

Tesis Doctoral

# Uso de *Brucella abortus* como vector para la expresión de antígenos heterólogos

Sabio y García, Julia Verónica

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Sabio y García, Julia Verónica. (2011). Uso de *Brucella abortus* como vector para la expresión de antígenos heterólogos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Sabio y García, Julia Verónica. "Uso de *Brucella abortus* como vector para la expresión de antígenos heterólogos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Uso de *Brucella abortus* como vector para la  
expresión de antígenos heterólogos**

Trabajo de tesis para optar al grado de Doctor de la Universidad de Buenos  
Aires en el área: **Ciencias Biológicas**

**Lic. Julia Verónica Sabio y García**

Directora de Tesis: Dra. Fabiana Bigi  
Directora Asistente: Dra. Eleonora Campos  
Consejero de Estudios: Dr. Esteban Hopp

Lugar de Trabajo: Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA.  
Buenos Aires, Argentina

**Buenos Aires, 2011**



UNIVERSITY OF BUENOS AIRES  
School of Natural and Exact Science  
Department of Biological Sciences

***Brucella abortus* as a Vector for Heterologous  
Antigen Expression**

Thesis presented to obtain the PhD degree in Biological Sciences at the  
University of Buenos Aires

**Author: Lic. Julia Verónica Sabio y García**

Director: PhD Fabiana Bigi  
Assistant Director: PhD Eleonora Campos  
Supervisor of Studies: PhD Esteban Hopp

Institute of Biotechnology, CICVyA, INTA.  
Buenos Aires, Argentina.

**Buenos Aires, 2011**

## Uso de *Brucella abortus* como vector para la expresión de antígenos heterólogos

### Resumen

La brucelosis es una zoonosis bacteriana causada por especies del género *Brucella*. *B. abortus* S19 es la cepa vacunal en uso en nuestro país. Debido a su capacidad para despertar una respuesta inmune celular y humoral, *B. abortus* S19 es un candidato atractivo para la expresión de antígenos de otros patógenos de interés veterinario.

En esta tesis se estudió la expresión en *B. abortus* S19 de los antígenos MPB83 de *M. bovis* (bacteria intracelular que causa la tuberculosis bovina) y RAP1 de *B. bovis* (hemoparásito agente causal de la babesiosis). Estos antígenos se expresaron en *B. abortus* como fusión a los primeros aminoácidos de  $\beta$ galactosidasa de *Escherichia coli* y de la lipoproteína OMP19 y la proteína periplásmica BP26, ambas de *B. abortus*, con el fin de expresar los antígenos heterólogos en distintos contextos subcelulares y analizar cuál despertaría la mejor respuesta inmune. Todas las quimeras pudieron ser expresadas en S19, salvo por BP26-RAP. Al ser ensayadas en el modelo murino, las cepas recombinantes fueron capaces de despertar respuesta inmune celular específica contra los antígenos heterólogos sin afectar la replicación y la inmunogenicidad de *Brucella*. En el caso de las recombinantes que expresan RAP1 se obtuvo también respuesta humoral. Además, se realizaron algunos ensayos preliminares en la cepa vacunal rugosa, RB51, para algunas de las construcciones, teniendo en cuenta la posibilidad de desarrollar estrategias de revacunación en animales adultos.

Los resultados presentados en esta tesis demuestran la factibilidad de utilizar *B. abortus* S19 como vector para antígenos heterólogos con fines vacunales. Con los sistemas aquí desarrollados fue posible expresar los antígenos en diferentes localizaciones subcelulares sin afectar la replicación y la inmunogenicidad de S19. Así, este trabajo sienta las bases para la expresión de múltiples antígenos, incluso para más de un patógeno.

**Palabras clave:** Expresión heteróloga, *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis*, *Babesia bovis*, MPB83, RAP1, BP26, OMP19.



## ***Brucella abortus* as a Vector for Heterologous Antigen Expression**

### **Abstract**

Brucellosis is a bacterial zoonosis caused by species from the genera *Brucella*. *B. abortus* S19 is the vaccine strain in use for bovine brucellosis in Argentina. On account of its capacity to generate a strong humoral and cellular immune response, *B. abortus* S19 holds great potential as an attractive vector for the expression of heterologous antigens of veterinary importance.

The aim of this thesis was to study the expression of MPB83 of *M. bovis* (intracellular bacterium responsible for bovine tuberculosis) and RAP1 of *B. bovis* (hemoparasite, etiologic agent of babesiosis in cattle) in *Brucella abortus*. These antigens were expressed in *B. abortus* as a fusion to the first aminoacids of  $\beta$ galactosidase of *Escherichia coli* and also as a chimeric fusion to the first aminoacids of OMP19 lipoprotein and BP26 periplasmic protein, both of them from *B. abortus*. The purpose was to express the heterologous antigens in different subcellular contexts and analyze which of them triggers the most adequate immune response. All the chimeric proteins were able to be expressed in S19, except for BP26-RAP. When analyzed in the murine model, the recombinant strains were able to trigger a specific cellular immune response against the heterologous antigens without affecting the replication and immunogenicity of *Brucella*. Moreover, some preliminary tests were made with the rough vaccine strain RB51, considering the potential interest in revaccination strategies.

These results indicate that *B. abortus* S19 is an adequate vector to express and present antigens of *M. bovis* and *B. bovis*. The system here developed allowed the expression of the selected antigens in different subcellular localizations.

This work lays the foundations for the expression of multiple antigens, even from more than one pathogen.

**Key words:** Heterologous Expression, *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis*, *Babesia bovis*, MPB83, RAP1, BP26, OMP19.

Quiero empezar agradeciendo a todo el Instituto de Biotecnología del INTA de Castelar en general.

Especialmente a mis directoras de tesis Eleo y Fabi por todo el esfuerzo que pusieron en guiarme durante la tesis, sus correcciones. Principalmente a Eleo por el empeño que puso en empujarme para que terminara.

También quiero agradecer a mis compañeros de grupo: Mariela, Silvio, Alicia, Haydee y Marcos. Gracias a todos por toda la ayuda que me dieron para realizar los experimentos y por las discusiones científicas. A Haydee le quiero agradecer además por las horas que pasó dándome consejos y escuchándome.

A todos los integrantes del grupo vecino los “tuberculosos”: principalmente a Gaby, Martín, Kari y Andre que me escucharon en mis días verborágicos.

Al grupo de hemoparásitos (alias “emo”). A cada uno de sus integrantes por las lindas charlas, los amenos desayunos, almuerzos, tentempiés de las tarde, etc. Gracias a todos por tener un mate y un tema de charla a cada rato que me aparecía en el lab. Gracias Romi, Pau, Pablo, y los nuevitos Eli y Pepe. En este agradecimiento incluyo al parásito del grupo hemoparásito (que no soy yo): Marianito.

Gracias a Lau Radonic, Vale B y Cintia por todos los mates y charlas y por haberme bancado siempre.

A Lau Ramos y Flavia por hacer mis viajes hacia el INTA más divertidos.

A Oscar y Osvaldo que aportaron mucho en la tesis junto a mis directoras.

A Ceci Vázquez y Mariana del Vas por la tortura psicológica de “¿Cuándo das la tesis?” sin la cual probablemente no hubiera llegado a su fin.

A los integrantes de mi nuevo grupo “tomatólogo”.

Al grupo del Dr. Sergio Costa de Belo Horizonte que me abrieron las puertas de su lab para realizar parte de los experimentos en ratones. Principalmente a Gilson, Natalia y Thaís que me ayudaron en los experimentos y a Diogo que hizo mis días en el lab súper divertidos y las noches por las fiestas de Belo Horizonte aún más.

Y a toda mi familia: Julio, Alicia, Car y Fer que tuvieron que bancar mis quejas durante varios años.

<b>Resumen</b>	I
<b>Abstract</b>	II
<b>Agradecimientos</b>	III
<b>Índice</b>	IV
<b>Lista de figuras</b>	VII
<b>Lista de Tablas</b>	IX
<b>Abreviaturas</b>	X
<b>Introducción</b>	
1 Brucelosis	1
1.1 Clasificación	2
1.2 Epidemiología de la brucelosis	3
2 <i>Brucella abortus</i>	5
2.1 Generalidades	5
2.2 Características de la membrana externa	6
2.3 Proteínas de membrana	7
2.4 Patogenicidad	9
3 Respuesta inmune contra <i>Brucella</i>	10
3.1 Inmunidad Innata	11
3.2 Inmunidad adaptativa (adquirida)	12
4 Modelo murino para el estudio de la Brucelosis	16
5 Vacunas para brucelosis	17
5.1 Cepas vacunales en uso	18
5.1.1 Cepas lisas	18
<i>B. abortus</i> S19	18
<i>B. melitensis</i> Rev1	20
5.1.2 Cepas rugosas	20
<i>B. abortus</i> RB51	21
5.2 Nuevas vacunas	21
6 Sistemas de expresión heteróloga con el fin de vacunación	24
Vectores virales	25
Vectores bacterianos	26
7 <i>Brucella abortus</i> como sistema de expresión heteróloga	26
8 Otros patógenos de interés veterinario	28
8.1 <i>Babesia bovis</i> : Babesiosis bovina	28
Proteína asociada a roptria (RAP1)	29
8.2 <i>Mycobacterium bovis</i> . Tuberculosis bovina	30
MPB83	33
9 Selección de antígenos	34

