguna fracción de ningún caso. A pesar de esto, se deberían de analizar otras condiciones de inducción ya que como fue mencionado, no siempre todas las condiciones son exitosas para la inducción de proteínas recombinantes en una

cepa bacteriana.

Sin embargo, los resultados obtenidos no son desalentadores. La obtención de las proteínas en cuerpos de inclusión representa ventajas como la protección de las proteínas de la degradación proteolítica, y la prevención de toxicidad proteica hacia las bacterias (45).

Teniendo en consideración estos resultados, los ensayos posteriores fueron realizados con las cepas de *E.coli* BL21, ya que en *E.coli* Rosetta-gami ningún antígeno logró ser expresado.

#### **4.4. Expresión de los antígenos a escala fermentador**

Una vez estudiada la expresión de los antígenos de interés a escala matraz, se prosiguió con la expresión de los mismos en una escala mayor, utilizando un biorreactor de 5L conteniendo 3L de medio de cultivo. Esto responde a la idea de llevar el proceso presentado en este proyecto a una escala mayor, para la posible fabricación de una vacuna bovina contra garrapatas.

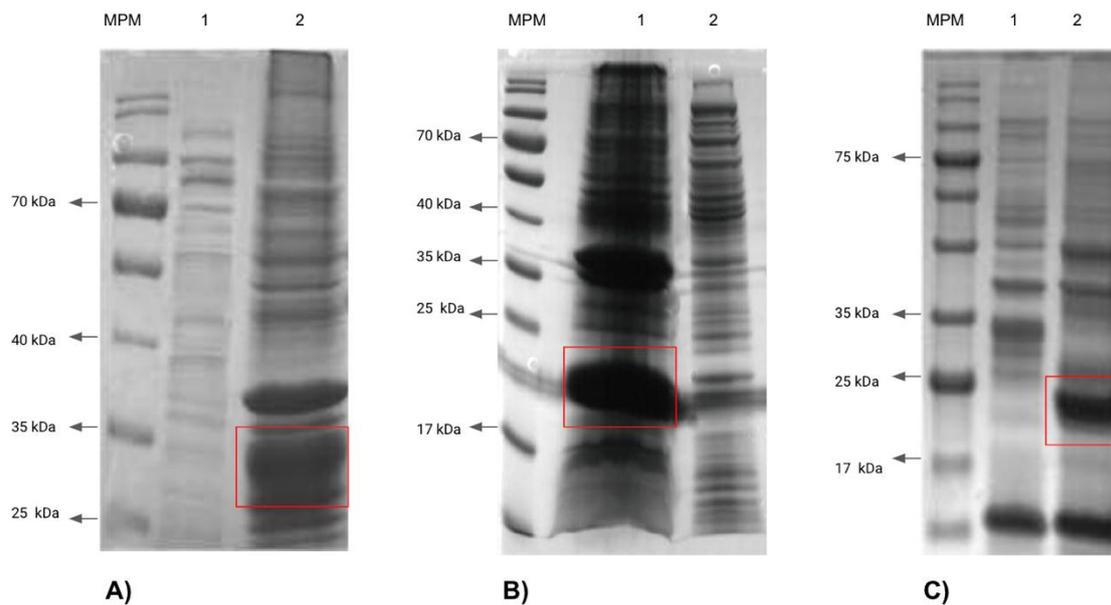
Se eligió el tipo de fermentación en lote para todas las ocasiones, ya que durante las mismas no se administró sustrato más que el presente en el medio del cultivo inicial. De esta forma se ahorra en sustrato, se minimizan las probabilidades de contaminación del cultivo y por ende la pérdida de rendimiento, y a su vez, se disminuyen los costos de mantenimiento. Sin embargo, sería posible obtener rendimientos mayores en una fermentación en lote alimentado, ya que se adiciona sustrato a medida que transcurre el crecimiento bacteriano para evitar la alta concentración de metabolitos secundarios. Como desventaja, cabe destacar que esta metodología requiere de una mayor optimización del proceso en relación al medio de cultivo y condiciones de inducción (48).

A su vez, tal como fue descrito en la metodología, se probaron dos tipos de medios de cultivo distintos. Por un lado, se utilizó el medio LB ya utilizado en las inducciones a escala matraz. Por otra parte, se probó un medio autoinductor (ZYM-5052), el cual permite la producción de proteínas recombinantes sin la adición de IPTG para los sistemas de expresión controlados por el *promotor lac*. Además de las fuentes de vitaminas, factores de crecimiento y nitrógeno, se utilizan distintas fuentes de carbono como glucosa, glicerol y lactosa, donde primero se utiliza glucosa como el sustrato de carbono preferido, seguido de glicerol y lactosa. Este último, a su vez, actúa como inductor de la producción de proteínas controladas por el *promotor lac*. De esta manera, gracias a la autoinducción del cultivo, se evita el monitoreo del crecimiento bacteriano con el fin de determinar el momento correcto para la adición de IPTG, evitando a su vez, los gastos económicos del mismo (49).

Aunque no se analizó la inducción de las proteínas con el medio autoinductor a escala matraz, esto hubiese sido apropiado para disminuir costos y tiempo en el caso de que el mismo no sea eficaz para la expresión de las proteínas. De todos modos, la expresión de las proteínas a escala matraz puede diferir de la obtenida a escala fermentador, ya que en esta última se incorporan otras variables a testear.

En ambos tipos de medio no se utilizó antibiótico por el alto costo que representaba la utilización del mismo a gran escala, en cambio, sí se utilizó Kanamicina en los precultivos e inóculos para la selección de las transformantes de BL21 obtenidas (50).

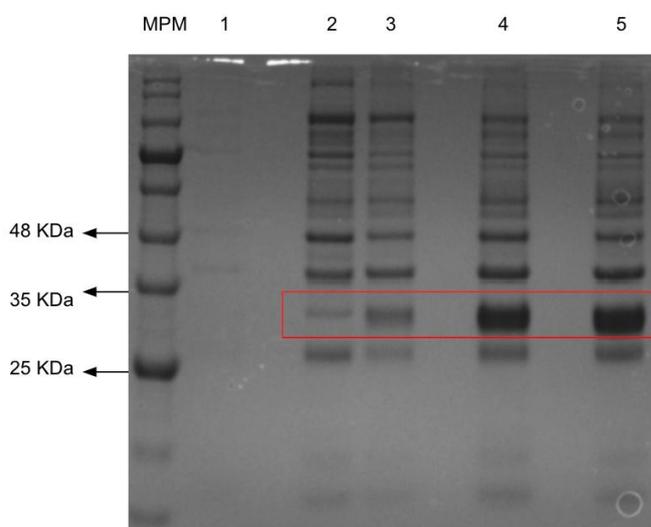
Para el caso de las expresiones de los diferentes antígenos en biorreactor con IPTG en medio LB, los mismos se obtuvieron en las fracciones insolubles, tal como sucedió a escala matraz (Figura 11).



**Figura 11: Análisis de la expresión de los antígenos en biorreactor con medio de cultivo LB con IPTG mediante SDS-PAGE. A) MPM:** PageRuler Prestained Protein Ladder #26616; **1:** FS BM86; **2:** FI BM86; **B) MPM:** PageRuler Prestained Protein Ladder #26616; **1:** FI Subolesina; **2:** FS Subolesina; **C) MPM:** AccuRuler RGB Prestained Protein Ladder; **1:** FS Subolesina-P0; **2:** FI Subolesina-P0.

En cuanto a las fermentaciones realizadas con medio ZYM-5052 durante 16 horas, los resultados se muestran a continuación.

En la Figura 12 se pueden observar los resultados de la inducción de BL21BM86 a escala fermentador. Como se describe en la sección “Materiales y Métodos”, en el caso de BM86 el objetivo fue analizar el nivel de expresión de la proteína a lo largo del tiempo. Esto se llevó a cabo tomando muestras del cultivo en diferentes momentos de la fermentación para su posterior análisis.

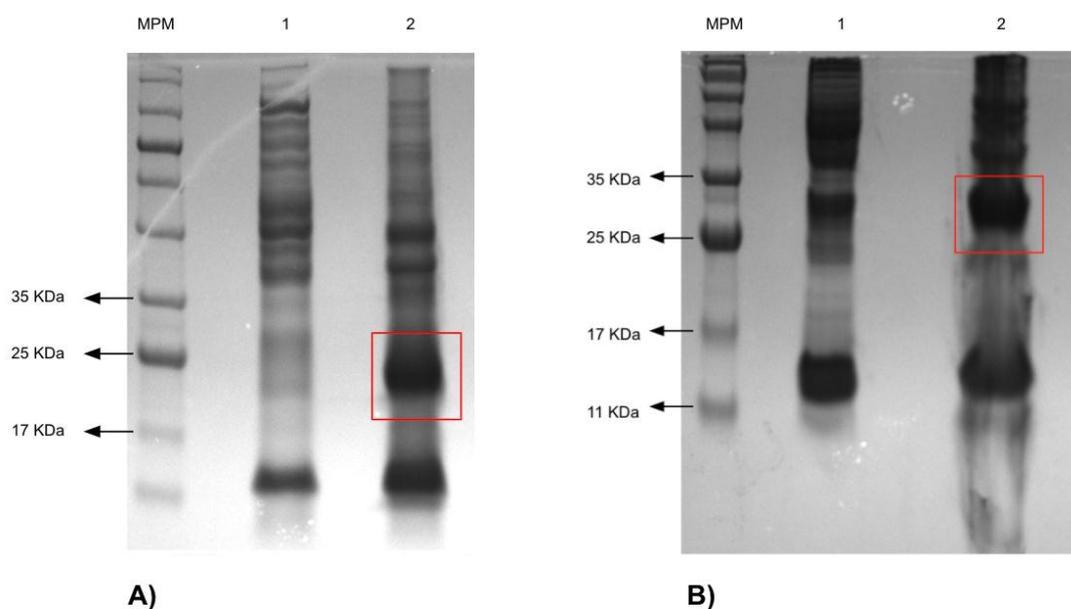


**Figura 12. Análisis de la expresión de BM86 en biorreactor con medio autoinductor mediante SDS-PAGE. MPM:** AccuRuler RGB Prestained Protein Ladder Plus; **1:** FI inducción BL21BM86 Tiempo (t) = 0 h; **2:** FI inducción BL21BM86 Tiempo (t) = 2 h; **3:** FI inducción BL21BM86 Tiempo (t) = 4 h; **4:** FI inducción BL21BM86 Tiempo (t) = 6 h; **5:** FI inducción BL21BM86 Tiempo(t) = 8 h.

Los carriles incluidos del 1 al 5 de la Figura 12, corresponden a las fracciones insolubles de la inducción en los tiempos 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, respectivamente. Desde el carril 2 hasta el 5, en una altura de entre 25 y 35 kDa, se puede observar una banda que aumenta de intensidad a medida que transcurre el tiempo. Teniendo en cuenta el tamaño de BM86, el cual es de 29,8 kDa, se puede deducir que dicha banda corresponde al antígeno mencionado. A su vez, desde el carril 2 al 4, se ve un claro aumento en la intensidad de la banda mencionada producto de la sobreexpresión de la proteína de interés. Sin embargo, entre el carril 4 y 5, no se observa a simple vista una diferencia notoria en el patrón de bandas a pesar de haber transcurrido un tiempo de 2 horas. Igualmente, no se puede asegurar que no existan diferencias en la expresión de BM86, ya que no se realizó la cuantificación proteica pertinente por tratarse de cuerpos de inclusión. Para esto, los mismos deberían ser solubilizados, dializados para eliminar los agentes solubilizantes y posteriormente cuantificados por métodos colorimétricos.

Por otra parte, se debería haber analizado la fracción soluble del cultivo, con el fin de verificar si la proteína también se expresa de manera soluble.

