ISBN: 978-607-00-2083-4

Expresión heteróloga de proteínas antigénicas (p31 y p40) de *Histophilus somni*

Guzmán Brambila Carolina[1], Quintero Fabián María Saray[1], de Obeso Fernández del Valle Álvaro[1], Castruita Domínguez José Pedro[2], Flores Samaniego Beatriz[2], Ortuño Sahagún Daniel[1] (dortuno@cucba.udg.mx)

[1]*Laboratorio de Desarrollo y Regeneración Neural.*
Instituto de Neurobiología. Edificio L, 1er piso.
Departamento de Biología Celular y Molecular, CUCBA.
Universidad de Guadalajara,
[2]*Laboratorio de Investigación y Desarrollo* Bio-Zoo, S.A. de C.V.

Introducción y antecedentes

El complejo respiratorio bovino (CRB) es causado por infecciones virales y bacterianas, que en combinación con factores como estrés por destete, descorne, hacinamiento y transporte, desencadenan un conjunto de síntomas característicos de esta enfermedad, la cual provoca grandes pérdidas económicas en las explotaciones ganaderas (Griffin 1997; Yates 1982).

El CRB es la causa principal de morbilidad y mortalidad en los establos, por lo que su prevención y control mediante inmunización resulta importante. De las enfermedades que padece el bovino, entre 40% y 80% son debidas al CRB y en México su prevalencia varía del 2 al 9.2% (Jim et al. 1988; Ribble et al. 1988; Aguilar 2005).

La causa del CRB es multifactorial, ya que participan diversos virus como son: rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), diarrea viral bovina (BVD), parainfluenza 3 (PI3) y virus respiratorio sincitial bovino (VRSB), que dañan al aparato respiratorio y predisponen a las infecciones bacterianas. Factores estresantes como el transporte, hacinamiento, alimentación defectuosa y condiciones ambientales adversas crean las condiciones óptimas para la proliferación de las bacterias. Las bacterias comúnmente involucradas son *Mannheimia haemolytica, Pasteurella multocida* e *Histophilus somni* (Jim et al. 1988).

Considerando que el manejo de los animales se facilita con la aplicación de vacunas polivalentes, la gran mayoría de las vacunas que existen en el mercado están diseñadas bajo este esquema. Sin embargo, se ha documentando que existen reacciones sistémicas adversas al aplicar bacterinas formuladas con combinaciones de bacterias Gram negativas (Ellis & Yong 1997), debido principalmente a la presencia de endotoxinas, que son lipopolisacáridos constituyentes de la pared celular, involucrados en los procesos de virulencia (Henderson & Wilson 1995). y que tienen la propiedad de ejercer efectos fisiológicos adversos cuando son administradas al ganado (Cullor1992), tales como edemas, choque sistémico y abortos.

En el caso específico de *H. somni*, se ha reportado la producción de un tipo diferente de endotoxinas, caracterizadas como lipo-oligosacáridos, los cuales presentan variación antigénica y fenotípica de fase. Esta variación puede actuar como un factor importante de evasión de los mecanismos de defensa de la respuesta inmune del hospedero, contribuyendo también a la disminución de la eficacia de las vacunas formuladas con *H. somni*.

Debido a lo anterior, nos hemos planteado la posibilidad de formular una vacuna polivalente que incluya protección contra *H. somni*, en la que se hayan eliminado los factores determinantes de reacciones adversas: Para lograrlo, proponemos desarrollar cepas recombinantes de *Escherichia coli* que expresen las proteínas antigénicas p31 y p40 de *H. somni*, en los vectores de expresión hetérologa pExSec1 y pQE-30 Xa, para posteriormente utilizarlos en la formulación de una vacuna polivalente contra CRB.

Metodología

Para la extracción del DNA genómico bacteriano, se inoculó en el medio de cultivo de soya tripto-caseína (BD Bioxon) la bacteria *H. somni*. El inóculo se incubó durante 16 h y posteriormente se extrajo el DNA total mediante el *kit Illustra bacteria genomic prep mini spin* (GE Healthcare).