<b>Hipótesis</b>	36
<b>Objetivos</b>	38
<b>Materiales y métodos</b>	
1 Materiales Biológicos y Químicos	40
1.1 Cepas	40
1.2 Oligonucleótidos	41
1.3 Plásmidos	43
1.4 Anticuerpos	45
1.5 <i>Buffers</i> y otras soluciones	46
2 Métodos microbiológicos	47
2.1 Medios y condiciones de cultivo	47
2.2 Transformación de <i>E. coli</i> y selección de los vectores recombinantes	48
2.3 Transformación de <i>B. abortus</i>	48
2.3.1 Preparación de <i>B. abortus</i> electrocompetentes	48
2.3.2 Electroporación y selección de recombinantes de <i>B. abortus</i>	49
2.4 Identificación de recombinantes y mutantes de <i>B. abortus</i> por PCR en colonias	49
3 Análisis de ADN	49
4 Análisis de proteínas	50
4.1 Producción de proteínas recombinantes (rRAP-1, rMPB83) en <i>E. coli</i>	50
4.2 Expresión y localización subcelular de la proteína heteróloga en <i>E. coli</i> y <i>B. abortus</i>	51
4.3 Tratamiento con globomicina	52
5 Western blot	53
6 Ensayos en ratones	54
6.1 Animales de laboratorio	54
6.2 Estimación de la virulencia residual de las cepas recombinantes S19 y RB51	54
6.3 Respuesta humoral en ratones BALB/c	54
6.4 Respuesta celular en ratones BALB/c	56
6.5 Protección contra el desafío con una cepa patógena	57
7 Bioinformática	57
8 Análisis estadístico	58
9 Financiación	58
<b>Resultados</b>	
<b>Capítulo I: Construcción de vectores de expresión para <i>Brucella abortus</i></b>	
A. Vectores replicativos	61
A.1 En citoplasma	61
A.2 En asociación a la membrana	62
B. Vector integrativo	63
B.1 En región periplásmica	63

**Capítulo II: *Brucella abortus* como vector de expresión de antígenos de protistas parásitos (*Babesia bovis*)**

1. Obtención de cepas recombinantes de <i>Brucella</i> que expresan RAP1	67
1.1 Clonado del gen <i>rap1</i> y expresión de las proteínas quiméricas $\beta$ gal-RAP, BP26-RAP y OMP19-RAP	67
1.2 Localización subcelular de OMP19-RAP y $\beta$ gal-RAP en S19	69
1.3 Ensayo de lipidación de OMP19-RAP en <i>B. abortus</i>	70
2. Ensayos en ratones de las cepas recombinantes de <i>Brucella</i> para RAP1	71
2.1 Virulencia residual de las cepas recombinantes S19 y RB51 y estabilidad de los plásmidos en el modelo murino de infección para <i>Brucella</i>	71
2.2 Respuesta celular de las rS19 y rRB51 en el modelo murino de infección	75
2.3 Respuesta humoral contra RAP	77
2.4 Capacidad protectora frente al desafío con la cepa patógena 2308 de <i>B. abortus</i>	79
Resumen de los resultados	81

**Capítulo III: *Brucella abortus* como vector de expresión de antígenos de micobacterias (*Mycobacterium bovis*)**

1. Obtención de cepas recombinantes de <i>Brucella</i> que expresen MPB83 de <i>M. bovis</i> .	84
1.1 Clonado del gen heterólogo y expresión de las proteínas quiméricas $\beta$ gal-MPB83, BP26-MPB83 y OMP19-MPB83	84
1.2 Localización subcelular de las proteínas quiméricas	86
1.3 Ensayo de lipidación de OMP19-MPB83 en S19	87
2. Ensayos en ratones de las cepas recombinantes de <i>Brucella</i> para MPB83	89
2.1 Virulencia residual de las cepas recombinantes S19 y estabilidad de los plásmidos en el modelo murino de infección para <i>Brucella</i>	89
2.2 Respuesta celular de las rS19 en el modelo murino de infección	92
2.3. Respuesta humoral contra MPB83	94
2.4. Capacidad protectora frente al desafío con la cepa patógena 2308 de <i>B. abortus</i>	94
Resumen de los resultados	96

<b>Discusión</b>	98
------------------	----

<b>Conclusiones</b>	117
---------------------	-----

<b>Bibliografía</b>	120
---------------------	-----

<b>Anexo I: Secuencias</b>	143
----------------------------	-----

**Anexo II: Publicaciones**

II.1 Expression of <i>Babesia bovis</i> rhoptry-associated protein 1 (RAP1) in <i>Brucella abortus</i> S19.	149
II.2 Expression of MPB83 from <i>Mycobacterium bovis</i> in <i>Brucella abortus</i> S19 induces specific cellular immune response against the recombinant antigen in BALB/c mice.	156

## Lista de figuras

Figura 0.1: Esquema simplificado de la membrana externa de la pared celular de <i>Brucella</i>	7
Figura 0.2: Secuencias aminoacídicas N-terminal de OMP10 y OMP19.	8
Figura 0.3: Vías de citoquinas provocadas por <i>B. abortus</i>	12
Figura 0.4: Modelo de defensa del hospedador contra la brucelosis en el ganado bovino	14
Figura I.1: Esquema de la construcción de los plásmidos pGH	62
Figura I.2: Esquema de los plásmidos pomp19-GH	63
Figura I.3: Esquema del plásmido p26-83	65
Figura II.0: Estructura esquemática de RAP1 de <i>B. bovis</i> .	67
Figura II.1 Análisis en agarosa al 1,5% de productos de amplificación por PCR obtenidos ( <i>rap1</i> )	69
Figura II.2. Análisis de la expresión de RAP1 en <i>B. abortus</i> S19 y <i>B. abortus</i> RB51	70
Figura II.3. Análisis de la localización subcelular de RAP1 expresada en la cepa de <i>Brucella</i> S19	71
Figura II.4. Estabilidad de los plásmidos y colonización de los bazos en ratones Balb/c inmunizados con las cepas recombinantes de S19	74
Figura II.5. Estabilidad de los plásmidos y colonización de los bazos en ratones Balb/c inmunizados con las cepas recombinantes de RB51	75
Figura II.6. Expresión de $\beta$ gal-RAP y OMP19-RAP de bacterias recuperada de los bazos de ratones inoculados.	76
Figura II.7. Producción de IFN- $\gamma$ a la semana 3 posinfección con rS19	77
Figura II.8. Producción de IFN- $\gamma$ a la semana 3 posinfección con rRB51	78
Figura II.9. Respuesta humoral específica contra rRAP1 en los ratones inoculados con	79

las distintas rS19

Figura II.10. Detección de anticuerpos específicos contra rRAP en suero de ratones inoculados con las distintas cepas de <i>Brucella</i> S19 y controles inoculados con PBS	81
Figura II.11. Protección de ratones vacunados con Spomp19-RAP contra el desafío con la cepa patógena S2308	82
Figura III.1: Análisis de expresión de MPB83 como proteína de fusión en <i>B. abortus</i> S19	87
Figura III.2: Análisis de la localización subcelular de MPB83 como proteína de fusión expresada en <i>B. abortus</i> S19.	89
Figura III.3: Ensayo de lipidación de OMP19-MPB83 por tratamiento con globomicina	90
Figura III.4: Estabilidad de los plásmidos y colonización de los bazos en ratones Balb/c inmunizados con las cepas recombinantes	93
Figura III.5: Producción de IFN- $\gamma$ de esplenocitos de ratones a la 3 <sup>a</sup> semana posinfección con rS19	95
Figura III.6: Respuesta humoral específica contra rMPB83 en los ratones inoculados con las distintas rS19	96
Figura III.7: Protección de ratones vacunados con Sp83 contra el desafío con la cepa patógena S2308	97

## Lista de tablas

Tabla 0.1: Especies de <i>Brucella</i>	3
Tabla 0.2: Características de las especies de microorganismos utilizadas en este trabajo	33
Tabla 1: Cepas utilizadas en este trabajo	41
Tabla 2: Oligonucleótidos empleados en este trabajo	43
Tabla 3: Plásmidos usados en este trabajo	44
Tabla 4: Soluciones utilizadas en este trabajo	47
Tabla 5: Antibióticos utilizados en este trabajo	49



## Abreviaturas

6His	Cola de 6 Histidinas
$\mu\text{F}$ :	Microfaradios
$\mu\text{g/ml}$ :	Microgramos por mililitro
$\mu\text{g}$ :	Microgramos
$\mu\text{l}$ :	Microlitro
$\mu\text{m}$ :	Micrómetro
$\mu\text{M}$ :	Micromolar
$\mu\text{mol}$ :	Micromol
$\Delta\text{G}$ :	Incremento de la energía libre
$\Omega$ :	Ohmios
$^{\circ}\text{C}$ :	Grados Celcius
A:	Antibiótico
aa:	Aminoácidos
$\text{Amp}^{\text{r}}$ :	Resistente a ampicilina
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ARN:	Ácido ribonucleico
<i>B. abortus</i> :	<i>Brucella abortus</i>
BCV	Vacuolas conteniendo <i>Brucella</i> ( <i>Brucella</i> -containing vacuole)
TBb	Tuberculosis bovina
C:	Complemento
cm:	Centímetros
col.:	Colaboradores
CPAs:	Células presentadoras
D.O.550:	Densidad óptica a una longitud de onda de 550 nanómetros
DMSO:	Dimetil sulfóxido
dNTP:	Desoxiribonucleótido trifosfato
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EDTA:	Ácido etilen diamino tetra-acético
ELISA:	Ensayo por inmunoabsorción ligado a Enzimas
EthBr:	Bromuro de etidio
FOA:	Ácido fluororótico
g/l:	Gramos por litro
h:	Hora(s)
HRP:	Peroxidasa
IC:	Intracelular
Ig:	Inmunoglobulina
IL:	Interleuquina
INF- $\gamma$ :	Interferón gama
INTA:	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
i.p.:	Intraperitoneal
IPTG:	Isopropil-tio- $\beta$ -D-galactósido
$\text{Kan}^{\text{r}}$ :	Resistencia (r) a kanamicina
kb:	Kilobases
kDa:	KiloDaltons
LB:	Medio de cultivo Luria-bertani

log:	Logaritmo decimal
LPS:	Lipopolisacárido
M:	Molar
MCS:	Sitio múltiple de clonado (multiple cloning site)
mg/ml:	Miligramos por mililitro
MHC:	Complejo mayor de histocompatibilidad
MHC-I :	Ídem anterior de clase I
MHC-II:	Ídem de clase II
min:	Minutos
ml:	Mililitro
mM:	Milimolar
ms:	Milisegundos
mARN:	ARN mensajero
ng:	Nanogramo
NK:	Células citotóxicas naturales
Omp/s:	Proteínas de la membrana externa
ONPG:	Orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido
ORF:	Marco de lectura abierto (open reading frame)
PAMPs:	Patrones moleculares asociados a patógenos
pb:	Pares de bases
PBS(T):	<i>Buffer</i> fosfato salino (Tween) (phosphate buffer saline)
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa (polimerase chain reaction)
p.d.:	Posdesafío
p.i.:	Posinfección
PM:	Peso molecular
pmol:	Picomol
PRR:	Receptores de reconocimiento de patrones
p/v:	Relación peso/volumen
p.v.:	Posvacunación
RE:	Retículo endoplasmático
Res.:	Resolución
rpm:	Revoluciones por minutos
RPMI:	Roswell Park memorial Institue. Medio de cultivo
S19:	Cepa vacunal <i>Brucella abortus</i> 19
S2308:	Cepa virulenta <i>Brucella abortus</i> 2308
SDS:	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil-sulfato de sodio
SD	Desvío estándar
SEM	Error estándar de la media
SENASA:	Servicio Nacional de Sanidad Animal
SFB:	Suero fetal bovino
st:	Sin transmembrana: sin la región que codifica para la secuencia transmembrana
t :	Tiempo
T°:	Temperatura
TA:	Agar triptosa (Tryptose agar)
TB	Tuberculosis
TBS:	<i>Buffer</i> de Tris borato salino