En cuanto a las inducciones a escala fermentador de Subolesina y Subolesina-P0, los resultados se exponen en la Figura 13.



**Figura 13. Análisis de la expresión de Subolesina (A) y Subolesina-P0 (B) en biorreactor con medio autoinductor mediante SDS-PAGE. MPM: A) MPM: AccuRuler RGB Plus Prestained Protein Ladder; 1: Fracción soluble de inducción BL21SUBO; 2: Fracción insoluble de inducción de BL21SUBO (1/5). B) MPM: AccuRuler RGB Plus Prestained Protein Ladder; 1: Fracción soluble de inducción BL21SUBOP0; 2: Fracción insoluble de inducción de BL21SUBOP0 (1/5)**

Por un lado, en el carril 2 de la Figura 13A, el cual corresponde a la fracción insoluble de la inducción de Subolesina, se logra distinguir una banda que indicaría la sobreexpresión de la proteína en un peso molecular de entre 17 y 25 kDa. Teniendo en cuenta el peso de Subolesina de 18 kDa, se puede decir que el mismo se encuentra dentro del rango mencionado; sin embargo, la banda de interés se encuentra más cercana al peso de 25 kDa que al de 17 kDa. Esto demuestra que la proteína podría presentar un peso levemente mayor al esperado para dicho antígeno.

Este fenómeno, ocurre también para Subolesina-P0. En la Figura 13B donde se exponen las

muestras del cultivo BL21SUBO-P0 inducido a escala fermentador, se observa la sobreexpresión de una proteína en el carril 2, el cual representa la fracción insoluble del cultivo, a una altura levemente mayor a 25 kDa (recuadrada en rojo). Teniendo en consideración que el peso esperado para Subolesina-P0 es de 22 kDa, la banda de sobreexpresión se encuentra en un tamaño ligeramente mayor, tal como sucede también para Subolesina.

Esto se podría explicar debido a que, en esta escala de expresión, las proteínas se podrían encontrar en una mayor concentración, afectando la migración de las mismas en el gel. En adición, se destaca que el tratamiento de las mismas para su siembra en los geles de poliacrilamida con SDS, podría no haber sido suficiente para disociar todas las interacciones proteína-proteína y el alto número de enlaces disulfuro presentes en estos cuerpos de inclusión. La reducción incompleta de estos enlaces, podría hacer que algunos dominios de unión de SDS no estén disponibles para el detergente y como consecuencia existe una migración anormal de las proteínas en el análisis SDS-PAGE (51).

Por los motivos mencionados, se considera que las proteínas sobreexpresadas en las fracciones insolubles de las inducciones corresponden a Subolesina y Subolesina-P0, y por tanto se deduce que dichas proteínas son expresadas también a escala fermentador, en medio autoinductor.

En cuanto a la duración de las fermentaciones, se debe mencionar que se estipuló un tiempo de 16 h con el fin de otorgar la cantidad de tiempo suficiente para la expresión de las proteínas. Sin embargo, dicho parámetro podría ser optimizado si se conociera la velocidad del consumo de glucosa. De esta manera, se podría determinar en qué momento el cultivo comienza a utilizar la lactosa como fuente de carbono (momento en que las proteínas comienzan a expresarse) y posiblemente reducir el tiempo estipulado para la fermentación.

Debido a que las vacunas para uso veterinario usualmente se formulan en PBS (33,52), en esta escala se utilizó como buffer de lisis dicho compuesto con PMSF 1mM. De esta forma, no se requiere una diálisis posterior para el cambio de buffer de las proteínas, en el caso de la formulación de una vacuna con los antígenos trabajados. Aunque hubiese sido adecuado analizar la eficacia de este buffer a escala matraz, se debe aclarar que para analizar la capacidad de lisis del mismo, se utilizaron solamente 200 ml del cultivo proveniente del fermentador.

Como se mencionó en los resultados, la disrupción celular también fue exitosa en esta escala ya que se lograron observar las proteínas de interés en las muestras recolectadas. Esto advierte que los antígenos fueron liberados y por ende las células fueron lisadas. A su vez, en el caso de las fracciones solubles, también se logran visualizar varias bandas correspondientes a distintas proteínas de las bacterias, afirmando que las células lograron ser lisadas correctamente. Dicho esto, se puede concluir que ambos buffers de lisis utilizados en el proyecto son útiles para la disrupción celular. Sin embargo, se prefiere el "B", por el motivo mencionado anteriormente.

Se utilizaron las fracciones insolubles de los cultivos provenientes del fermentador para continuar con los experimentos de purificación, y así obtener los antígenos purificados para su utilización en un Western Blot posterior.

#### **4.5. Purificación de los antígenos**

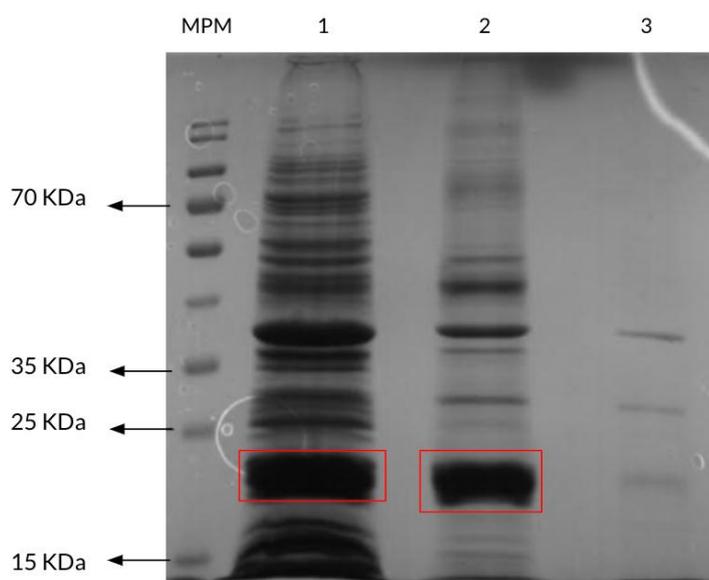
Una vez obtenidos los antígenos en forma de cuerpos de inclusión en las fracciones insolubles de los cultivos, se procedió con la solubilización de los mismos y la purificación de las proteínas de interés mediante IMAC.

Es importante aclarar que las purificaciones de los antígenos se realizaron para obtener los mismos de forma soluble y purificados para su utilización en el Western Blot realizado posteriormente. Dicho esto, se debe mencionar que los antígenos purificados no fueron utilizados para la inmunización de los vacunos como se realizaría en un proceso clásico de fabricación de vacunas. Como se mencionó en la metodología, los bovinos fueron inmunizados con las fracciones insolubles de las inducciones, las cuales contenían los cuerpos de inclusión de las proteínas obtenidas a partir de las fermentaciones en biorreactor. De esta forma se evitan los pasos de solubilización, diálisis y purificación de los antígenos. Igualmente dicho proceso, se encuentra explicado más detalladamente en la sección 4.6.

Tal como fue mencionado en la introducción, está demostrado que los cuerpos de inclusión tienen la capacidad para inducir respuestas celulares antígeno-específicas CD8 + y TCD4 + (20). A su vez, tienen gran estabilidad mecánica y térmica debido a su naturaleza intrínseca de partículas, biocompatibilidad, alto contenido antigénico, baja toxicidad y relativa resistencia a las proteasas. En adición a estas ventajas, se debe comentar que ya se ha probado la inmunización de vacunos con cuerpos de inclusión de BM86 y se obtuvo una respuesta favorable, obteniéndose una disminución del 24% en el número de garrapatas frente al grupo control, y un 77% en la reducción de su capacidad reproductiva (53). Esto demuestra que, al inocular bovinos con la proteína sin purificar, igualmente se logra una alta inmunidad humoral.

Previo a la solubilización y purificación de los antígenos, se realizó un protocolo de lavado de los cuerpos de inclusión de Subolesina, con el fin de analizar si el mismo era eficaz para aislar estos cuerpos de inclusión del resto de las proteínas presentes en el lisado celular.

En la Figura 14, se muestra el resultado del lavado de los cuerpos de inclusión del antígeno mencionado. En el primer carril se observan los cuerpos de inclusión sin lavar, donde existe una banda de gran tamaño en la altura estimada del antígeno, 18 kDa. A su vez, en el carril 2 correspondiente al lavado de los cuerpos de inclusión (FI de la última centrifugación del protocolo), se observa esta misma banda acompañada de menos proteínas que en el carril anterior. Esto demuestra que el lavado realmente es eficiente y aísla notoriamente los cuerpos de inclusión de Subolesina del resto de las proteínas presentes. A su vez, se confirma que la proteína de interés no se pierde en el proceso ya que una cantidad apenas perceptible de la misma se observa de forma solubilizada en el sobrenadante de la centrifugación mencionada (carril 3).



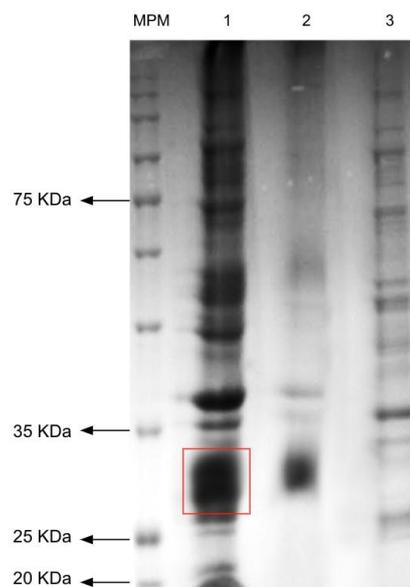
**Figura 14. Análisis del lavado de los cuerpos de inclusión de Subolesina en SDS-PAGE.** MPM: PageRuler Prestained Protein Ladder #26616; **1:** Fracción insoluble (FI) de Inducción de BL21SUBO; **2:** FI del lavado de Subolesina; **3:** Fracción Soluble del lavado de Subolesina.

Posteriormente, los cuerpos de inclusión fueron solubilizados, tanto los que se lavaron previamente (Subolesina) como los que no (BM86 y Subolesina-P0). Dicha solubilización se llevó a cabo con un buffer conteniendo entre otros componentes, urea 6M. La urea, es un agente caotrópico, que a altas concentraciones, desnaturaliza las proteínas, y por ende contribuyen a la solubilización de los cuerpos de inclusión (54, 55).

Luego del agregado del buffer de solubilización, se realizó una centrifugación con el propósito de que las proteínas que lograron solubilizarse, quedaran retenidas en el sobrenadante. Puesto que el buffer en el cual se encontraban dichas proteínas contenía urea, se realizó un cambio de buffer mediante diálisis para eliminar este agente. Este paso es necesario para que ocurra el replegamiento de las proteínas a su forma nativa, y el método normalmente utilizado, es la diálisis (54, 55). Luego de este procedimiento, los antígenos de interés pasaron a estar en PBS 1X, buffer utilizado para la lisis celular. Una vez hecho esto, se realizó una IMAC para la purificación de los antígenos mediante la cola de histidinas que cada uno presenta.