Para la amplificación de los genes de las 2 proteínas en estudio, p31 y p40, se diseñaron los oligonucleótidos correspondientes, a los cuales se les añadieron los sitios de restricción para su posterior subclonaje en los vectores de expresión/secreción pQE-30 Xa y pExSec1. Para el amplicón clonado en el vector pQE-30 Xa las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C durante 3 min y se continuaron con 35 ciclos: desnaturalización a 95°C por 30 seg, anillamiento a 58 °C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min, se realizó una extensión final por 5 min a 72 °C. Para el amplicón a clonar en el vector pExSec1, las condiciones fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C durante 3 min y se continuaron con 35 ciclos: desnaturalización a 95°C por 30 seg, anillamiento a 56 °C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min. La extensión final durante 5 min a 72 °C. Los amplicones obtenidos de la amplificación por PCR fueron analizados por electroforesis con geles de agarosa teñidos con SYBR Green (Invitrogen).

A partir de los amplicones de p31 y p40 se realizó un subclonaje en el vector TOPO 2.1 (Invitrogen). Con estas construcciones, se transformaron células de *E. coli* de la cepa TOP10, las cuales fueron sembradas en medio LB (Luria-Bertani) con ampicilina. A partir de los transformantes obtenidos se realizaron minipreparaciones para obtener el DNA plasmídico por el método de lisis alcalina con el *kit Ilustra plasmid prep minispin* (GE Healthcare). Los plásmidos obtenidos fueron analizados por electroforesis y los clones positivos fueron digeridos con las enzimas correspondientes para cada vector. Para el vector pQE-30 Xa se utilizaron las enzimas *Stu I* y *Hind III*, mientras que para el vector pExSec1, se utilizaron *Sac I y Bam HI*.

Con los insertos digeridos y liberados, se llevaron a cabo ligaciones en los vectores antes mencionados, las cuales fueron transformadas en células de *E. coli* cepas M15 y DH5-α 18. Posteriormente, de los clones obtenidos se realizaron minipreparaciones por el método de lisis alcalina antes mencionado.

Los clones obtenidos fueron secuenciados por el método de Sanger. La lectura de las secuencias se realizó en un secuenciador de tecnología capilar ABI Prism 310. El análisis y comparación para la búsqueda de homólogos de las secuencias se realizó con el programa PSI-BLAST y consultas al GenBank del *National Center for Biotechnology Information*. El alineamiento de las secuencias y su análisis se realizó mediante el software DNAstar.

Resultados

Los amplicones obtenidos por PCR punto final, se muestran en la figura 1, los cuales presentan los tamaños esperados para los fragmentos de las proteínas antigénicas p31 y p40 de *H. somni*; 858 y 878 pares de bases respectivamente.

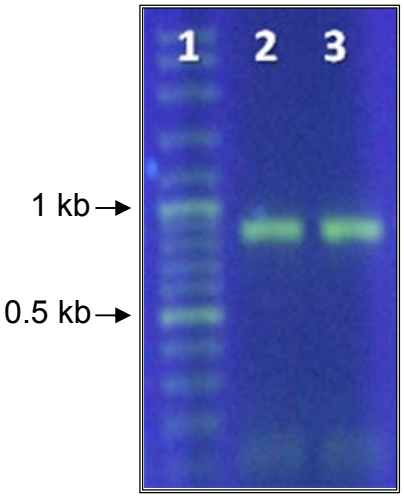

Figura 1. Productos de amplificación: 1) Marcador de tamaño molecular de 0.1 kb, 2) p31 de 858 pb, 3) p40 de 878 pb.

Una vez obtenidos los productos de amplificación, se clonaron en el vector pCR 2.1 TOPO 3.9 kb. Se realizaron minipreparaciones por el método de lisis alcalina para la identificación de clones positivos (figura 2) y posteriormente se liberaron los insertos mediante digestión enzimática (figura 3).