TF:	Factor de Termoestabilidad
TNF:	Factor de necrosis tumoral
TLR/s:	Receptor/es tipo TOLL
Tris:	Tri-(hidroximetil)-aminometano
TSB	Medio de tripticasa de soja (Tryptic Soy Broth)
UFC:	Unidades formadoras de colonias
UV:	Ultravioleta
V/cm:	Voltios por centímetro
Vol:	Volumen
V:	Voltios
X-Gal:	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

### **Proteínas:**

MPB:	Membrane Protein from ( <i>Mycobacterium</i> ) <i>bovis</i> : Proteína de membrana de ( <i>M.</i> ) <i>bovis</i>
OMP:	Outer Membrane Protein. Proteína de membrana externa
RAP:	Rhoptry Associated Protein. Proteína asociada a roptria

### **Cepas S19:**

S:	S19
Sp:	S19 conteniendo el plásmido pBB1MRC2
SpRAP:	S19 conteniendo el plásmido pRAP
Spopm19-RAP:	S19 conteniendo el plásmido pomp19-RAP
Sp83:	S19 conteniendo el plásmido p83
Spomp19-83	S19 conteniendo el plásmido pomp19-83
Sp26-83	S19 conteniendo el plásmido p26-83

### **Cepas RB51**

R:	RB51
RpRAP:	RB51 conteniendo el plásmido pRAP

# Introducción

## 1. Brucelosis

La brucelosis es una zoonosis endémica que afecta a una gran variedad de mamíferos: bovinos, ovinos, caprinos, suinos, caninos, cetáceos y también puede infectar al hombre. En los animales, la infección en las hembras lleva generalmente al aborto, mientras que en los machos genera orquitis y epididimitis, que pueden resultar en infertilidad. En los humanos, se caracteriza por ser una enfermedad febril crónica y debilitante, difícil de tratar con antimicrobianos.

Hay evidencias que sugieren que la brucelosis ya existía en el Imperio Romano (Capasso, 2002). En 1887, Sir David Bruce aisló por primera vez el patógeno causante de esta enfermedad de bazos de soldados de las tropas británicas apostadas en la Isla de Malta (Bruce, 1887) y lo denominó “micrococci”. Este nombre luego fue cambiado a *Micrococcus melitensis*, basándose en el nombre romano para Malta “Melita”. Estudios llevados a cabo por la Comisión de Fiebre Mediterránea (creada en 1904 y presidida por Bruce) concluyeron que la enfermedad se debía al consumo de leche cruda de cabras aparentemente sanas. Zammit demostró la naturaleza zoonótica de *Brucella melitensis* al aislarla de la leche de cabra (Godfroid y col., 2005). La eliminación de la leche de la dieta de los soldados significó la desaparición de la enfermedad en las tropas. En 1897, en Dinamarca, se aisló la segunda especie a partir de ganado bovino infectado y se la denominó *Bacillus abortus* (Bang, 1906). En 1917, Alice Evans, sugirió que este bacilo y *M. melitensis* debían considerarse miembros del mismo género debido a que estaban altamente relacionados. Esto fue aceptado varios años después y el género pasó a llamarse *Brucella* en honor a su descubridor, Sir David Bruce (Evans, 1949). Posteriormente, se detectaron bacterias del mismo género en diversos animales domésticos como ovejas, cerdos y perros; y en animales salvajes como ciervos, alces, bisontes, antílopes, liebres, jabalíes, coyotes, zorros y lobos, todos ellos considerados reservorios naturales de la enfermedad (Davis, 1990). En 1994, se aisló por primera vez un cocobacilo Gram negativo con características similares a las de *Brucella* spp. de un mamífero marino (Ewalt y col., 1994). Posteriormente, se aislaron también de otros mamíferos marinos: focas, morsas y ballenas (Jahans y col., 1997; Clavareau y col., 1998; Bricker y col., 2000).

## 1.1. Clasificación

Para la clasificación de las especies de *Brucella* se utiliza un sistema basado en su especificidad de hospedador y diferencias fenotípicas y antigénicas. En la actualidad, se reconocen al menos siete especies de *Brucella*. Las seis con nomenclatura aceptada (y su hospedador preferencial) son: *B. abortus* (bovinos), *B. melitensis* (caprinos y ovinos), *B. ovis* (ovinos), *B. canis* (caninos), *B. suis* (porcinos y ovinos) y *B. neotomae* (roedores). Recientemente, se aislaron cepas de mamíferos marinos (revisión en Godfoid y col., 2005). Las diferencias descritas para estos aislamientos, con respecto a las cepas provenientes de animales terrestres (Bricker y col., 2000), sugieren que corresponderían a nuevas especies de *Brucella* (Jahans y col., 1997): *B. ceti* y *B. pinnipedialis* (anteriormente “*B. cetaceae*” y *B. pinnipediae*”, respectivamente) (Foster y col., 2007). Por otra parte, se han aislado cepas de *Brucella* a partir de ratas de campo y zorros que fueron descritas como una nueva especie denominada *Brucella microti* (Scholz y col., 2008). Además, dos nuevas cepas que muestran similitud entre ellas y son diferentes a las especies de *Brucella* hasta ahora descritas han sido aisladas a partir de humanos. Una de estas cepas fue denominada *B. inopinata* (citado en Pappas, 2010). Finalmente, también se obtuvieron aislamientos a partir de babuinos. Estos aislamientos tienen características de *Brucella* pero también son distintas a las descritas (para una revisión ver Pappas, 2010).

*B. melitensis* es la más patógena para humanos; *B. ovis* y *B. neotomae* no son patógenas para humanos y el resto muestra patogenicidad moderada (para más detalles ver tabla 0.1).

En base a estudios de hibridación ADN-ADN, se observó una homología a nivel de ADN mayor al 90% entre las especies de *Brucella* (Verger y col., 1985), lo que llevó a sugerir que *Brucella* debería ser considerado un género único monoespecífico. La nueva nomenclatura fue momentáneamente adoptada por el GenBank; sin embargo, existe una gran resistencia en su utilización por cuestiones prácticas. Por ejemplo, hay una marcada preferencia de hospedador; siendo la enfermedad, en general, transitoria y autolimitante en casos de infecciones interespecíficas, lo que refleja una adaptación hospedador-parásito (Moreno y col., 2002). Esto se ve sustentado con los análisis de proteomas de *B. abortus* y *B. melitensis* que muestran altas diferencias entre las especies (DelVecchio y col., 2002a). En el 2003, la subcomisión en Taxonomía de *Brucella* del Comité

Internacional en Sistemática de Procariotas (International Committee on Systematics of Prokaryotes (ICSP)) acordó unánimemente establecer la clasificación taxonómica utilizada previa al año 1986, con la aprobación de las seis especies de *Brucella* y sus biovars (Osterman y Moriyón, 2006).

**Tabla 0.1:** Especies de *Brucella*

<i>Especie</i>	<i>Tipo (rugosas o lisas)</i>	<i>Hospedador primario</i>	<i>Patogenia</i>	<i>Patogenicidad para el hombre</i>
<i>B. abortus</i>	Lisas	Bovinos	Abortos. Orquitis. Epididimitis.	Moderada
<i>B. melitensis</i>		Caprinos	Abortos.	Elevada
<i>B. suis</i>		Porcinos	Abortos. Esterilidad. Orquitis	Moderada
<i>B. neotomae</i>		Roesdores		No hay casos informados
<i>B. pinnipedialis*</i>		Focas		No hay casos informados
<i>B. ceti*</i>		Cetaceos	Abortos. Orquitis.	Variada
<i>B. microti*</i>		Ratones de campo, zorros		No hay casos informados
<i>B. inopinata*</i>		¿?		Moderada
<i>B. ovis</i>		Ovinos	Abortos (poco frecuentes). Epididimitis.	No hay casos informados
<i>B. canis</i>		Cánidos	Abortos. Esterilidad. Epididimitis. Dermatitis escrotal.	Moderada

<i>¿Futuras especies?</i>	<i>Tipo (rugosas o lisas)</i>	<i>Hospedador primario</i>	<i>Patogenia</i>	<i>Patogenicidad para el hombre</i>	<i>Origen</i>
BO2	lisas	¿?		Moderada	Aislamiento a partir de humanos
Aislamientos a partir de Babuinos		Babuinos	Abortos	No hay casos informados	Aislamientos a partir de babuinos

\* Nuevas especies. Adaptado de Pappas, 2010.

## 1.2. Epidemiología de la brucelosis

La brucelosis es una enfermedad ampliamente distribuída en todo el mundo tanto en humanos como en animales domésticos (Acha y Szyfres, 1986). La infección con *B. abortus* es la forma más ampliamente distribuída, mientras que la infección de humanos

con *B. melitensis* a partir de cabras y ovejas infectadas es la más relevante en términos de salud pública (Corbel, 1997).

En Argentina, el sector agropecuario cumple un rol protagónico en la economía del país, conformando alrededor del 50% del monto de las exportaciones. Dentro de este sector, el complejo ganadero consta de una población bovina aproximada de 48 millones de cabezas de ganado, de las cuales el 78% se encuentra en la región pampeana (SENASA, 2010).