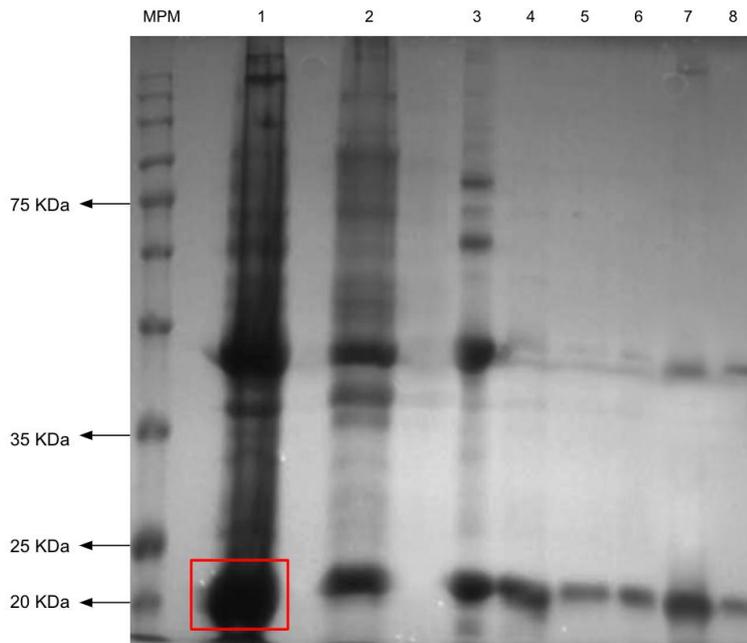
En la Figura 15, se observa el resultado de la solubilización de los cuerpos de inclusión de BM86. En el carril 1 se muestra la fracción insoluble de la inducción, donde se puede observar sobreexpresión de proteínas a una altura de entre 25 y 35 kDa, coincidiendo aproximadamente con el peso esperado para dicho antígeno de 29,8 kDa. A su vez, en el carril 3, se puede distinguir una tenue banda que podría corresponder al antígeno BM86 solubilizado. Estos resultados son complementarios con los observados en el carril 2, donde se distingue la presencia de nuestra proteína, por lo que una gran cantidad de ella no logro ser solubilizada mediante el protocolo aplicado.

Al obtener poca cantidad de BM86 de forma solubilizada, los pasos posteriores de purificación no fueron aplicados para este antígeno.



**Figura 15. Análisis de la solubilización de BM86 en SDS-PAGE.** MPM: AccuRuler RGB Plus Prestained Protein Ladder #02102; **1:** Fracción insoluble (FI) inducción BM86; **2:** FI del solubilizado BM86; **3:** Solubilizado BM86.

Por otra parte, en las Figuras 16 y 17 se observan las muestras correspondientes a las solubilizaciones y purificaciones por IMAC de Subolesina y Subolesina-P0 respectivamente.

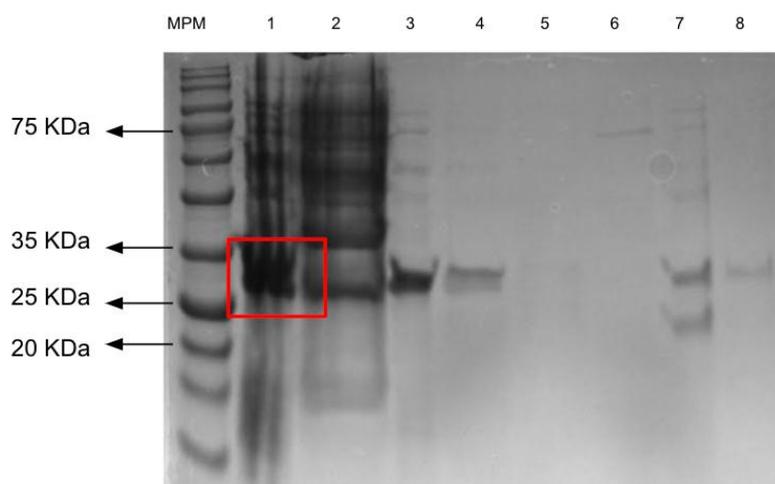


**Figura 16. Análisis de la solubilización y purificación por IMAC de Subolesina en SDS-PAGE.** MPM: AccuRuler RGB Plus Prestained Protein Ladder #02102; 1: Fracción Insoluble (FI) inducción Subolesina; 2: FI del solubilizado Subolesina; 3: Solubilizado Subolesina; 4: Percolado; 5: Lavado IMAC; 6: Eluido 20mM Imidazol; 7: Eluido 250mM Imidazol; 8: Eluido 500 mM Imidazol.

En la Figura 16, correspondiente a las muestras de Subolesina, se observa una expresión de la proteína en el carril 1, donde se encuentra la FI de la inducción de este antígeno. La banda a la cual se hace referencia se encuentra en un peso de entre 20 y 25 kDa, tal como ocurre en la Figura 13A (inducción de Subolesina en fermentador). A su vez, se logra visualizar una banda en el tamaño esperado para Subolesina en el carril 3, correspondiente a la solubilización, demostrando que este proceso fue logrado para esta proteína. A pesar de esto, la proteína también se logra ver en la fracción insoluble de la solubilización (carril 2), representando que el proceso de solubilización fue exitoso, pero no completo, ya que no toda la proteína obtenida queda en el sobrenadante de manera soluble.

Por otra parte, analizando los carriles correspondientes a los eluidos, se distingue que la banda correspondiente a Subolesina se encuentra presente en todos ellos, obteniéndose a simple vista, una mayor cantidad de la misma en el eluido con 250 mM de Imidazol. En todos los casos, se distingue que la proteína de interés se obtiene casi completamente aislada del resto de proteínas presentes en la fracción insoluble, y por tanto el proceso es eficaz para su purificación. A pesar de esto, el proceso no es completamente exitoso ya que en los eluidos también se logra distinguir una proteína de mayor peso molecular que la de interés, la cual se observa también en las demás fracciones. Este fenómeno suele ocurrir cuando se expresan proteínas recombinantes en la cepa *E.coli*, la cual contiene proteínas con histidinas en sus secuencias aminoacídicas. Se ha reportado que por más que dichos aminoácidos no se encuentren ubicados de manera consecutiva, los mismos en ocasiones son capaces de unirse al níquel de la matriz cromatográfica. Este inconveniente podría superarse mediante la utilización de otro tipo de cromatografía, como de exclusión molecular, o de afinidad por anticuerpos (56). Sin embargo, para la producción de vacunas veterinarias, en muchos casos no es necesaria la alta pureza de los antígenos ya que los mismos posteriormente se suplementan con adyuvantes que contienen lisados bacterianos, como el Adyuvante completo de Freund (57, 58).

Por otra parte, en la Figura 17, se observa una SDS-PAGE con muestras correspondientes a la solubilización y purificación de Subolesina-P0.



**Figura 17. Análisis de la solubilización y purificación por IMAC de Subolesina-P0 en SDS-PAGE.** MPM: AccuRuler RGB Plus Prestained Protein Ladder #02102; 1: Fracción insoluble (FI) de inducción Subolesina-P0; 2: FI del solubilizado Subolesina-P0; 3: Solubilizado Subolesina-P0; 4: Percolado IMAC; 5: Lavado IMAC; 6: Eluido 20mM Imidazol; 7: Eluido 250mM Imidazol; 8: Eluido 500 mM Imidazol.

En relación a las muestras de Subolesina-P0, en el carril 1 de la Figura 17, donde se expone la muestra de la fracción insoluble de la inducción del cultivo, se logra distinguir una banda de sobreexpresión, en un tamaño de entre 25 y 35 kDa al igual que en la Figura 13B. Dicha banda, también se observa en el carril 3, correspondiente a la solubilización de la proteína, y con una menor intensidad en el carril 2, el cual corresponde a la fracción insoluble de la solubilización. Por lo tanto, al igual que lo que sucede con Subolesina, la solubilización ocurrió pero no completamente.

Por otra parte, en los carriles 7 y 8 de la Figura 17 (eluido 250 mM de Imidazol y 500 mM de Imidazol respectivamente), se observan bandas en la misma altura a la mencionada en el carril 1. Esto evidencia la presencia de cola de histidinas en dicha proteína, y por tanto la banda mencionada podría corresponder a P0. A su vez, también se puede deducir que la concentración más eficiente para el eluido de esta es de 250 mM (carril 7), ya que es en la fracción donde se observa una banda de mayor intensidad si se compara con el carril 8 (500 mM), y el 6 (20 mM). Sin embargo, en el carril 7, se observa una banda de menor tamaño que nuestra proteína de interés, por lo que, tal como sucede con Subolesina, la proteína no se obtiene 100% pura.

Desde una perspectiva general, se deduce que se debe optimizar el proceso de purificación, ya que se obtuvieron resultados prometedores, pero no exitosos completamente. En primer lugar, se destaca que BM86 se solubilizó en menor medida que los demás antígenos y por ende no se purificó. Sin embargo, dicho proceso fue más eficiente para Subolesina-P0 y Subolesina, que aunque no se solubilizaron completamente, se obtuvo cantidad soluble suficiente para su purificación. Las diferencias en los resultados obtenidos de las solubilizaciones de los distintos antígenos, puede explicarse por el hecho de que las condiciones óptimas para la solubilización son específicas de cada proteína y deben determinarse para cada caso particular. Existen diferentes variantes que se pueden analizar para encontrar las condiciones ideales de solubilización de una proteína, como la composición del buffer de solubilización, la temperatura y tiempo de incubación, la concentración del agente solubilizante, y la cantidad de proteína a solubilizar (59). Dicho esto, se deberían de optimizar las condiciones de solubilización para los tres antígenos.

Por otro lado, el paso del lavado demuestra ser exitoso en sí mismo, ya que los cuerpos de inclusión de Subolesina se obtienen aislados de muchas proteínas obtenidas en la fracción insoluble de la inducción, y por tanto este protocolo se podría tener en cuenta en caso de la inmunización de bovinos con los cuerpos de inclusión lavados, y no con la fracción insoluble, tal como fue realizado.

Por otro lado, se deben optimizar las condiciones establecidas para el protocolo de las cromatografías, ya que se obtuvieron las proteínas de interés en los percolados, y a su vez, Subolesina fue detectada también en el lavado y en el eluido con 20mM de Imidazol. Esto se podría mejorar variando distintos factores, dentro de los cuales se destacan la composición del buffer utilizado, el tiempo de incubación de la matriz con la muestra, o la capacidad de la matriz utilizada (60).

En cuanto a las obtenciones de Subolesina y Subolesina-P0 en los eluidos de las columnas, se puede concluir que dichas proteínas presentan las colas de histidinas que se esperaban para las mismas. Dicho esto, se podría considerar que las proteínas sobreexpresadas coinciden con las de interés. Sin embargo, para afirmar lo mencionado con una certeza, se podría realizar una espectrometría de masas de las muestras. Con dicha técnica, los péptidos que conforman las proteínas, los cuales se obtienen mediante la incubación con tripsina de las muestras, son analizados y separados según su relación masa/carga. Mediante la comparación de los resultados con un estándar, es posible confirmar la identidad de las proteínas de las muestras estudiadas (61).

#### **4.6 Análisis de sueros provenientes de bovinos inmunizados con los antígenos de interés**

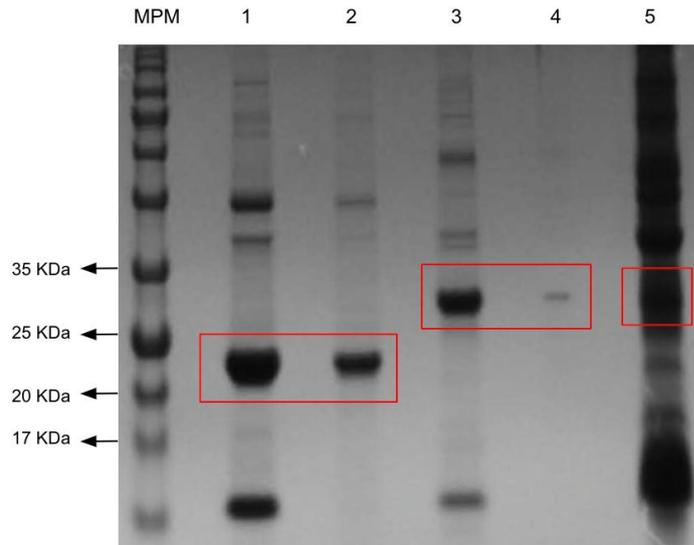
Con el fin de analizar la inmunogenicidad de los antígenos expresados, se inmunizaron vacunos con las fracciones insolubles de las inducciones conteniendo cuerpos de inclusión de BM86, Subolesina y Subolesina-P0 tanto por separado, como con los tres antígenos en una misma formulación. A su vez, como control se inoculó PBS+Adyuvante, ya que dichos componentes también se encontraban en todas las formulaciones inyectadas.