Los insertos liberados fueron subclonados en forma direccional en los vectores de expresión y nuevamente se identificaron los clones positivos mediante

minipreparaciones. De cada clonaje se secuenciaron dos clones para seleccionar el aquel cuya secuencia correspondiera con la reportada en la base de datos..

En la figura 4 se muestra un electroferograma obtenido de la secuenciación de 2 clones del gen p31 y se evidencia el cambio de un nucleótido del clon 2 con respecto al clon 1. Se seleccionó el clon que no tuvo ningún cambio (clon 1) para su posterior inducción.

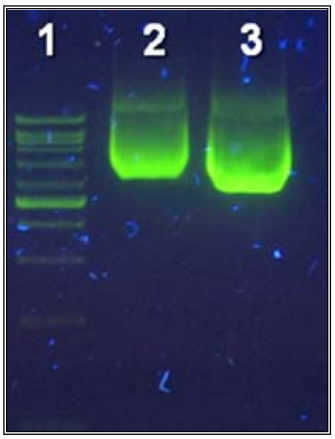

Figura 2. Amplicones p40 y p31 (clonadas en vector TOPO 2.1), 1) Marcador de tamaño molecular 2) p31, 3) p40.

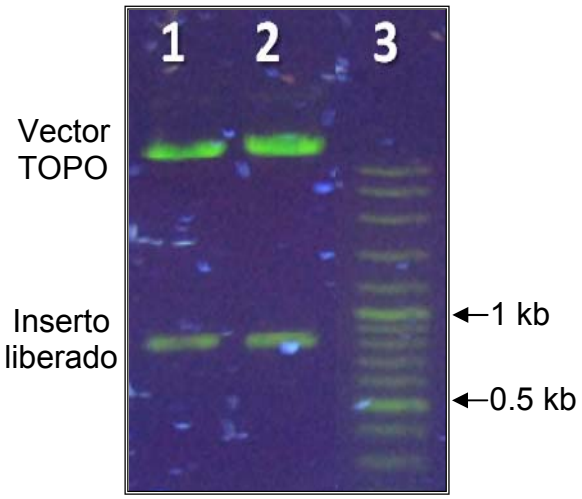

Figura 3. Digestiones de p31 y p40 clonadas en vector TOPO 2.1, 1) p40 de 878 pb, 2) p31 de 858 pb, 3) Marcador de tamaño molecular de 0.1 kb.

Conclusiones

En este trabajo se realizaron las amplificaciones de los genes de las proteínas antigénicas p31 y p40 de *H. somni* y estas fueron clonadas en el vector TOPO 2.1 y subclonadas en los vectores pQE-30 Xa y pExSec1.

El siguiente paso a realizar es la inducción de las proteínas antigénicas p31 y p40 de *H. somni* para su posterior inclusión en la vacuna contra el CRB.