La brucelosis bovina causada por *B. abortus* tiene una prevalencia en el país de aproximadamente el 4,5% en el ganado bovino de carne (Samartino, 2007). En la región de la Patagonia también hay una alta incidencia de brucelosis ovina causada por *B. ovis*. La brucelosis caprina se encuentra principalmente en el norte del país, con una prevalencia de *B. melitensis* biovar 1 estimada en alrededor del 25%. También existe, con menos incidencia, brucelosis porcina por *B. suis*. Se considera que en nuestro país las pérdidas económicas relacionadas con la enfermedad superan los 300 millones de pesos anuales (Samartino, 2002) y se estima que en todo Latinoamérica las pérdidas serían superiores a los 600.000.000 de dólares americanos (Seleem y col., 2010).

En nuestro país, la forma de prevención y control de la enfermedad en bovinos se realiza por vacunación de las terneras entre 3 y 10 meses de edad con la cepa lisa atenuada *B. abortus* S19. El primer plan de control y erradicación se llevó a cabo en 1982 (Res. 73/82) (SENASA, 2000). Los siguientes planes fueron en 1994, 1998, 1999, 2003, 2007 (Samartino, 2007). Los planes consisten en vacunación sistemática y posterior seguimiento por diagnóstico serológico de los rodeos. Luego de tres muestreos negativos consecutivos a los 60, 120 y 365 días, se considera que un rodeo se encuentra libre de brucelosis (SENASA, 2000). En 1998, se aprobó condicionalmente el uso de la vacuna *B. abortus* RB51 en hembras mayores de 10 meses y hasta 3 meses de preñez, como método para reforzar la vacunación de S19. La implementación de la misma quedaba bajo criterio del veterinario acreditado del establecimiento dependiendo de la situación epidemiológica del rodeo. Esta vacuna es más atenuada que S19, permite la revacunación y puede ser usada en animales de mayor edad debido a que no despierta anticuerpos contra el lipopolisacárido (LPS) que puedan confundir el serodiagnóstico. Sin embargo, su uso fue prohibido en 2003, dado que en la actualidad sólo se recomienda su uso en países que tienen baja prevalencia de la enfermedad (Samartino,



2007). Recientemente, el SENASA aprobó la utilización de la vacuna Rev 1 en caprinos (Res. 216/2006), pero no está autorizado su uso en ovinos (López y col., 2010).

Por otra parte, *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* pueden infectar a humanos, lo que agrava la situación. Generalmente, las infecciones más frecuentes se producen en habitantes rurales, veterinarios, personal de laboratorio, personal de mataderos y tamberos. La brucelosis en humanos está subestimada y varía mundialmente entre 0,03 a 160 cada 100.000 habitantes (Pappas y col., 2006).

## 2. *Brucella abortus*:

### 2.1. Generalidades

Las especies del género *Brucella* pertenecen a la clase  $\alpha$ -proteobacteria, orden Rhizobiales, familia Brucellaceae. El genoma de *Brucella* consiste en 2 cromosomas circulares cerrados (Jumas-Bilak y col., 1998). Los cromosomas de *B. melitensis* M16 son de 2.117.144 pb y 1.177.787 pb (DelVecchio y col., 2002b) y los de *B. abortus* 2308 son de 2.121.359 y 1.156.948 pb (Chain y col., 2005). No posee plásmidos naturales, aunque es posible la transformación por conjugación o electroporación con plásmidos de amplio rango de hospedador (Michaux-Charachon y col., 1997).

Las bacterias de este género son cocobacilos Gram negativos pequeños (0,5-0,7  $\mu\text{m}$  de diámetro por 0,5-1,5  $\mu\text{m}$  de largo) que no forman esporas. Se los considera patógenos facultativos intracelulares y su nicho replicativo son los macrófagos y otras células fagocíticas no-profesionales (Pizarro-Cerdá y col., 1998).

A diferencia de otros patógenos intracelulares, no se han encontrado sistemas de secreción tipo I y II. Sin embargo, posee un sistema de secreción tipo IV, con homología a los de *Agrobacterium*, que es imprescindible para su virulencia (O'Callaghan y col., 1999). También se detectó un sistema de secreción homólogo al tipo III en *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis*, y *B. suis* biovares 1, 2 y 3 (Abdallah y col., 2003). Si bien las bacterias de este género se consideran no móviles, se describieron marcos de lectura abiertos (Open Reading Frames: ORF) que codifican para proteínas relacionadas a estructuras flagelares (Halling, 1998) en *B. abortus*. Aunque la especie *B. melitensis* posee todos los genes estructurales necesarios para la presencia de un flagelo (revisión en Letesson y col., 2002), no se identificaron los genes que codifican para los receptores del sistema quimiotáctico (DelVecchio y col., 2002b). También se describieron 3 grupos

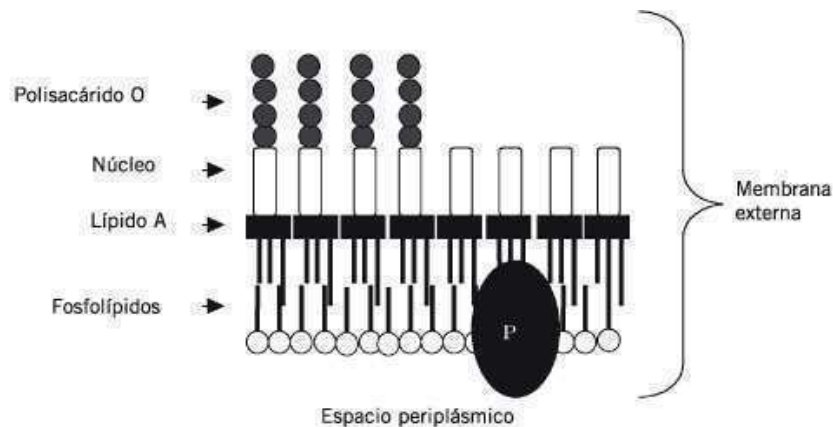
de genes flagelares en *B. melitensis* y *B. suis* (DelVecchio y col., 2002b; Paulsen y col., 2002). Se ha reportado que la expresión de los genes correspondientes a los componentes basales (anillo MS) y distales (gancho o *hook* y filamento) del aparato flagelar es inducida en *B. melitensis* en la etapa logarítmica temprana de crecimiento *in vitro* (Lestrade y col., 2003). Además, se ha observado por microscopía electrónica que en esta condición se forma una estructura semejante a un flagelo polar cubierto con LPS y esta estructura es necesaria para un proceso completo de infección en el modelo murino (Fretin y col., 2005). Todavía no se conoce en detalle la función de esta estructura flagelar, ya que no está involucrada en movilidad.

### 2.2. Características de la membrana externa

Las bacterias del género *Brucella* son Gram negativas, y como tales, poseen membrana externa e interna que encierran un espacio periplásmico con peptidoglicano (PG) y otras proteínas.

La membrana externa de *B. abortus* es altamente hidrofóbica y resistente a péptidos catiónicos y detergentes (Moriyón y Berman., 1982). Al igual que otras bacterias Gram negativas, tienen lipopolisacáridos (LPS) en esta envoltura (Figura 0.1). Dependiendo de la presencia o ausencia de la cadena O del LPS se denominan lisa (S-LPS por *smooth*) o cepa rugosa (R-LPS por *rough*) debido a su apariencia morfológica. Existen especies de *Brucella* naturalmente rugosas (*B. canis* y *B. ovis*) y hay cepas mutantes rugosas de las especies lisas (*B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*). Se ha visto que cultivos de *Brucella* S generan mezclas espontáneas de colonias S y R, siendo estas últimas mutantes R (Alton y col., 1988).

Entre las proteínas periplásmicas se encuentra la proteína BP26 que fue descrita por nuestro grupo y por otros grupos de investigación como inmunodominante en infecciones con *B. abortus* y *B. melitensis* en distintas especies animales (Cloekaert y col., 1996a y 2001; Linder y col., 1996; Rossetti y col., 1996; Arese y col., 1999). La mutante de este gen en *B. abortus* S19, resultó tener igual virulencia residual y capacidad protectora que S19 al ser evaluada en ratones (Boschioli y col., 1995 y 1997).



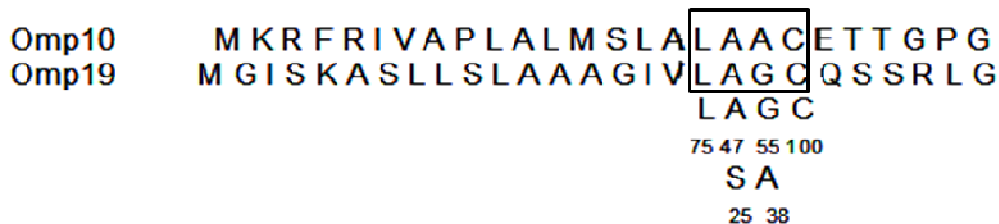
**Figura 0.1: Esquema simplificado de la membrana externa de la pared celular de *Brucella*.** Las formas rugosas carecen de la cadena O, o está reducida a pocos residuos. P: proteína (extraído de Castro y col., 2005).

### 2.3. Proteínas de membrana

Las proteínas de membrana externa (OMPs, por sus siglas en inglés), que se asocian estrechamente con el LPS, se clasifican en 3 grupos de acuerdo a sus pesos moleculares. Grupo 1, se relacionan con la biosíntesis de la propia envoltura celular (89-94 kDa), Grupo 2, equivalentes a las porinas de otras bacterias Gram negativas (35-40 kDa) y el Grupo 3, se asocian fuertemente a LPS (25-30kDa) (Cloeckaert y col., 1996b). Las más abundantes son las del Grupo 2 y 3 y se las conoce como OMPs “mayores”. Las del grupo 1, junto con proteínas de pesos moleculares de entre 10 y 20 kDa, se las conoce como OMPs “menores”. Se sabe que estas proteínas son reconocidas por el sistema inmune durante la infección, son inmunogénicas, están involucradas en la virulencia y hay antecedentes de su posible utilidad como vacunas (para una revisión ver Moriyón y Lopez-Goñi, 1998). Entre las OMPs, se ha descrito a OMP10, OMP16 y OMP19 como lipoproteínas (Figura 0.2) (Tibor y col., 1996 y 1999).