Los animales fueron inoculados los días 0, 20 y 40, y sangrados los días 0, 20, 40 y 60. El sangrado del día 0, realizado previo a la primera inmunización, se utilizó como control y se le denominó "control sin inmunizar".

Los sueros obtenidos en los diferentes días, fueron analizados mediante las técnicas Western Blot y ELISA con el fin de detectar la presencia de anticuerpos específicos contra los antígenos de interés.

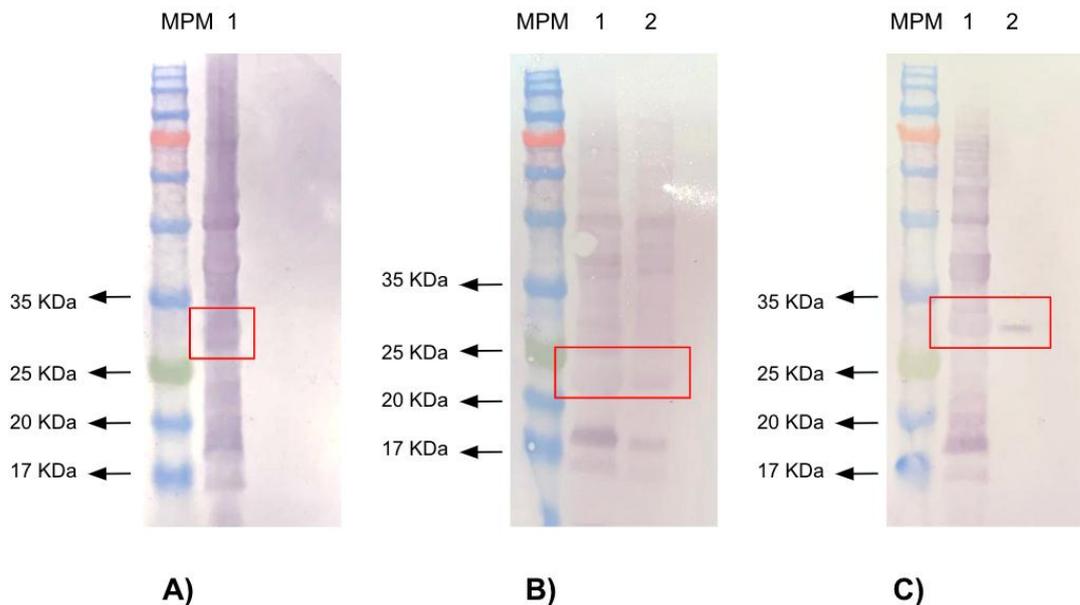
##### **4.6.1. Análisis de sueros mediante Western Blot**

Con el propósito de verificar la presencia de anticuerpos específicos contra nuestros antígenos de interés, se analizaron los sueros obtenidos del día 60 (40 para Subolesina) mediante Western Blot. Para llevar a cabo esta técnica se corrieron muestras de las fracciones insolubles y los antígenos purificados tal como se muestra en la Figura 18. Puesto que el antígeno BM86 no logró ser purificado mediante IMAC, en dicho caso solo se analizó la muestra de la fracción insoluble de la correspondiente inducción.



**Figura 18. Muestras utilizadas para el Western Blot visualizadas en SDS-PAGE.** MPM: AccuRuler RGB Plus Prestained Protein Ladder #02102; 1: Fracción insoluble (FI) de inducción Subolesina; 2: Subolesina purificada mediante IMAC; 3: Fracción insoluble (FI) de inducción Subolesina-P0; 4: Subolesina-P0 purificada mediante IMAC; 5: Fracción insoluble (FI) de inducción BM86.

En la Figura 19, se observan las membranas de nitrocelulosa obtenidas a partir del Western Blot.



**Figura 19. Western Blot para la detección de anticuerpos contra BM86 (A), Subolesina (B) y Subolesina-P0 (C).** A) MPM: AccuRuler RGB Plus Prestained Protein Ladder #02102; 1: Fracción insoluble (FI) de BM86; B) MPM: AccuRuler RGB Plus Prestained Protein Ladder #02102; 1: Fracción insoluble (FI) de inducción Subolesina; 2: Subolesina purificada mediante IMAC; C) MPM: AccuRuler RGB Plus Prestained Protein Ladder #02102 1: Fracción insoluble (FI) de inducción Subolesina-P0; 2: Subolesina-P0 purificada mediante IMAC.

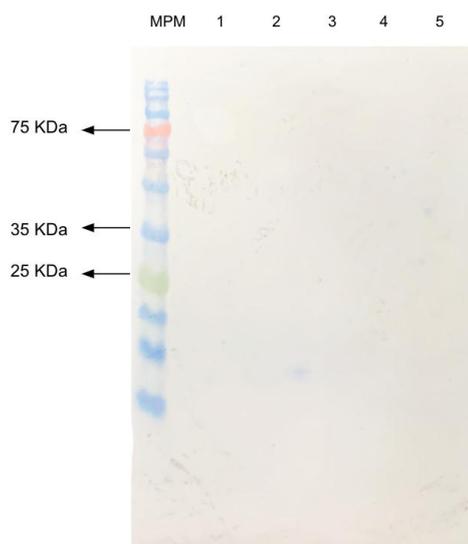
En el patrón de bandas correspondiente a la muestra de BM86 (Figura 19A), se distingue una banda ubicada a la altura esperada para este antígeno (recuadrada en rojo).

Por otro lado, en la Figura 19 B y C, correspondientes a las muestras de Subolesina y Subolesina-P0 respectivamente, se logran observar bandas a la altura de los tamaños esperados para cada antígeno en las fracciones insolubles y purificadas (recuadradas en rojo).

Estos resultados demuestran la presencia de anticuerpos específicos contra nuestros antígenos en los sueros de los bovinos inmunizados. A su vez, en el caso de Subolesina y Subolesina-P0, estos anticuerpos reconocen nuestras proteínas tanto cuando las mismas se encuentran purificadas, como en forma de cuerpos de inclusión. De esta manera, a partir de la inoculación de los vacunos con los cuerpos de inclusión sin purificar, se obtienen resultados alentadores, ya que los anticuerpos obtenidos reconocen también a las proteínas purificadas.

A su vez, al inocular los animales con las fracciones insolubles de los cultivos, las cuales además de nuestros antígenos de interés, contienen otras proteínas presentes en *E.coli*, es de esperar que se generen anticuerpos contra las mismas. Esto se evidencia en los resultados del Western Blot, mediante el reconocimiento de otras proteínas además de las de interés, por parte de los anticuerpos presentes en el suero.

Al observar los controles presentes en la Figura 20, correspondientes a las muestras séricas de los bovinos obtenidas previo a la primera inmunización (Control sin inmunizar), no se observa reconocimiento de proteínas en ninguna de las fracciones. A partir de este resultado, se podría deducir que no hay presencia de anticuerpos en los sueros vacunos contra las muestras inoculadas, previo a las inmunizaciones.



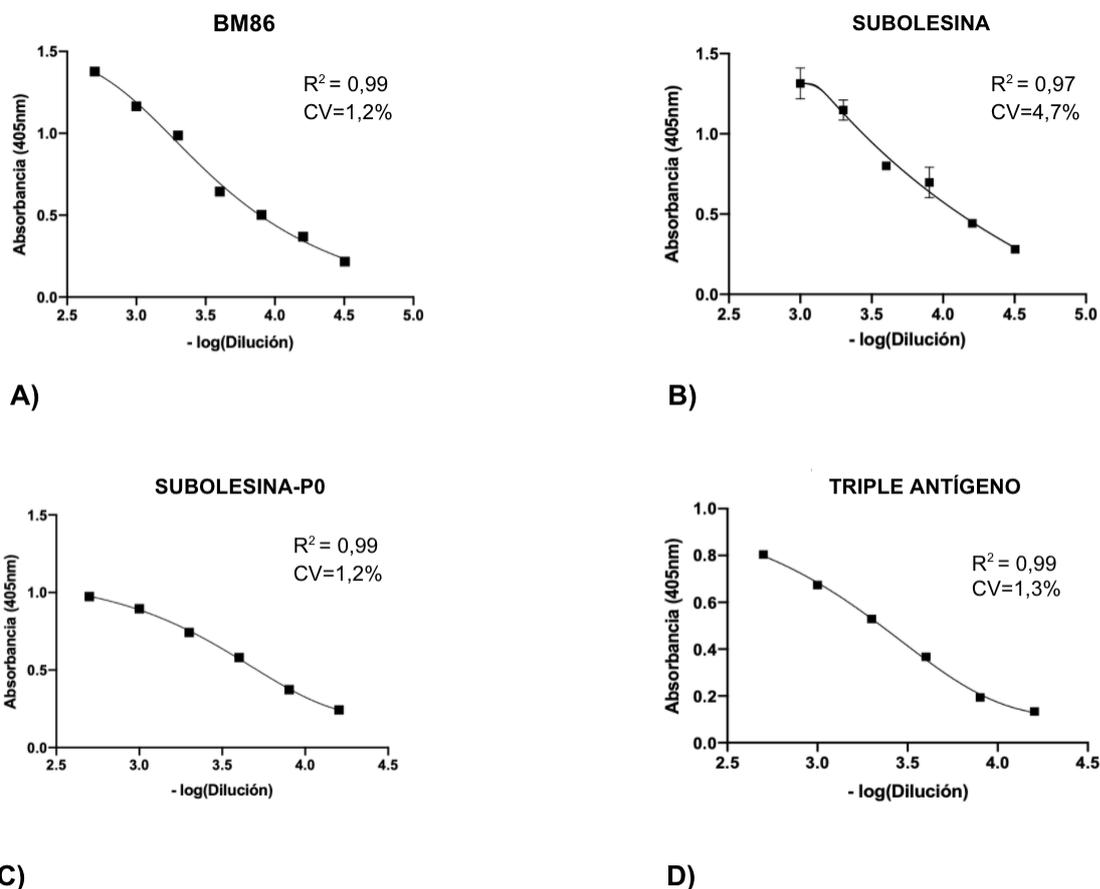
**Figura 20. Western Blot con muestras séricas del Control sin inmunizar:** MPM: AccuRuler RGB Plus Prestained Protein Ladder #02102; 1: Fracción insoluble (FI) de inducción Subolesina; 2: Subolesina purificada mediante IMAC; 3: Fracción insoluble (FI) de inducción Subolesina-P0; 4: Subolesina-P0 purificada mediante IMAC; 5: Fracción insoluble (FI) de inducción BM86.

En conclusión, los resultados obtenidos a partir del Western Blot, confirman que existen anticuerpos en los sueros bovinos, que reconocen nuestras proteínas de interés, tanto en forma de cuerpos de inclusión como purificadas.

#### 4.6.2. Análisis de sueros mediante ELISA

Para tener un resultado semicuantitativo de los resultados obtenidos en el Western Blot, se realizó un ELISA con los sueros provenientes de las inmunizaciones con BM86, Subolesina, Subolesina-P0 y con los tres en simultaneo (Triple antígeno). A su vez, como controles se analizaron los sueros correspondientes a las inoculaciones con PBS+Adyuvante, y los del Control sin inmunizar (sangrado previo a la primera inmunización, día 0).

En la figura 21 se observan los gráficos correspondientes a los sueros de tiempo final (Día 60), donde se graficó la absorbancia (405 nm) en función del logaritmo negativo de las diluciones de los sueros. Dichos datos se encuentran graficados de esta manera, para obtener una curva sigmoidal asimétrica, cuyo ajuste es el recomendado para los inmunoensayos (62).