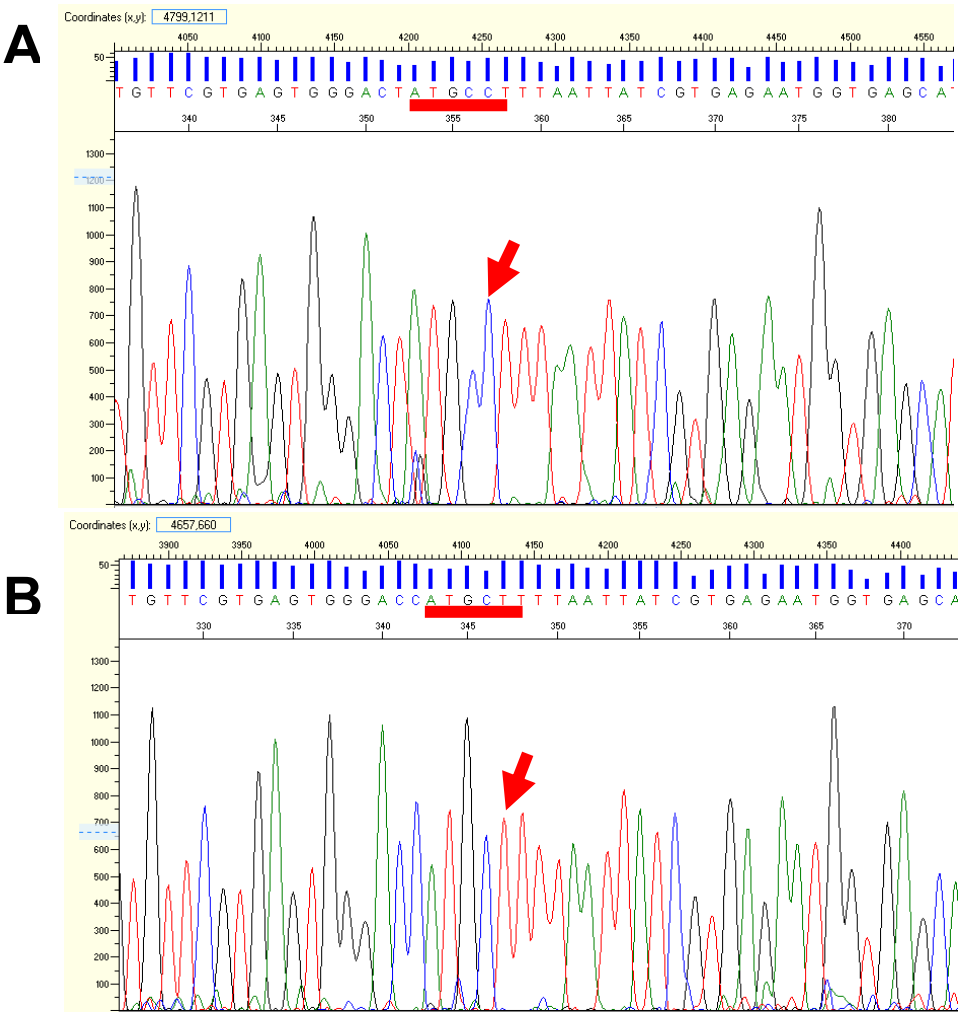

Figura 4. Electroferogramas de secuenciación. A) secuencia obtenida del clon 1 de p31, 2) secuencia obtenida del clon 2 de p31, la flecha roja indica el nucleótido que cambia en el clon 2 con respecto al 1.

Agradecimientos

El presente trabajo de investigación es apoyado por el Conacyt mediante el proyecto 71496 para BFS con becas de tesis de licenciatura para MSQF y AOFV, el proyecto CONACYT U48002-M para DOS, además de la beca Doctoral 237076 para CGB. Los resultados aquí presentados son parte del trabajo de tesis Doctoral de CGB.

Referencias

Aguilar, F., 2005. *Histophilus somni* (*Haemophilus somnus*) isolated from dairy cattle with reproductive disorders. First report in Mexico. Tec. Pecu. Mex. 43**(2)**:185-195.

Cullor, J.S., 1992. Shock attributable to bacteremia and endotoxemia in cattle: Clinical and experimental findings. Am. Vet. Med. Assoc. 200:1894-1902.

Ellis, J.A., & C, Yong., 1997. Systemic adverse reactions in young Simmental calves following administration of a combination vaccine. Can. Vet. J. 38**(1)**:45-47.

Griffin, D., 1997. Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 13**(3)**:367-77.

Henderson, B., & Wilson, N., 1995. Modulins: a new class of cytokine-inducing, pro-inflammatory bacterial virulence factor. Inflamm. Res. 44**(5)**:187-197.

Jim, K., Guichon, T. & G. Shaw., 1988. Protecting feedlot calves from pneumonic pasteurellosis. Vet. Med. 83:1084-1087.

Ribble, C.S., Jim G.K., & E.D. Janzen., 1988. Efficacy of immunization of feedlot calves with a commercial *Haemophilus somnus* bacterin. Can. J. Vet. Res. 52**(2)**:191-198.

Yates, W.D., 1982. A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. Can. J. Comp. Med. 46**(3)**:225-263.