OMP 19 está asociada a la membrana externa por su residuo lipídico (grupo acilo) y se encuentra expuesta a la superficie (Tibor y col., 1996 y 1999). En el año 1991, el gen *omp19* fue clonado y caracterizado por primera vez en nuestro grupo de trabajo a partir de *B. abortus* S19 y reportado como *bmp18* (Rossetti y col., 1991). Mutantes de *B. abortus* S19 en este gen no presentaron la replicación característica de S19 a las tres semanas posinfección si bien persistieron por el mismo tiempo en ratones BALB/c, sugiriendo un rol para OMP19 en los estadios tempranos de infección (Cravero y col., 1993). Además, se ha reportado que mutantes en *omp10* y en *omp19* de la cepa virulenta *B. abortus* 544 resultaron atenuadas en ratones (Tibor y col., 2002). A su vez, mutantes

de *B. abortus* en *omp19* mostraron mayor sensibilidad al policación polimixina B y al detergente deoxicolato de sodio (Tibor y col., 2002, Campos, 2003). Estos resultados sugieren que la proteína OMP19 es necesaria para mantener la integridad de la membrana externa y que está implicada en la virulencia de *B. abortus* (Tibor y col., 1996 y 2002). OMP19 es también un antígeno inmunodominante (Vemulapalli y col., 2000a, Letesson y col., 1997; Tibor y col., 1996). En estudios en los que se expresó este antígeno en la cepa salvaje WR del virus vaccinia, se desarrolló una respuesta inmune específica contra este antígeno con un perfil tipo Th1. Sin embargo, esta respuesta inmune no llevó a protección contra la cepa virulenta *B. abortus* 2308 en ensayos de desafío en el modelo murino (Vemulapalli y col., 2000a). En este mismo trabajo, se observó que la disrupción del gen que expresa para OMP19 en la cepa vacunal *B. abortus* RB51 no afecta a la capacidad protectora ni a las características de atenuación de esta cepa (Vemulapalli y col., 2000a).



**Figura 0.2: Secuencias aminoacídicas N-terminal de Omp10 y Omp19.** Las secuencias consenso de los precursores lipoproteicos bacterianos se encuentran alineados bajo las secuencias de las OMPs (los números son las frecuencias de los residuos aminoacídicos en cientos, como fueron medidos por Hayashi y Wu, 1990). En ambas secuencias se recuadra el tetrapéptido que muestra una gran similitud con estas secuencias consenso de lipidación. (Extraído de Tibor y col., 1996)

En los últimos años, se ha estudiado en profundidad la función de las lipoproteínas en el desarrollo de la respuesta inflamatoria generada durante la infección con *Brucella*, haciendo énfasis en qué tipos celulares son activados y qué citoquinas son inducidas con la finalidad de utilizarlas como vacunas a subunidades (Zwerdling y col., 2008 y 2009; Pasquevich y col., 2009).

Las lipoproteínas presentes en *Brucella* serían suficientes para inducir la maduración de las células dendríticas (CDs) (Zwerdling y col., 2008), lo cual concuerda con resultados obtenidos con otras lipoproteínas bacterianas (Brightbill y col., 1999; Hertz y

col., 2001). Las formas lipidadas de OMP19 y OMP16 (L-OMP19 y L-OMP16) inducen la maduración de las CDs, mientras que las formas no lipidadas (U-OMP16 y U-OMP19) no la inducen (Zwerdling y col., 2008).

### 2.4. Patogenicidad

*Brucella* tiene la capacidad de adaptarse a un nicho intracelular replicativo hostil que se caracteriza por tener bajos niveles de nutrientes y oxígeno, pH ácido e intermediarios de estrés oxidativo (Köhler y col., 2002).

La infección por *Brucella* se produce directamente a través de la mucosa oronasal, por contacto con los fetos y las envolturas fetales, descargas vaginales o semen de animales infectados. En el hombre se suma el consumo de alimento contaminado, como leche sin pasteurizar y sus derivados.

Ya en la mucosa, *Brucella* puede infectar tanto células fagocíticas como no fagocíticas, si bien infecta preferentemente macrófagos. Además, puede evadir las actividades bactericidas, lo que le permite sobrevivir y multiplicarse en estas células (revisión en Smith y Ficht, 1990). Mientras que las brucellas opsonizadas son fagocitadas vía complemento y receptores Fc, las que no fueron opsonizadas parecerían penetrar vía receptores lectina o fibronectina (Campbell y col., 1994). En el fagosoma, las bacterias sobreviven y se multiplican, inhibiendo la fusión del lisosoma y fagosoma a través de una rápida acidificación del fagosoma. Estas vacuolas que contienen *Brucella*, BCV (por sus siglas en inglés), se fusionan al retículo endoplasmático (RE) tempranamente en la infección, y se produce un intercambio de material de membrana específico de esta organela (Celli y Grovel, 2004). Este nicho tiene características particulares por lo que se propuso la denominación de “brucelosoma” (Köhler y col., 2002 y 2003).

En *Brucella*, no se han detectado los clásicos factores de virulencia presentes en otras bacterias patogénicas como: exotoxinas, cápsulas, citolisinas, fimbrias, plásmidos, fagos lisogénicos, formas de resistencia o variación antigénica. Sin embargo, se han identificado varios genes involucrados en la virulencia de *Brucella* (revisión Seleem y col., 2008).

La capacidad de *B. abortus* para persistir en el hospedador y causar una enfermedad crónica está dada por mecanismos de evasión de la bacteria. Al estudiar los mecanismos de infección de *B. abortus* se observó que la fagocitosis ocurre a un tasa baja (Liautard y

col., 1996). La bacteria entra al macrófago a través de una estructura particular que son los microdominios lipídicos (Naroeni y Porte, 2002) interactuando con proteína priónica celular de macrófagos (PrpC, por sus siglas en inglés), proteína que se encuentra anclada en estas estructuras lipídicas (Watarai y col., 2003).

Se ha demostrado que el LPS juega un rol en la resistencia de *Brucella* a la muerte mediada por lisosomas (Martinez de Tejada y col., 1995). Las especies lisas de *Brucella* resisten la acidificación del medio, hasta que esta señal de maduración del fagosoma es sensada y en consecuencia la bacteria expresa factores de virulencia que se requieren para la proliferación, como ser la expresión del sistema de secreción virB (Boschiroli y col., 2002) o la proteína bacA (LeVier y col., 2000). La cadena O del LPS protege a las bacterias del ataque bactericida intra y extracelular (Godfroid y col., 1998). Las mutantes rugosas (LPS-R, sin cadena O), a diferencia de las lisas (LPS-S), muestran una sensibilidad mayor a los compuestos bactericidas (Martinez de Tejada y col., 1995) y son susceptibles a la lisis mediada por complemento (Eisenschenk y col., 1999), por lo que el LPS es considerado el factor de virulencia principal de *Brucella*.

Los productos de los genes *pgm*, *rfbE*, *pmm* y *wboA* están involucrados en distintas etapas de la síntesis de LPS. Al inactivar estos genes, se obtuvieron cepas rugosas con distintos grados de conservación del antígeno O. Todas ellas resultaron atenuadas en modelos animales de experimentación. Sin embargo, mutantes de *B. abortus* 2308 en los genes *pgm* y *rfbE* no presentaron deficiencias en su replicación intracelular en células HeLa y macrófagos murinos, respectivamente (Ugalde y col., 2000). Estos resultados han llevado a postular que la atenuación de las cepas rugosas se debe a que el LPS tendría un rol principalmente en la supervivencia extracelular de la bacteria, controlando la lisis mediada por complemento (Ko y Splitter, 2003).

Sin embargo, las cepas virulentas de *B. ovis* y *B. canis* son rugosas, lo que indica que hay otros factores que influyen en la virulencia.

### **3. Respuesta inmune contra *Brucella***

Las bacterias del género *Brucella* pueden sobrevivir en el macrófago durante toda la infección a pesar del medio hostil, por lo que para superar la infección, las células infectadas deben ser capaces de matar al microorganismo o deben ser destruidas para que entonces otros mecanismos puedan acceder a la bacteria para destruirla. La

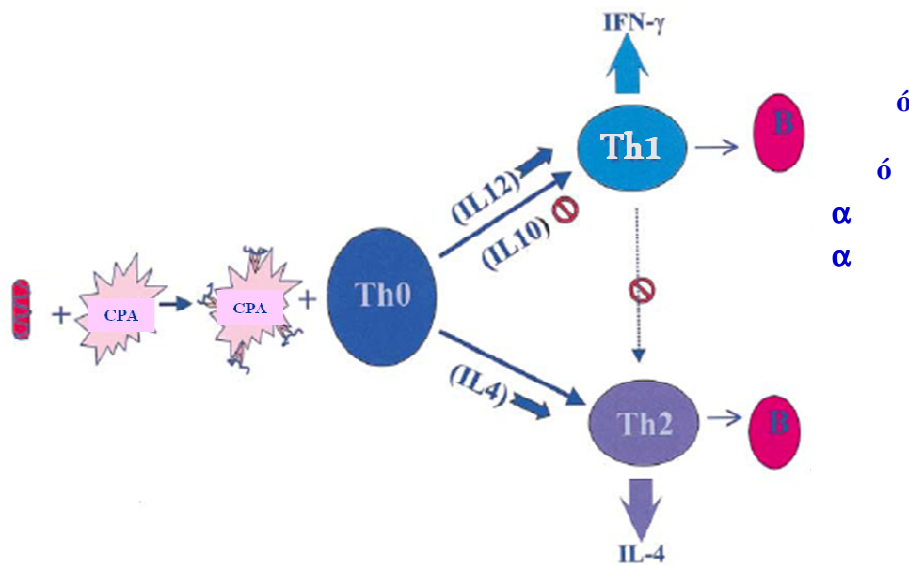
respuesta inmune del hospedador contra *Brucella* involucra la activación de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> antígeno específicas y la respuesta humoral. Esta respuesta es básicamente la misma en todas las especies de hospedadores. La respuesta protectora contra la bacteria está mediada principalmente por una respuesta inmune tipo Th1 (Zhan y Cheers, 1993).