**Figura 21. Niveles de anticuerpos obtenidos de los sueros vacunos (tiempo final) determinados por ELISA. A)** Absorbancia (405 nm) vs. Respuesta inmune de vacunos inmunizados con BM86. **B)** Absorbancia (405 nm) vs. Respuesta inmune de vacunos inmunizados con Subolesina. **C)** Absorbancia (405 nm) vs. Respuesta inmune de vacunos inmunizados con Subolesina-P0. **D)** Absorbancia (405 nm) vs. Respuesta inmune de vacunos inmunizados con los tres antígenos. CV: Coeficiente de variación.

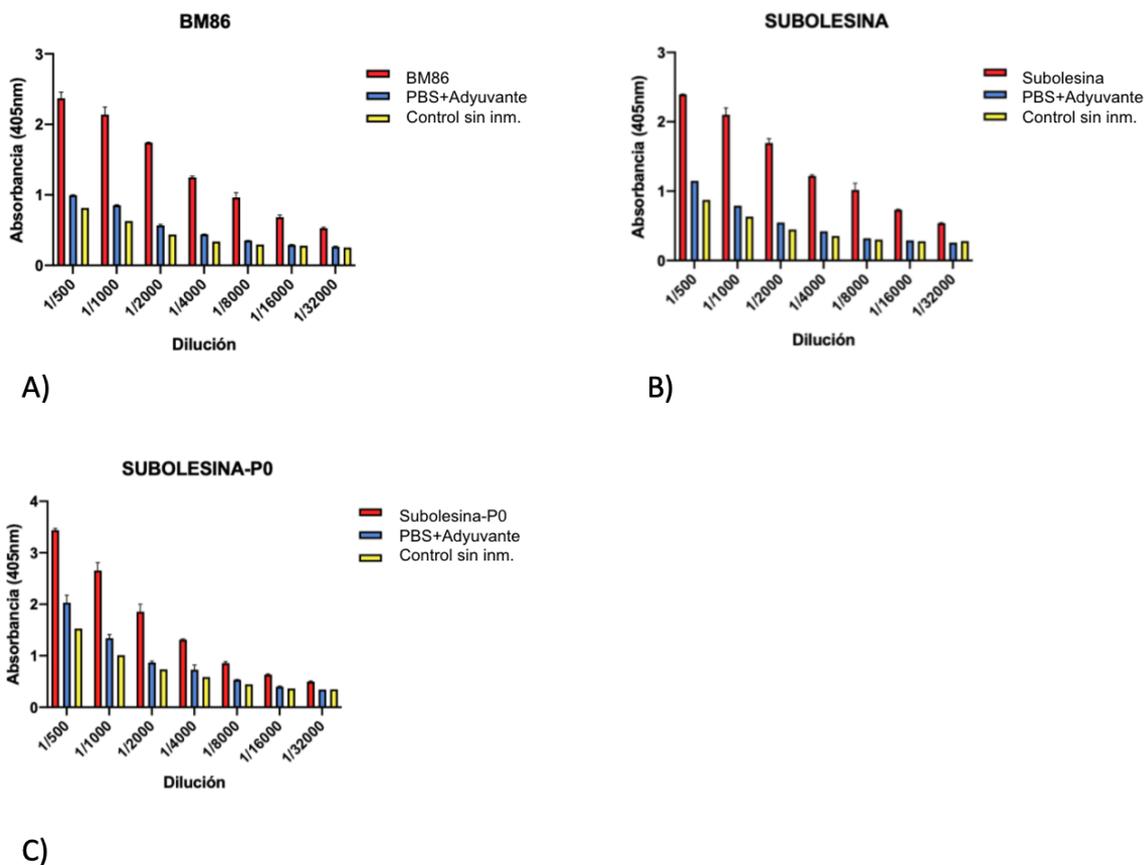
En todos los casos se obtienen señales de absorbancia que indicarían un reconocimiento por parte de los anticuerpos presentes en los sueros, de las proteínas presentes en las fracciones insolubles inoculadas. A partir de los resultados provenientes del Western Blot, se puede concluir que parte de las señales obtenidas de los ELISA, provienen del reconocimiento de las proteínas de interés.

Como se observa, BM86 y Subolesina, alcanzan una OD cercana a 1,5 en la dilución sérica mayor, Subolesina-P0 obtuvo una OD de 1 y la inmunización con los tres antígenos en simultáneo, alcanzó una OD de 0,8 en su mayor dilución. Dichos valores se encuentran dentro del rango confiable de absorbancias, el cual va de 0 a 3 para el equipo utilizado (63).

Como se mencionó anteriormente, el mejor ajuste de las gráficas obtenidas a partir de las diluciones de los sueros, corresponde a una función sigmoïdal asimétrica, con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) mayor a 0,99 para las gráficas correspondientes a BM86, Subolesina-P0 y Triple antígeno, y de 0,97 para Subolesina. Teniendo en consideración que para que un ajuste sea lo suficientemente bueno debe ser mayor a 0,99, ya que 1 significaría un ajuste perfecto, el ajuste de la gráfica correspondiente a Subolesina debería mejorarse (62).

En cuanto al coeficiente de variación (CV) (desvío estándar sobre la media) se obtuvieron valores menores al 5% en todos los casos, siendo de 4,7 el valor más alto obtenido, el cual corresponde a Subolesina. Dicho esto, se considera que este ensayo fue consistente entre los duplicados y que la precisión intraensayo fue aceptable debido a que los resultados fueron menores al 10% (62).

Los controles realizados a partir de los sueros obtenidos del control sin inmunizar, y los de la inoculación con PBS+Adyuvante, se comparan en la Figura 22. En esta oportunidad se graficaron las absorbancias en función de las diluciones en un gráfico de barras. Este tipo de gráfico fue elegido para una comparación entre las señales obtenidas de los sueros en cada dilución.



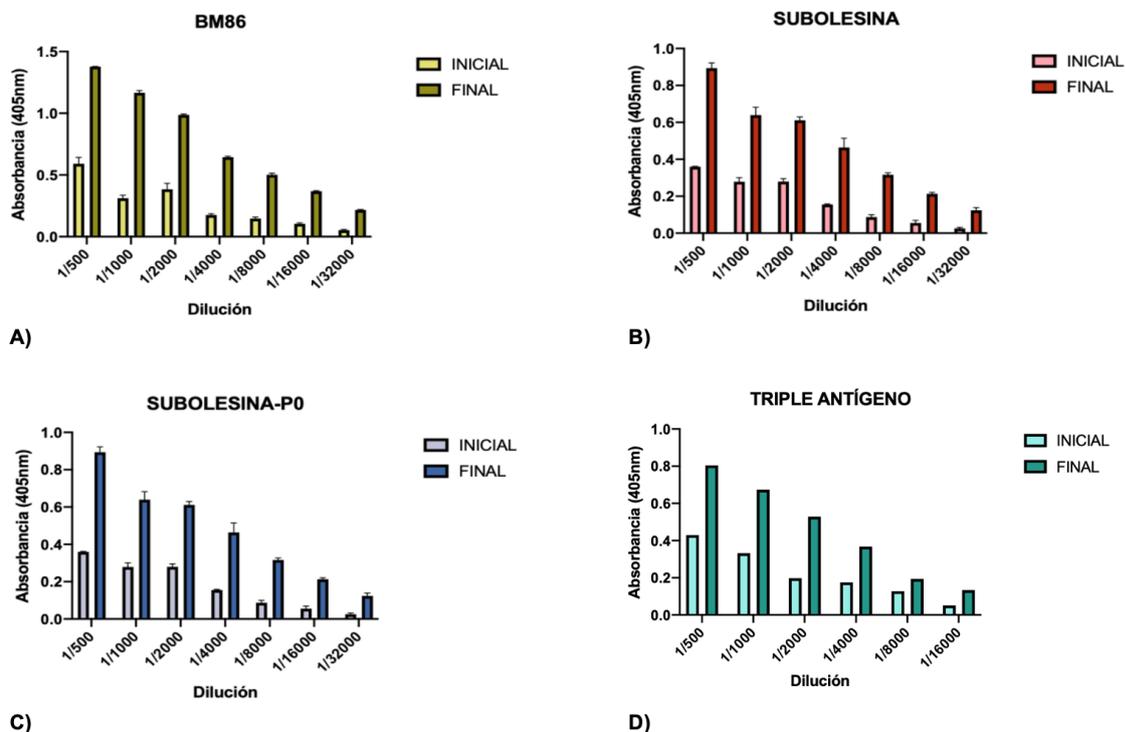
**Figura 22. Niveles de anticuerpos obtenidos de los sueros control determinados por ELISA. A)** Absorbancia (405 nm) vs. Respuesta inmune de vacunos inmunizados con BM86. **B)** Absorbancia (405 nm) vs.

Respuesta inmune de vacunos inmunizados con Subolesina. **C)** Absorbancia (405 nm) vs. Respuesta inmune de vacunos inmunizados con Subolesina-P0.

Como se puede observar, en todas las gráficas de la Figura 22, existe una similitud entre las señales de los sueros control comparados en cada dilución. En promedio, entre ambos controles existe una diferencia del 15%, siendo en todos los casos, la absorbancia mayor para el caso del PBS+Adyuvante. Estos resultados pueden deberse a que en ningún caso se inocularon los antígenos de interés, por lo tanto, sería esperable que ambos controles tuvieran señales similares. A su vez, los valores obtenidos de los controles, son en todos los casos, menores que los de los sueros provenientes de las inoculaciones de los antígenos. Este resultado comprueba la presencia de anticuerpos contra los mismos en los animales inoculados.

Igualmente, la absorbancia obtenida del control sin inmunizar, demuestra un reconocimiento por parte de los anticuerpos de los sueros, que no fue detectada en el Western Blot. Esto podría deberse a un reconocimiento inespecífico por parte de los anticuerpos, o por una mayor sensibilidad de la técnica de ELISA frente al Western Blot.

En otro orden, con el fin de verificar la efectividad de los refuerzos de inmunización realizados, se compararon los valores de absorbancia de los sueros obtenidos en el día 20 luego de la primera inmunización, con los obtenidos en el día 60 (día 40 para el caso de Subolesina). Dichos resultados se exponen en la Figura 23.



**Figura 23. Comparación de los sueros obtenidos de los sangrados del día 20 (inicial) y 60 (final) (40 para Subolesina) luego de la primera inmunización. A)** Absorbancia (405 nm) vs. Respuesta inmune de los vacunos inoculados con BM86. **B)** Absorbancia (405 nm) vs. Respuesta inmune de los vacunos inoculados con Subolesina. **C)** Absorbancia (405 nm) vs. Respuesta inmune de los vacunos inoculados con Subolesina-P0. **D)** Absorbancia (405 nm) vs. Respuesta inmune de los vacunos inoculados con los tres antígenos.

Tal como se puede observar, en todos los casos el suero final presenta una señal mayor en comparación con el suero inicial, correspondiente al día 20 de la primera inoculación. Estos resultados exponen un incremento en los niveles de anticuerpos de los animales inoculados, luego de los refuerzos de inmunización. Dichos resultados concuerdan con lo esperado, ya que en el día 60, se obtienen sangrados posteriores a tres inmunizaciones (Día 0, 20 y 40) (dos para el caso de Subolesina). Tal como es sabido, la titulación de anticuerpos después de dos o más inmunizaciones con un mismo antígeno, es mayor que en el primer contacto con el mismo, gracias a la memoria inmunológica. Esta característica del sistema inmune, permite el aumento en la frecuencia de células B y T específicas para un antígeno, así como de la diferenciación de los linfocitos específicos en células de memoria, que pueden responder más rápidamente al mismo y a su vez, autorrenovarse (64).