### 3.1. Inmunidad Innata

Como primera línea de defensa las células presentadoras de antígenos (CPAs), que incluyen a los macrófagos y las células dendríticas (CDs), son activadas por medio de señales producidas por receptores celulares. Ciertos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés), que se encuentran en la pared celular bacteriana, y el LPS interactúan con las CPAs a través de los receptores celulares de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés), de los cuales los más caracterizados son los receptores de tipo Toll (TLRs) (Medzhitov y Janeway, 1997). El reconocimiento de los PAMPs provoca la activación de la célula y la subsiguiente internalización de la bacteria (Aderem y Underhill, 1999). Esto lleva a la liberación de ciertas citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e IL-6 las cuales pueden activar aún más a las CPAs. Las bacterias mueren y son procesadas y presentadas en la superficie de las CPAs en asociación a moléculas del complejo de histocompatibilidad (MHC). Las células T reconocen a los complejos péptido-MHC. Las células T activadas, activan a su vez a las CPAs por producción de citoquinas específicas. La importancia de esta primera respuesta es la de reducir el número de bacterias y promover una respuesta de tipo Th1 en el hospedador (Ko y Splitter, 2003). En el caso de *Brucella* spp., en esta respuesta temprana de la infección están involucrados los macrófagos, los neutrófilos, las células *Natural Killer* (NK) y el complemento.

La activación de las CPAs, especialmente de las CDs, lleva a la secreción de IL-12 que juega un rol importante en la activación y diferenciación de las células NK (Orange y Biron, 1996) y de las células T y B, que se diferencian en células efectoras antígeno-específicas (Metzger y col., 1996). *B. abortus* induce la secreción de esta citoquina (Zaitser y col., 1996). La señal de IL-12 hace que las células NK se activen y secreten IFN- $\gamma$  (Biron y col., 1999), lo que lleva a una diferenciación de las células Th0 a efectoras tipo Th1 y células de memoria, que a su vez secretan IFN- $\gamma$  (Figura 0.3).





**Figura 0.3: Vías de citoquinas provocadas por *B. abortus*.** *B. abortus* dispara la liberación, por parte de las CPA, de IL-12, que hace que las células Th0 se diferencien a células Th1 que secretan IFN- $\gamma$ . El IFN- $\gamma$  induce un cambio hacia la inmunoglobulina IgG2a en el ratón. Este isotipo es fijador de complemento y está asociado con la protección viral y la protección contra bacterias intracelulares (extraído de Golding y col., 2001).

Referencias: C: complemento; CPA célula presentadora de antígenos; IC: intracelular

### 3.2. Inmunidad adaptativa (adquirida)

La inmunidad adaptativa se desarrolla en respuesta a la infección y es esencial para proveer función de memoria, clave para la vacunación. Esta respuesta se clasifica en humoral y mediada por células, para facilitar su estudio.

Está ampliamente aceptado que la inmunidad mediada por células es la principal en la protección contra *Brucella*, debido a que es una bacteria intracelular, siendo clave el papel de las citoquinas para una adecuada respuesta (Oliveira y col., 1996). Las funciones de la respuesta inmune adaptativa en la infección por *Brucella* se basan en tres mecanismos. Primero, las células T CD4+ y CD8+ producen IFN- $\gamma$ . Segundo, la citotoxicidad de las células CD8+ matan a los macrófagos infectados. Tercero, anticuerpos tipo Th1, como IgG2a e IgG3 opsonizan al patógeno para facilitar la fagocitosis (Ko y Splitter, 2003). En el caso de la brucelosis la respuesta predominante es tipo Th1 (Baldwing y Roop, 1999).



### Respuesta celular

Luego de la activación de los macrófagos, las células inmaduras (Th0) se diferencian a células efectoras y de memoria que secretan diferentes patrones de citoquinas. Las células T de una respuesta de tipo Th1 secretan IFN- $\gamma$ , IL-12 y TNF $\beta$  pero no IL-4 (Zhan y col., 1995). Estas células inducen la secreción de anticuerpos por parte de las células B. En una respuesta de tipo Th1, predominan los anticuerpos IgG2a (Golding y col., 2001).

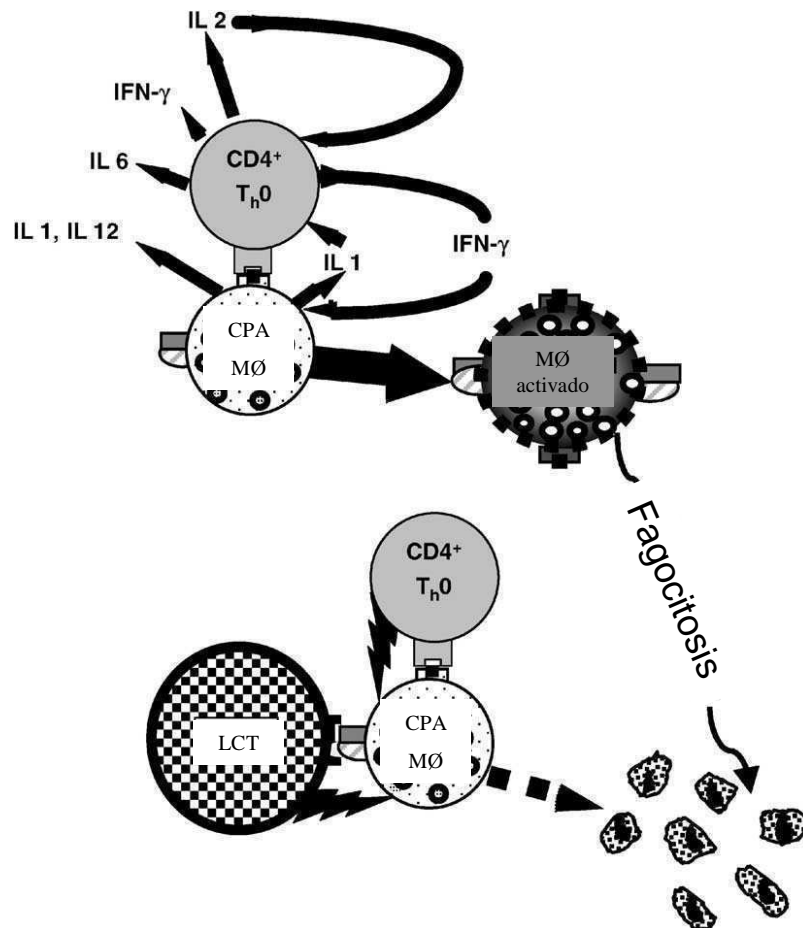
En la inmunidad contra la brucelosis, las células T secretan IFN- $\gamma$  que activa la función bactericida de los macrófagos y la actividad citotóxica de los linfocitos T. También inducen el cambio a los isotipos de anticuerpos IgG2a e IgG3 (Ko y Splitter, 2003). Los linfocitos T reconocen al antígeno específico por un receptor heterodímero compuesto de cadenas  $\alpha/\beta$  o  $\gamma/\delta$ . Los receptores T  $\alpha/\beta$  se asocian a una molécula co-receptora, CD4 o CD8. Este subgrupo de células T (células T  $\alpha/\beta$ ) sufre expansión clonal en respuesta a la vacunación o una infección y manifiesta la inmunidad específica.

Las células CD4+ y CD8+ reconocen antígenos presentados por las CPAs. Las células CD4+ reconocen antígenos en contexto del complejo de histocompatibilidad (MHC) clase II, y las células CD8+ reconocen antígenos en contexto MHC I.

En el caso de *Brucella*, ambas poblaciones celulares son estimuladas dado que los antígenos son presentados por las dos vías de presentación. Esto se debe a que un porcentaje de las bacterias internalizadas, una vez fagocitadas, son capaces de redirigirse al tráfico intracelular y replicar en compartimentos derivados del retículo endoplasmático (RE) (Wyckoff, 2002).

El componente crucial para el control de la infección con *Brucella* es el IFN- $\gamma$  y el balance de citoquinas producidas por las células T (Baldwin y Goenka, 2006). Aún no se ha esclarecido el mecanismo de acción de los linfocitos con receptores  $\gamma/\delta$ . Al activarse, estos linfocitos secretan IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , que a su vez activan la actividad bactericida de los macrófagos. Tienen actividad citotóxica y son capaces de lisar células infectadas con *Brucella in vitro* (Ko y Splitter, 2003). Los bovinos y la mayoría de los rumiantes inmaduros, a diferencia de otras especies, tienen una alta proporción de esta población celular (50 % aproximadamente) (Wyckoff, 2002). El modelo de defensa

contra la brucelosis en el ganado bovino incluye la muerte de los macrófagos infectados mediado por varias poblaciones celulares incluyendo CD4<sup>+</sup> Th0/Th1 y CD8<sup>+</sup> CTL (Figura 0.4) (Wyckoff, 2002).



**Figura 0.4:** Modelo de defensa del hospedador contra la brucelosis en el ganado bovino (Wyckoff, 2002)

Referencias: LCT: linfocito citotóxico; CPA: célula presentadora de antígenos; MØ: macrófago

### Respuesta humoral

En las infecciones con *Brucella*, los anticuerpos aparecen en los primeros estadios de la infección y habitualmente son detectables en el suero durante años. Estos anticuerpos están dirigidos contra varios componentes del microorganismo, pero especialmente contra los antígenos superficiales, particularmente el LPS (Riezu-Boj y col., 1986). Los anticuerpos producidos colaboran con la respuesta del hospedador contra el patógeno pero no son suficientes para evitar la enfermedad, seguramente debido al estilo de vida

intracelular de *Brucella* spp.. Sin embargo, la detección de anticuerpos dirigidos contra el LPS es útil para el diagnóstico y seguimiento de la infección (Gamazo y col., 1989).

Las células B son estimuladas por las células T a través de la interacción con moléculas coestimuladoras, como CD40 y su ligando CD40L presente en las células T, y junto a las citoquinas liberadas son importantes en el cambio de isotipo de anticuerpo de IgM a IgG (Golding y col., 2001). Los azúcares distintivos de la cadena O de los LPS de las cepas lisas de *Brucella* son altamente eficientes en promover la producción de anticuerpos (Montaraz y col., 1986). Además, el LPS de *Brucella* es un prototípico antígeno independiente de células T, dado que puede activar a las células B para producir los anticuerpos IgG3 e IgM sin la ayuda de las células T helper (Betts y col., 1993). En el modelo murino, varios experimentos de transferencia pasiva de anticuerpos sugieren un papel importante de la respuesta humoral en la brucelosis, aunque esta respuesta no es suficiente para generar inmunidad (Araya y col., 1989; Montaraz y col., 1986, Ko y Splitter, 2003).

Los anticuerpos tienen la capacidad de opsonizar, activar el complemento para matar a las bacterias, aglutinar bacterias para su eliminación, mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés) y unirse a receptores bacterianos evitando la adherencia de las bacterias a las células hospedadoras. A su vez, los anticuerpos pueden tener un impacto negativo en el control de la infección. En la brucelosis bovina, las altas concentraciones de IgG previenen la lisis bacteriana extracelular mediada por complemento y promueven la fagocitosis de la bacteria, lo que aumentaría su localización intracelular y la extensión de la enfermedad (Ko y Splitter, 2003).

### **Citoquinas**

Las citoquinas claves para el control de la brucelosis son principalmente IFN- $\gamma$  (Oliveira y col., 1996), IL-12 y TNF $\alpha$ . Las células B y los macrófagos secretan IL-12 que dirige la respuesta inmune a una respuesta de tipo Th1, secretando IFN- $\gamma$  (Splitter y col., 1996; Ko y Splitter, 2003) y TNF $\alpha$  que activan la capacidad bactericida de los macrófagos. Sin embargo, otros autores señalan que *Brucella* no es un inductor potente de la secreción de IL-12 (Pasquali y col., 2001). En estudios de neutralización de TNF- $\alpha$  con anticuerpos, se observó que era necesaria la producción endógena de TNF- $\alpha$  durante

las primeras 24 h luego de la infección para una óptima muerte de *Brucella* por parte de los macrófagos (Baldwin y Goenka, 2006).

La IL-18 interactúa sinérgicamente con IL-12 sobre las células T en la respuesta mediada por células contra la brucelosis (Pasquali y col., 2002). La citoquina pro-inflamatoria, IL-10, afecta tanto la producción de IL-12 como la capacidad de las células de responder a IL-12, al disminuir la expresión del receptor de IL-12, IL-12R $\beta$ 2 (Wu y col., 1997). Esta citoquina es producida por macrófagos y linfocitos (Mosmann, 1991).

El IFN- $\gamma$  es la principal citoquina efectora para la activación de macrófagos, los cuales son esenciales para la inhibición de la replicación de los patógenos microbianos intracelulares y para lograr su muerte. Se observó que la cepa S19 induce IFN- $\gamma$  en ratones CBA y C57BL/6 (Araya y Winter, 1990); y que las células productoras de esta citoquina son células T CD4+ y CD8+ y macrófagos (Baldwin y Goenka, 2006).

Existen evidencias que sugieren que la producción de IFN- $\gamma$  previene que la *Brucella* se establezca en su nicho, pero una vez que el bruceloso ya se encuentra establecido esta citoquina no produce ningún efecto en la limitación del número de bacterias (Baldwin y Goenka, 2006). Todas las cepas de *Brucella* que son patógenas para los humanos parecen ser susceptibles al IFN- $\gamma$  (Leonard y col., 1997).

#### **4. Modelo murino para el estudio de la Brucelosis**

A pesar de que el mejor modelo animal es el hospedador primario, su utilización se ve dificultada por la complejidad y los costos de trabajar con animales grandes así como la falta de líneas homogéneas que permitan la reproducibilidad de los resultados. Para la infección con *Brucella*, se han desarrollado modelos experimentales con animales de laboratorio (Nicoletti, 1990). Para los primeros ensayos de protección de potenciales nuevas vacunas, el modelo empleado es el ratón dado que el número de bacterias recuperadas de las cepas virulentas de *Brucella* en bazo después del desafío es inversamente proporcional a la inmunogenicidad despertada por la vacuna (García-Carrillo, 1990). Está documentado que las cepas de *Brucella* que son atenuadas y eficaces en el modelo murino, generalmente son seguras y protectivas en el rumiante (Schurig y col., 1991).

El abordaje experimental más ampliamente usado para el análisis de la respuesta inmune consiste en la infección intraperitoneal de una cepa susceptible de ratón (por

ejemplo, BALB/c) con la cepa a estudiar de *B. abortus*, *B. melitensis* o *B. suis* y luego se realiza el recuento de bacterias viables en el bazo y/o en el hígado (Baldwin, 2002) y la cuantificación de la respuesta por técnicas inmunológicas. Se distinguen cuatro fases de infección: (1) temprana, de crecimiento bacteriano activo; (2) bactericida, de 7 a 21 días posinfección; (3) de plateau, cuya duración depende de la virulencia de la cepa y (4) la fase de recuperación. Los niveles de agentes quimiotácticos se incrementan notablemente con un máximo alcanzado a los 5 a 7 días posinfección (Smith y Ficht, 1990). Durante este tiempo se observa el inicio de la esplenomegalia ya que grandes cantidades de fagocitos, especialmente monocitos, se infiltran en el bazo respondiendo a los agentes quimiotácticos.

La evaluación de las nuevas vacunas consta del desafío de los ratones con una cepa patógena, luego de que las cepas vacunales fueron eliminadas del organismo (generalmente entre 40 y 70 días post vacunación). Posteriormente, se evalúa el control de la infección por recuento de bacterias de la cepa de desafío en bazo o hígado. Las cepas de desafío generalmente utilizadas son las cepas *B. abortus* 544 y 2308 (Nicoletti, 1990).

### **5. Vacunas para brucelosis**

Es sabido que la vacunación es esencial para controlar la brucelosis en el ganado bovino. Idealmente, una vacuna no debe producir enfermedad en el animal vacunado, debe ser no transmisible a otros animales, debe ser biológicamente estable y debe ser inocua para el humano. La inclusión de marcadores que la hagan distinguible de las cepas de campo la haría más ventajosa desde el punto de vista del diagnóstico y seguimiento (WHO, 1997). En el caso de la brucelosis, se han utilizado como vacunas cepas bacterianas atenuadas y proteínas propias de *Brucella*. La capacidad de que la vacuna sea capaz de inducir en forma preferencial una respuesta Th1 es un aspecto importante a considerar en el desarrollo de vacunas contra *B. abortus* (Oliveira y col., 1996).

En la actualidad, se están utilizando dos cepas lisas vacunales, S19 para ganado bovino y Rev1 para pequeños rumiantes, y una cepa rugosa, RB51 para los bovinos principalmente. Sin embargo, se sigue investigando sobre la generación de nuevas vacunas contra la brucelosis debido a varias desventajas de estas cepas. Más adelante se

detallan las características de las cepas vacunales actualmente en uso y los avances en el campo de la investigación de generación de nuevas vacunas.

### 5.1. Cepas vacunales en uso

#### 5.1.1. Cepas lisas

##### ***B. abortus* S19**

Esta cepa fue aislada en 1923 por Buck a partir de un cultivo de leche de una vaca Jersey infectada. Después de un año de mantenimiento en medio sólido a temperatura ambiente la cepa resultó atenuada (Buck, 1930).

Esta cepa tiene múltiples mutaciones que, en la mayoría de los casos, son difíciles de asociar a la atenuación. Se han identificado 24 posibles genes involucrados en la atenuación de los 263 que no son idénticos con respecto a alguna de las 2 cepas virulentas secuenciadas 2308 ó 9-941. De estos 24, cuatro son de particular relevancia. De ellos, uno codifica en las cepas virulentas para una proteína de membrana y tres para proteínas involucradas en el metabolismo o la captación del eritritol. La delección del gen que codifica para la proteína de membrana también se encuentra en *B. suis*, indicando que es poco probable que esta delección esté involucrada en la atenuación (Cresta y col., 2008).

El crecimiento de S19 se ve inhibido en presencia de eritritol, un hidrato de carbono que está presente en grandes cantidades en el tejido placentario de los rumiantes, el cual es utilizado por *Brucella* en preferencia a la glucosa. Esta cepa carece de la enzima D-eritruosa-1-fosfato hidrogenasa debido a una delección en el locus *ery* (Sangari y col., 1994). Esto provoca que se acumule el intermediario tóxico D-eritruosa-1-fosfato lo cual a su vez reduce los niveles de ATP en presencia de eritritol, provocando una inhibición del crecimiento bacteriano (Sperry y Robertson, 1975). Esta incapacidad para catabolizar el eritritol es en parte responsable de la alteración de esta cepa, si bien no es el único factor. De hecho, esta alteración no está relacionado con la atenuación de la cepa en el modelo murino (Sangari y col., 1998). En el ratón, en el que el eritritol no es un componente principal de sus tejidos, una mutante *knock out* de la cepa 2308 ( $\Delta eryCD$ ) no muestra atenuación (Sangari y col., 1998). Estos resultados sugieren que S19 perdió algún otro factor esencial adicional, aún no conocido, para la virulencia en el

ratón (Crasta y col., 2008). También se postula que la delección en el ORF que corresponde a BAB2\_0376 en S19 codificaría para un putativo transportador de eritritol lo que contribuiría aún más en la incapacidad de S19 de catabolizar el eritritol (Crasta y col., 2008).

Otras proteínas con posible relevancia en la atenuación de S19 incluyen cuatro proteínas involucradas en el transporte y metabolismo de lípidos, dos proteínas involucradas en la transcripción, dos proteínas de transporte, dos proteínas de membrana, y otras proteínas hipotéticas. Sin embargo, el rol de estas proteínas en los mecanismos de virulencia de *Brucella* no ha sido claramente establecido y es necesario hacer experimentos usando mutantes que no expresen dichas proteínas y estudiar las características de infección de las mismas en los huéspedes para poder tener mayor certeza de la función que cumplen (Crasta y col., 2008).