## 5. CONCLUSIONES

Mediante una digestión enzimática, se obtuvieron insertos liberados en los pesos esperados para BM86 y Subolesina-P0. La presencia del inserto de Subolesina, no se logró verificar mediante esta técnica. Se recomienda una secuenciación de los plásmidos para la confirmación de los resultados.

A partir de los resultados obtenidos de las expresiones de los antígenos a escala matraz, se puede concluir que, a efectos de este trabajo, las condiciones elegidas para la inducción de las proteínas son 3 horas a 37°C, con 200 rpm de agitación y 1mM de IPTG en medio LB. Dicha elección corresponde con la obtención de las proteínas en el menor tiempo analizado.

En cuanto a la escala fermentador, se observa que tanto el medio LB con IPTG como el medio autoinductor, son exitosos para la expresión de las proteínas, y por ende se elige el último como el óptimo debido a que significa una disminución en los costos asociados al agente inductor. Por otra parte, se concluye que una fermentación de 16 horas, con 200 rpm de agitación y 25°C, es suficiente para la obtención de las proteínas de interés. Sin embargo, el tiempo de la fermentación se podría optimizar conociendo la tasa de consumo de glucosa.

En ambas escalas de expresión, los antígenos de interés se obtuvieron en las fracciones insolubles en forma de cuerpos de inclusión. El proceso de solubilización aplicado para los mismos logró solubilizar una fracción de las proteínas, obteniéndose cantidad suficiente solamente de Subolesina y Subolesina-P0 para su purificación mediante IMAC. Por medio de la cromatografía, se obtuvieron estos dos antígenos de manera purificada.

Mediante las técnicas de Western Blot y ELISA, se analizaron los sueros de los bovinos inmunizados. Los resultados obtenidos arrojaron la detección de anticuerpos específicos contra los antígenos de interés bajo la forma de cuerpos de inclusión, y contra Subolesina y Subolesina-P0 purificadas. Estos resultados comprueban que la inmunización con cuerpos de inclusión, genera la obtención de anticuerpos contra epítopes de las proteínas solubles y purificadas.

## 6. PERSPECTIVAS

La idea del presente proyecto fue analizar las expresiones de los antígenos BM86, Subolesina y Subolesina-P0 a escala pequeña, con el fin de que los resultados obtenidos sean útiles para escalar este proceso a un nivel industrial, y así llevar a cabo la fabricación de una vacuna contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Dicho esto, como primera perspectiva se debe tener en cuenta la industrialización de los procesos de lisis celular. Se debe analizar de qué forma se pueden sustituir los procesos de sonicado y centrifugaciones a altas velocidades, ya que, a una escala mayor, estas técnicas son difíciles de llevar a cabo por cuestiones de volúmenes de muestra y equipos necesarios. Por ejemplo, analizar el proceso de lisis mediante un molino de perlas, y optimizar el tiempo de las centrifugaciones con el fin de poder disminuir las velocidades aplicadas en este trabajo.

Por otra parte, es importante un análisis más exhaustivo de la inmunidad generada por los antígenos estudiados en bovinos, con el fin de cuantificar los anticuerpos generados y así optimizar la cantidad de antígeno necesario para la vacuna. Se podría también, inmunizar a los bovinos con los antígenos purificados, para verificar si la respuesta inmune es mayor en comparación a la inmunización con cuerpos de inclusión. A su vez, se debe estudiar si dichos anticuerpos generan protección contra las garrapatas.

Por último, se deben estipular los compuestos que formarán parte de la formulación final de la vacuna contra las garrapatas del ganado bovino.

## 7. REFERENCIAS

- 1- Garrapatas del bovino. [Internet]. Argentina: SENASA; [citado 2020 May 16]. Disponible desde: <http://www.senasa.gob.ar/cadena-animal/bovinos-y-bubalinos/produccion-primaria/sanidad-animal/enfermedades-y-estra-sani/garrapatas-del-bovino>
- 2- La garrapata común del ganado. [Internet]. Uruguay: Ministerio de ganadería, agricultura y pesca; [citado 2020 May 16]. Disponible desde: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/garrapata-común-del-ganado>.
- 3- Carriquiry, R. Cinco claves para el control de la garrapata. Plan Agropecuario. [Internet]. [citado 2020 May 16]. Disponible desde: [https://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R158/R\\_158\\_66.pdf](https://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R158/R_158_66.pdf)
- 4- León-Clavijo, M., Hernandez-Rojas, E. Descripción de la proteína Bm86, polimorfismo y su papel como inmunógeno en el ganado bovino infestado por garrapatas. [Internet]. 2012 [citado 2020 May 16]. Disponible desde: <https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/196/392>
- 5- Gutiérrez Osorio, J. D. 2006. Identificación de órganos blancos en garrapatas de la especie *Boophilus microplus* para anticuerpos-antigarrapata de bovinos inducidos por el inmunógeno Tick-Vac MK. del laboratorio Limor de Colombia SA mediante métodos inmunoperoxidasa [tesis de grado]. Bogotá (Colombia): Pontificia Universidad Javeriana.
- 6- Miraballes, C., Riet-Correa, F., Fuellis, C., Araoz, V. CONTROL DE LA GARRAPATA *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Y LA TRISTEZA PARASITARIA. [Internet]. 2018 [citado 2020 May 16]. Disponible desde: <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/8960/1/Revista-inia-52-3.pdf>
- 7- Gómez, R. Ganadería en el Uruguay. [Internet]. Uruguay: INIA; [citado 2020 May 16]. Disponible desde: [http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/ara/ara\\_192.pdf](http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/ara/ara_192.pdf)
- 8- Mestre, P. La importancia del agro en el Uruguay. Rurales EL PAÍS. [Internet]. [citado 2020 May 16]. Disponible desde: <https://rurales.elpais.com.uy/ganaderia/la-importancia-del-agro-en-uruguay>
- 9- Rodríguez-Vivas, R. I., Grisi, L., de León, A. A. P., Villela, H. S., de Jesús Torres-Acosta, J. F., Sánchez, H. F., Carrasco, D. G. Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias. 2017; 8(1), 61-74.
- 10- Rodrigues, D. S., & Leite, R. C. Economic impact of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: estimate of decreased milk production on a dairy farm. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2013; 65(5), 1570-1572.
- 11- Carriquiry, R. Tristeza parasitaria: causas y prevención. Plan Agropecuario. [Internet]. [citado 2020 May 16]. Disponible desde: [https://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R134/R\\_134\\_56.pdf](https://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R134/R_134_56.pdf)

- 12- IMIDOCARBO 120 INJ. [Internet]. Países bajos: Kepro; [citado 2020 May 16]. Disponible desde: <https://www.kepro.nl/es/products/imidocarbo-120-inj/>
- 13- Vicente, D., Pérez-Trallero, E. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica [Internet]. 2010 [citado 2020 May 16]; 28(2), 122-130. Disponible desde: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-tetraciclinas-sulfamidas-metronidazol-S0213005X09005187>
- 14- Ley 18268, 2008. [Internet]. [citado 2020 May 16]. Disponible desde: <https://legislativo.parlamento.gub.uy/temporales/leytemp678998.htm>
- 15- Arrieta, F. PRIMER CURSO INTENSIVO DE CAPACITACIÓN DE VACUNADORES. [Internet]. [citado 2020 May 16]. Disponible desde: <http://www.chlaep.org.uy/descargas/programa-inmunizaciones/curso-intensivo-de-formaciondevacunadores/clasificacionvacunas.pdf>
- 16- Ingredientes de las vacunas. [Internet]. Estados Unidos: Vaccines; 2020 [citado 2020 May 16]. Disponible desde: <https://www.vaccines.gov/es/b%C3%A1sicos/ingredientes-de-vacunas>
- 17- Tipos de vacunas. [Internet]. Estados Unidos: Vaccines; 2020 [citado 2020 May 16]. Disponible desde: <https://www.vaccines.gov/es/b%C3%A1sicos/tipos>
- 18- Ferrer-Miralles, N., Saccardo, P., Corchero, J. L., Xu, Z., García-Fruitós, E. General introduction: recombinant protein production and purification of insoluble proteins. In *Insoluble Proteins*. 2015; pp. 1-24
- 19- Nascimento, I. P., & Leite, L. C. C. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *Brazilian journal of medical and biological research*. 2012; 45(12), 1102-1111.
- 20- Schetters, S. T., Jong, W. S., Kruijssen, L. J., van Sapperoo, H. V. D. B., Engels, S., Unger, W. W., & van Kooyk, Y. Bacterial inclusion bodies function as vehicles for dendritic cell-mediated T cell responses. *Cellular & molecular immunology*. 2020; 17(4), 415-417;
- 21- W. Strohl. Chimeric Genes, Proteins. J.S. Bonde, L. Bülow. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. Amsterdam; 2013; 519-520.
- 22- Chen, X., Zaro, J. L., & Shen, W. C. Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Advanced drug delivery reviews*. 2013; 65(10), 1357-1369.
- 23- De la Fuente, J., & Contreras, M. Tick vaccines: current status and future directions. *Expert review of vaccines*. 2015; 14(10), 1367-1376.
- 24- Peconick, A. P., Sossai, S., Girao, F. A., Rodrigues, M. Q. R. B., e Silva, C. S., Vargas, M. I., & Patarroyo, J. H. Synthetic vaccine (SBm7462) against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: preservation of immunogenic determinants in different strains from South America. *Experimental Parasitology*. 2008; 119(1), 37-43.

- 25- Schetters, T. P. M., & Jansen, T. Vaccine against Rhipicephalus ticks. U.S. Patent No. 9, 579, 369. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office; 2017.
- 26- De la Fuente, J., Maritz-Olivier, C., Naranjo, V., Ayoubi, P., Nijhof, A. M., Almazán, C., Kocan, K. M. Evidence of the role of tick subolesin in gene expression. *BMC genomics*, 2008; 9(1), 372.
- 27- Moreno-Cid, J. A., de la Lastra, J. M. P., Villar, M., Jiménez, M., Pinal, R., Estrada-Peña, A., & SUB/AKR Vaccine Study Group. Control of multiple arthropod vector infestations with subolesin/akirin vaccines. *Vaccine*. 2013; 31(8), 1187-1196.
- 28- Rodríguez-Mallon, A., Encinosa, P. E., Méndez-Pérez, L., Bello, Y., Fernández, R. R., Garay, H., & Estrada, M. P. High efficacy of a 20 amino acid peptide of the acidic ribosomal protein P0 against the cattle tick, Rhipicephalus microplus. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2015; 6(4), 530-537
- 29- Rodríguez-Mallon, A., Fernández, E., Encinosa, P. E., Bello, Y., Méndez-Pérez, L., Ruiz, L. C., & Estrada, M. P. A novel tick antigen shows high vaccine efficacy against the dog tick, Rhipicephalus sanguineus. *Vaccine*. 2012; 30(10), 1782-1789.
- 30- Swaminathan, A., Lucas, R. M., Dear, K., & McMichael, A. J. Keyhole limpet haemocyanin—a model antigen for human immunotoxicological studies. *British journal of clinical pharmacology*. 2014; 78(5), 1135-1142.
- 31- Sossai, S., Peconick, A. P., Sales-Junior, P. A., Marcelino, F. C., Vargas, M. I., Neves, E. S., & Patarroyo, J. H. Polymorphism of the bm86 gene in South American strains of the cattle tick Boophilus microplus. *Experimental & applied acarology*. 2015; 37(3-4), 199-214.
- 32- Mallon, A. R., Díaz, E. F., Garcia, M. P. E., & González, Y. C. Vaccine composition for controlling ectoparasite infestations. U.S. Patent No. 9,085,634. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office; 2015.
- 33- Fonseca, L., Alcides, M. 2015. Expresión de la proteína recombinante Bm86uy-r y evaluación de su respuesta inmune humoral en bovinos inmunizados [tesis de grado]. Montevideo (Uruguay): Facultad de veterinaria, UDELAR.
- 34- Velázquez Terra, R., Otegui Riccetto, M. A. 2016. Caracterizar el modelo de infección artificial de Rhipicephalus (Boophilus) microplus en bovinos y determinación de la eficacia ectoparasiticida de una formulación de Ivermectina 3, 15% larga acción [tesis de grado]. Montevideo (Uruguay): Facultad de veterinaria, UDELAR.
- 35- Shakya, M., Kumar, B., Nagar, G., de la Fuente, J., & Ghosh, S. Subolesin: A candidate vaccine antigen for the control of cattle tick infestations in Indian situation. *Vaccine*. 2014; 32(28), 3488-3494.
- 36- Panfilo Dohir, M., & Urruty Bernadet, M. E. Expresión recombinante de antígenos candidatos para el desarrollo de una nueva vacuna contra especies nativas de garrapatas para el ganado bovino; 2018.

- 37- BIOSTAT® A Su inicio profesional en el cultivo celular y fermentación microbiana. [Internet]. Alemania: SARTORIUS; [citado 2020 Dic 18]. Disponible desde: <https://www.sartorius.com/download/122524/6/broch-biostat-a-sbi1518es-data.pdf>
- 38- Rapid and efficient purification and refolding of a (histidine) 6 -tagged recombinant protein produced in *E. coli* as inclusion bodies. [Internet]. Estados Unidos: GE Healthcare; [citado 2020 Dic 18]. Disponible desde: <https://www.cytivalifesciences.co.jp/catalog/pdf/18113437ac.pdf>
- 39- NEB® 5-alpha Competent *E. coli* (Subcloning Efficiency). [Internet]. Estados Unidos: NEB; [citado 2020 Dic 18]. Disponible desde: <https://international.neb.com/products/c2988-neb-5-alpha-competent-e-coli-subcloning-efficiency#Product%20Information>
- 40- Transformation/Transfection Competent Cells. Novagen. [Internet]. 2003; [citado 2020 Dic 18]. Disponible desde: <http://wolfson.huji.ac.il/expression/procedures/bacterial/novagen-CompCells.pdf>
- 41- MilliporeSigma™ Novagen™ Rosetta-gami™ B (DE3) pLysS Competent Cells. [Internet]. Estados Unidos: Fisher Scientific; [citado 2020 Dic 18]. Disponible desde: <https://www.fishersci.com/shop/products/emd-millipore-novagen-rosetta-gami-b-de3-plyss-competent-cells-2/p-7020089>
- 42- BL21(DE3) Competent *E. coli*. [Internet]. Estados Unidos: NEB; [citado 2020 Dic 18]. Disponible desde: <https://www.neb.com/products/c2527-bl21de3-competent-e-coli#Product%20Information>
- 43- Li, Z., & Rinas, U. Recombinant protein production associated growth inhibition results mainly from transcription and not from translation. *Microbial cell factories*. 2020; 19, 1-11
- 44- x-Kelley, K. D., Olive, L. Q., Hadziselimovic, A., & Sanders, C. R. Look and see if it is time to induce protein expression in *Escherichia coli* cultures. *Biochemistry*. 2010; 49(26), 5405-5407
- 45- Gutiérrez-González, M., Farías, C., Tello, S., Pérez-Etcheverry, D., Romero, A., Zúñiga, R., & Molina, M. C. Optimization of culture conditions for the expression of three different insoluble proteins in *Escherichia coli*. *Scientific reports*. 2019; 9(1), 1-11.
- 46- Marston FA. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem J*. 1986; 240:1- 12
- 47- E. Coli Culture for Protein Expression. [Internet]. California (Estados Unidos): University of San Diego; [citado 2020 Dic 18]. Disponible desde: <http://home.sandiego.edu/~josephprovost/E.%20Coli%20protein%20expression%20protocol.pdf>
- 48- Ingledew, W. M. M., & Lin, Y.-H. Ethanol from Starch-Based Feedstocks. *Comprehensive Biotechnology*. 2011; 37–49.

- 49- Li, Z., Kessler, W., van den Heuvel, J., & Rinas, U. Simple defined autoinduction medium for high-level recombinant protein production using T7-based *Escherichia coli* expression systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011; 91(4), 1203-1213.
- 50- Joseph, B. C., Pichaimuthu, S., Srimeenakshi, S., Murthy, M., Selvakumar, K., Ganesan, M., & Manjunath, S. R. An overview of the parameters for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Cell Science & Therapy*. 2015; 6(5), 1.
- 51- Rodríguez Mallón, A., Javier González, L., Encinosa Guzmán, P. E., Bechara, G. H., Sanches, G. S., Pousa, S., & Estrada, M. P. Functional and mass spectrometric evaluation of an anti-tick antigen based on the P0 peptide conjugated to Bm86 protein. *Pathogens*. 2020; 9(6), 513.
- 52- Hope, M., Jiang, X., Gough, J., Cadogan, L., Josh, P., Jonsson, N., & Willadsen, P. Experimental vaccination of sheep and cattle against tick infestation using recombinant 5'-nucleotidase. *Parasite immunology*. 2010; 32(2), 135-142.
- 53- Rand, K. N., Moore, T., Sriskantha, A., Spring, K., Tellam, R., Willadsen, P., & Cobon, G. S. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Proceedings of the national academy of sciences*. 1989; 86(24), 9657-9661.
- 54- Singh, A., Upadhyay, V., & Panda, A. K. Solubilization and refolding of inclusion body proteins. *Insoluble proteins*. 2015; 283-291.
- 55- Clark, E. D. B. Refolding of recombinant proteins. *Current Opinion in Biotechnology*. 1998; 9(2), 157-163.
- 56- Robichon, C., Luo, J., Causey, T. B., Benner, J. S., & Samuelson, J. C. Engineering *Escherichia coli* BL21 (DE3) derivative strains to minimize *E. coli* protein contamination after purification by immobilized metal affinity chromatography. *Applied and environmental microbiology*. 2011; 77(13), 4634-4646.
- 57- Morris Quevedo, H. J., Martínez Manrique, C., Abdala Díaz, R. T., Campos Orama, D. Adyuvantes inmunológicos. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 1999; 18(2), 130-137
- 58- Moreira Jr, C., da Cunha, C. E. P., Moreira, G. M. S. G., Mendonça, M., Salvarani, F. M., Moreira, Â. N., Conceição, F. R. Protective potential of recombinant non-purified botulinum neurotoxin serotypes C and D. *Anaerobe*. 2016; 40, 58-62.
- 59- Lilie, H., Schwarz, E. & Rudolph, R. (1998) Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Current Opinion Biotechnol*. 1998; 9, 497-501.
- 60- Troubleshooting Guide for Affinity Chromatography of Tagged Proteins. [Internet]. Estados Unidos: Sigma Aldrich; [citado 2020 Dic 18]. Disponible desde: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/affinity-chromatography-tagged-proteins/troubleshooting.html>

- 61- Jordana-Lluch, E., Català, E. M., & Ruiz, V. A. La espectrometría de masas en el laboratorio de microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2012; 30(10), 635-644.
- 62- ELISA Guide. [Internet]. Reino Unido: Abcam; [citado 2020 Dic 18]. Recuperado desde: <https://www.abcam.com/protocols/the-complete-elisa-guide>.
- 63- Application Guide for Multimode Readers. [Internet]. Suiza: Tecan Trading AG; [citado 2020 Dic 18]. Disponible desde: <https://www.tecan.com/application-guide-free-download>.
- 64- Castiglione, F., Mantile, F., De Berardinis, P., & Prisco, A. How the interval between prime and boost injection affects the immune response in a computational model of the immune system. *Computational and mathematical methods in medicine* [Internet]. 2012 [citado 2020 Dic 18]; 2012. Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22997539/>

## 8. ANEXOS

### 8.1. Anexo 1: Secuencias codificantes de los antígenos utilizados

#### 8.1.1. Subolesina

ATGGCTTGCGCAACATTAAAGCGGACACATGACTGGGACCCCTTGACAGTCCGAGTGGCAGAT  
CGCCGAAGCGACGCCGATGTATGCCTCTGTCCCCGCCTCCTACAAGGGCGCACCAGATCGATCC  
CTCGCCCTTCGGAGACGTGCCACCAAAGTTGACTTCAGAGGAGATAGCAGCCAACATCCGTGAG  
GAGATGCGACGGCTACAACGGCGCAAGCAGCTCTGTTTCCAGGGCGCTGACCCTGAATCCCAG  
CATAACAGTGGTCTCTCGTCACCAGTGCATCGAGACCAGCCCCTGTTACGTTCCGCCAGGTTG  
GGCTCATTTGCGAACGAATGATGAAGGAGCGAGAGAGCAAGATACGGGAGGAGTATGACCATGT  
GCTATCTACCAAACCTCGCAGAACAGTACGACACATTTGTTAAATTTACCTACGACCAAATTCAGAA  
GCGGTTTGAAGGTGCCACGCCAGCTATTTGTCGTAA

#### 8.1.2 Bm86

TGAAAGTAACCCGAGCAAGGGTAGCTGCGTCTGCGAAGCATCGGACGATCTAACGCTACAATGC  
AAAATTAATAATGACTTCGCAACTGACTGCCGAAACCGAGGTGGCACTGCTAAGTTGCGCACGGA  
TGGGTTTATTGGCGCAACGTGTGACTGTGGTGAATGGGGTGCGATGAACAAGACCACACGGAAC  
TGTGTCCCTACCACGTGTCTTCGTCCCGACTTGACCTGCAAAGACCTCTGCGAGAAAAACCTGCT  
TCAAAGGGATTCTCGTTGTTGTCAGGGGTGGAACACAGCAAACCTGTTACGCCGCTCCTCCAGCT  
GACTCCTATTGCTCTCCTGGGAGCCCCAAAGGACCGGACGACAGTGTAAAAATGCTTGCAGGA  
CGAAAGAAGCTGGGTTTGTCTGCAAGCATGGATGCAGGTCCACCGACAAGGCGTACGAGTGCAC  
GTGCCCGAGTGGCTCTACCGTCGCCGAAGATGGCATTACCTGCAAAAGTATTTGTCACACAGTCA  
GCTGCACTGTTGAGCAAAAACAGACCTGCCGCCCAACCGAAGACTGTCGTGTGCAGAAAGGAAC  
TGTGTTGTGTGAGTGCCCGTGGAAATCAACATCTAGTGGGGGACACGTGCATAAGTGATTGCGTC  
GACAAGAAATGTCACGAAGAATTTATGGACTGTGGCGTATATATGAATCGACAAAGCTGCTATTGT  
CCATGGAAATCAAGGAAGCCGGGCCCAAATGTCAACATCAATGAATGCCTACTGAATGAGTATTA  
CTACACGGTGTCAATCACCC

#### 8.1.3 Subolesina P0

CATATGGCTTGCGCAACATTAAAGCGGACACATGACTGGGACCCCTTGACAGTCCGAGTGGCA  
GATCGCCGAAGCGACGCCGATGTATGCCTCTGTCCCCGCCTCCTACAAGGGCGCACCAGATCGA  
TCCCTCGCCCTTCGGAGACGTGCCACCAAAGTTGACTTCAGAGGAGATAGCAGCCAACATCCGT  
GAGGAGATGCGACGGCTACAACGGCGCAAGCAGCTCTGTTTCCAGGGCGCTGACCCTGAATCC  
CAGCATAACAGTGGTCTCTCGTCACCAGTGCATCGAGACCAGCCCCTGTTACGTTCCGCCAGG  
TTGGGCTCATTTGCGAACGAATGATGAAGGAGCGAGAGAGCAAGATACGGGAGGAGTATGACCA  
TGTGCTATCTACCAAACCTCGCAGAACAGTACGACACATTTGTTAAATTTACCTACGACCAAATTC  
GAAGCGGTTTGAAGGTGCCACGCCAGCTATTTGTCGGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG  
GCAGCG  
CAAAAAGAAGAAGCGAAATAAGGATCC

## 8.2 Anexo 2: Vector pET-28a

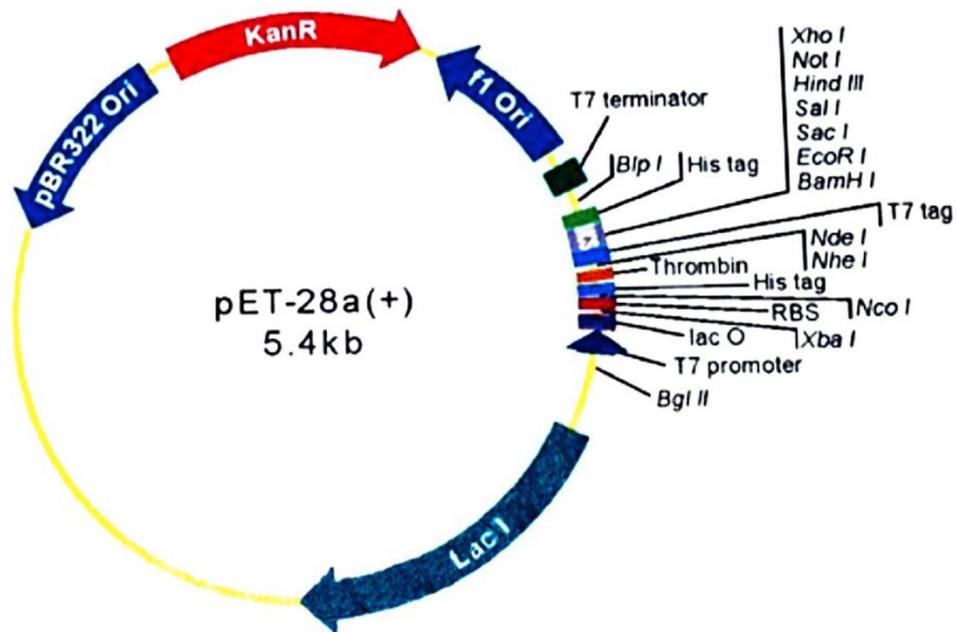


Figura 24: Plásmido pET28a

## 8.3. Anexo 3: Protocolo para la generación de bacterias electrocompetentes

### DIA 1

- Plaquear las células *E.coli* en una placa LB (sin antibióticos). Crecer la misma durante la noche a 37 ° C.

### DIA 2

- Seleccionar una sola colonia de *E.coli* de la placa LB fresca e inocular un precultivo de 10 ml de LB. Cultivar a 37 ° C en un agitador durante la noche.

### DIA 3

- Inocular 1 L de medio LB con 10 ml de precultivo y cultivar en un agitador a 37 ° C. Medir la OD a 600 nm cada hora, luego cada 15-20 minutos cuando la DO sea superior a 0,2.
- Cuando la OD alcance 0,35-0,4, poner inmediatamente las células en hielo. Enfriar el cultivo durante 20-30 minutos, agitando ocasionalmente para asegurar un enfriamiento uniforme. Colocar las botellas de centrifuga en hielo en este momento.
- (Centrifugación # 1) Dividir el cultivo de 1 L en cuatro partes vertiendo aproximadamente 250 ml en botellas de centrifuga heladas. Cosechar las células por centrifugación a 1000 g

durante 20 minutos a 4 ° C.

- Decantar el sobrenadante y resuspender cada sedimento en 200 ml de ddH<sub>2</sub>O helada.
- (Centrifugación # 2) Cosechar las células por centrifugación a 1000 g durante 20 minutos a 4 ° C.
- Decantar el sobrenadante y resuspender cada sedimento en 100 ml de ddH<sub>2</sub>O helada.
- (Centrifugación n. ° 3) Combinar las suspensiones en 2 botellas de centrífuga (de modo que cada una contenga aproximadamente 200 ml de suspensión celular). Cosechar las células por centrifugación a 1000 g durante 20 minutos a 4 ° C. En este paso, enjuagar dos tubos cónicos de 50 ml con ddH<sub>2</sub>O y enfriar en hielo.
- Decantar el sobrenadante y resuspender cada sedimento en 40 ml de glicerol al 10% helado. Transferir cada suspensión a un tubo cónico de 50 ml.
- Recolectar las células por centrifugación a 1000 g durante 20 minutos a 4 ° C. Poner tubos de microcentrífuga de 1,5 ml en hielo si aún no se han enfriado.
- Aspirar con cuidado el sobrenadante con una pipeta Pasteur estéril (los gránulos pierden adherencia en glicerol al 10%). Resuspender cada gránulo en 1 ml de glicerol al 10% helado agitando suavemente. La OD final de las células resuspendidas debe ser ~ 200-250.
- Distribuir en alícuotas en tubos de microcentrífuga estériles de 1,5 ml y congelar con nitrógeno líquido. Almacenar la celda congelada en el congelador a -80 ° C.

#### **8.4 Anexo 4: Medio SOC**

- Triptona al 2 %
- Extracto de levadura 0,5 %
- 10 mM de NaCl
- 2,5 mM de KCl
- 10 mM de MgCl<sub>2</sub>
- 10 mM de MgSO<sub>4</sub>
- 20 mM de glucosa

#### **8.5 Anexo 5: Medio Luria-Bertani (LB)-Agar**

- NaCl 10 g/L
- Extracto de levadura 5 g/L
- Triptona 10 g/L
- Agar 20 g/L

### 8.6 Anexo 6: Medio LB

- NaCl 10 g/L
- Extracto de levadura 5 g/L
- Triptona 10 g/L

### 8.7 Anexo 7: Medio ZYM-5052

|        |                       |  |                             |
|--------|-----------------------|--|-----------------------------|
| 958 ml | ZY                    | Triptona<br>Extracto de levadura   | 1%<br>0,5%                  |
| 20 ml  | 50 x M                | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>NH <sub>4</sub> Cl<br>Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 25mM<br>25mM<br>50mM<br>5mM |
| 20 ml  | 50 x 5052             | Glicerol<br>Glucosa<br>α-Lactosa   | 0,5%<br>0,05%<br>0,2%       |
| 2 ml   | 1 M MgSO <sub>4</sub> | MgSO <sub>4</sub>  | 2mM                         |

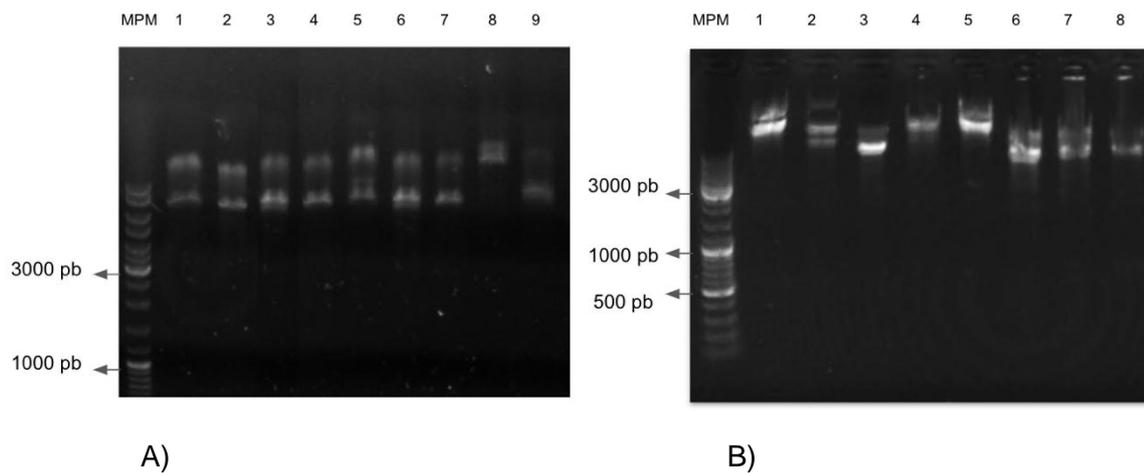
Tabla 3. Composición del medio autoinductor ZYM-5052

### 8.8 Anexo 8: Tampón fosfato salino (PBS) 1X

- NaCl 8 g/L
- KCl 0,2 g/L
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g/L
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g/L

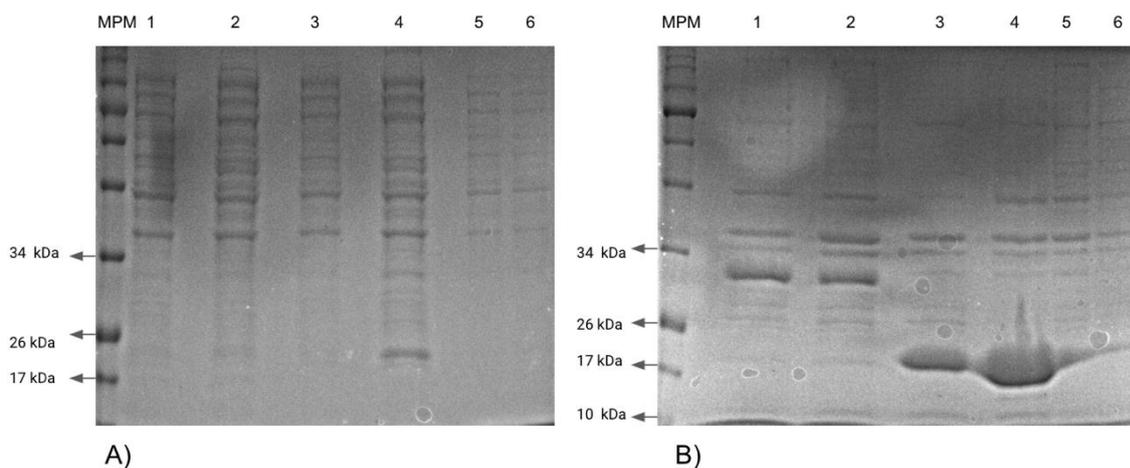
Ajustar pH a 7

### 8.9 Anexo 9: Digestiones de los plásmidos



**Figura 25: Digestiones enzimáticas de los plásmidos con NdeI y BamHI (A) y NdeI y EcoRI (B).** **A) MPM:** GeneRuler DNA Ladder Mix #SM0331; **1:** pET28a/BM86 con NdeI; **2:** pET28a/BM86 con BamHI; **3:** pET28a/BM86 con NdeI y BamHI; **4:** pET28a/SUBO con NdeI; **5:** pET28a/SUBO con BamHI; **6:** pET28a/SUBO con NdeI y BamHI; **7:** pET28a/SUBO-P0 con NdeI; **8:** pET28a/SUBO-P0 con BamHI; **9:** pET28a/SUBO-P0 con NdeI y BamHI. **B) MPM:** GeneRuler DNA Ladder Mix #SM0331; **1:** pET28a/BM86 sin digerir; **2:** pET28a/BM86 con NdeI; **3:** pET28a/BM86 con EcoRI; **4:** pET28a/BM86 con NdeI y EcoRI; **5:** pET28a/SUBO sin digerir; **6:** pET28a/SUBO con NdeI; **7:** pET28a/SUBO con EcoRI; **8:** pET28a/SUBO con NdeI y EcoRI.

### 8.10 Anexo 10: Expresiones en matraz de los antígenos con diferentes condiciones.



**Figura 26: Análisis de las fracciones solubles (A) e insolubles (B), de las inducciones en matraz de BM86 y Subolesina con diferentes condiciones.** **MPM:** Color Prestained Protein Standard #P77125; **1:** Bm86 4 h y 37° C; **2:** Bm86 16 h y 18 ° C; **3:** Subolesina 4 h y 37° C; **4:** Subolesina 16 h y 18 ° C; **5:** Control Bm86; **6:** Control Subolesina