*B. abortus* S19 es la cepa vacunal viva de mayor uso contra la brucelosis bovina. Confiere entre un 70-80% de protección contra el aborto y 50-60% contra la infección frente al desafío con cepas patógenas (García-Carrillo, 1980). La tasa de aborto causada por esta cepa es baja (menos de 1% en un ensayo realizado con más de 10.000 vacas con 7 u 8 meses de gestación) (Moriyón y col., 2004). Su efectividad depende de la vía de inoculación, de la dosis, la edad del animal y de la prevalencia de la brucelosis en el rebaño vacunado (revisión en Schurig y col., 2002)

*B. abortus* S19 mantiene las propiedades inmunogénicas y es estable. Pero tiene varias desventajas. Además de la ya mencionada potencialidad de inducir abortos, tienen virulencia residual en humanos (Moriyón y col., 2004). Además, si se vacunan animales adultos los anticuerpos generados interfieren con el diagnóstico de bovinos infectados (Moriyón y col., 2004).

Con respecto al potencial desarrollo de nuevas vacunas utilizando la cepa vacunal S19, esta cepa tiene el atributo de su gran estabilidad, ya que no se han detectado reversiones a la cepa virulenta, y la ventaja de que existe una gran experiencia acumulada en diferentes modelos animales.

S19 continúa siendo la vacuna de elección en nuestro país y en otros países de alta prevalencia. En EE.UU. su uso fue discontinuado a fines de la década del 90 para favorecer el uso de la cepa vacunal no reactiva serológicamente, RB51 (Ficht y col., 2009).

### ***B. melitensis* Rev1.**

Esta es la cepa vacunal utilizada en la actualidad para pequeños rumiantes, cabras y ovejas, si bien su uso es cuestionado y no está permitido en algunas regiones libres de *B. melitensis*, como la Patagonia Argentina. La misma se obtuvo a partir de un aislamiento virulento de *B. melitensis* resistente a estreptomicina que luego de sucesivos pasajes resultó atenuada. Mantiene una virulencia residual considerable y puede ser abortiva cuando se administra a animales preñados (revisión en Blasco, 1997; Schurig y col., 2002). Entre otras desventajas, se secreta en leche (Banai, 2002), puede provocar infección en humanos (revisión en Blasco, 1997) y es resistente a estreptomicina, uno de los antibióticos de elección para el tratamiento de la enfermedad en combinación con la tetraciclina (Moriyón y col., 2004). Al igual que S19, los anticuerpos producidos por esta cepa lisa también interfieren con el diagnóstico de ganado infectado con la cepa salvaje (revisión en Blasco, 1997; Nicoletti, 1990). Su uso está prohibido en áreas libres de *B. melitensis*, lo que genera un problema para el control de *B. ovis* (Blasco y Díaz, 1993).

### **5.1.2. Cepas rugosas**

Si se hacen sucesivos pasajes de cepas lisas *in vivo* o *in vitro*, se produce una disociación espontánea de S→R, en una frecuencia que depende de la cepa y las condiciones de crecimiento. Así se generaron las cepas rugosas 45/20 y RB51 (Moriyón y col., 2004). Otra metodología para obtener cepas rugosas es por medio de métodos de genética molecular como el uso de mutagénesis por transposones o delección de genes que estén involucrados en la biosíntesis de S-LPS (Allen y col., 1998; Godfroid y col., 1998; Ugalde y col., 2000).

La ventaja principal de estas cepas es que no producen anticuerpos contra el antígeno O del LPS por lo que durante el diagnóstico se pueden diferenciar animales infectados de vacunados.

La desventaja principal que se les atribuye a las cepas rugosas es su sobreatenuación y su rápida eliminación del animal, lo que puede resultar en un estímulo antigénico ineficiente (Moriyón y col., 2004) y en menor protección (Samartino, 2002).



### ***B. abortus* RB51.**

A partir de sucesivos pasajes de la cepa patógena *B. abortus* 2308 en un medio que contenía rifampicina y ampicilina, se obtuvo la cepa rugosa atenuada *B. abortus* RB51 (Schurig y col., 1991). Esta cepa contiene el transposón IS711 espontáneamente insertado en el gen *wboA* que codifica para la enzima glucosiltransferasa, responsable de la síntesis de la cadena O (Vemulapalli y col., 2000b). Una mutante de *B. abortus* en *wboA* no es tan atenuada como RB51 y es más protectora que RB51 en el modelo de ratón. La complementación de RB51 con *wboA* aumenta la expresión de la cadena O pero no restaura el fenotipo S (Vemulapalli y col., 2000b). Esta falta de complementación indicaría que otros genes involucrados en la síntesis de LPS estarían también alterados en su expresión en RB51 posiblemente por mutaciones adicionales aún no conocidas (Moriyón y col., 2004). Esta cepa es estable (Schurig y col., 1991) y en la actualidad se encuentra en uso en los EE. UU. y Chile mientras que en varios países está en proceso de evaluación. Sin embargo, su uso aún es controversial debido al menor resultado en la protección del ganado comparada con la cepa S19 (Samartino, 2002). Además, no es capaz de proteger ovejas, bisontes, renos y en cerdos mostró resultados variados (revisión en Moriyón y col., 2004). Existen informes que indican que sería protectora a la infección y transmisión vertical en ratas (Islam y col., 2009). Aunque RB51 tendría baja o casi ninguna virulencia en el hombre, se ha descrito por lo menos un caso de infección por RB51 en un veterinario, demostrado por aislamiento bacteriológico y tipificación de la cepa (revisión en Moriyón y col., 2004). Además, es resistente a rifampicina que es el antibiótico utilizado en casos particulares (embarazadas, niños, casos de neurobrucelosis).

Sin embargo, hasta el momento es la única vacuna aprobada para bovinos adultos y por ello la incluimos en este estudio.

## **5.2. Nuevas vacunas**

### **Vacunas atenuadas vivas.**

Una valiosa estrategia para la generación de nuevas vacunas es la obtención de cepas atenuadas mediante la mutación de factores de virulencia o de genes involucrados en procesos metabólicos de la bacteria. Como en todos los casos, se evalúa la virulencia

residual y se realizan ensayos de protección comparándolas con los niveles de protección de las cepas vacunales en uso.

Hay pocos datos sobre mutantes en genes que codifican para factores de virulencia que hayan sido probadas en su capacidad protectora en ratones; y de esas mutantes, los datos sobre su efecto protectoro en el hospedador natural aún son menores (para una revisión ver Ko y Splitter, 2003).

Entre las mutantes que se han evaluado como vacuna viva podemos mencionar: una mutante de *B. abortus* en el gen que codifica para la proteína **EXSA**, que mostró menor supervivencia que la cepa salvaje pero con mayor capacidad protectora que S19 y RB51 (Rosinha y col., 2002); una mutante *B. melitensis* en el gen **omp25** que es más atenuada que Rev1, pero con igual capacidad protectora en ratones contra una cepa patogénica de *B. melitensis*. Esta mutante tuvo, además, mayor capacidad protectora contra *B. ovis* (Edmonds y col., 2002).

También se realizaron experimentos con mutantes de la cepa vacunal *B. abortus* S19 en los genes **cgs** (Briones y col., 2001), **omp19** (previamente denominada *bmp18*) (Cravero y col., 1993; Campos y col., 2002), **znuA** (Yang y col., 2006), **vjbR** (Arenas-Gamboa y col., 2009) y con una doble mutante **purE-znuA** (Yang y col., 2010). Todas estas mutantes confirieron una protección de niveles similares a la cepa vacunal S19, pero fueron más atenuadas en ratones.

Otras mutantes generadas a partir de *B. melitensis* son una simple mutante en el gen **bp26** y una doble mutante en **bp26** y **omp31** (Cloekaert y col., 2004). Ambas fueron estudiadas en ovejas y cabras, y en los dos hospedadores se observó que las mutantes protegen contra *B. melitensis*, siendo la protección de la mutante en **bp26** mayor que la de la doble mutante y de niveles similares a los generados por la cepa vacunal Rev 1 (Jacques y col., 2007; Grilló y col., 2009). Por otro lado, se generaron mutantes de *B. abortus* en el gen **bp26** y una doble mutante en **bp26** y **omp19** que mantuvieron niveles de protección similares a los de la cepa vacunal S19 en ratón (Campos y col., 2002). Sin embargo, en el caso de la mutante en **omp19**, con la cual se realizaron ensayos en su hospedador natural, el ganado bovino, se observó menor protección que S19 en contraposición a lo observado en el modelo murino (Fiorentino y col., 2008).

Además, se ha desarrollado una mutante rugosa de *B. abortus* S2308 con disrupción del gen **pgm**, que codifica para fosfoglucomutasa,  $\Delta$ *pgm* (Ugalde y col., 2000). La vacunación de ratones con la cepa  $\Delta$ *pgm* generó una protección similar a la inducida por

S19. Se produjo una respuesta proliferativa de esplenocitos y un patrón de citoquinas típico de respuesta de tipo Th1. No se detectaron anticuerpos anti-antígeno O lo que daría una ventaja sobre la cepa vacunal S19 (Ugalde y col., 2003). En la actualidad, se están llevando a cabo estudios de esta nueva cepa como potencial vacuna en ganado bovino.

### **Vacunas no-vivas**

Si bien las vacunas no-vivas son las más seguras ya que se evita la posibilidad de infección, son generalmente ineficientes para despertar una respuesta inmune mediada por células (IMC). Entre las vacunas no-vivas, se han ensayado vacunas inactivadas, vacunas subcelulares y vacunas basadas en ácidos nucleicos:

- **Cepas inactivadas:**

Debido a la falta de procesamiento y presentación de antígenos por la vía endógena, necesaria para la inducción de una respuesta Th1 y las células CD8+, las vacunas muertas no tienen la capacidad de promover niveles de protección adecuados frente a patógenos intracelulares.

- **Vacunas subcelulares:**

Se ha analizado la capacidad de varios antígenos y fracciones subcelulares (como membranas celulares, LPS liso y rugoso) de generar una respuesta inmune mediada por células. Entre los antígenos seleccionados se estudiaron: las lipoproteína de membrana **OMP19** (Rossetti y col, 1991, Tibor y col., 1996) y su forma no lipidada, U-OMP19 (Pasquevich y col., 2009 y 2011), la lipoproteína **OMP16** (Pakevich y col., 2010), la proteína periplásmica **P39**, la proteína ribosomal **L7/L12** (revisiones en Oliveira y col., 2002 y Ko y Splitter, 2003) y **OMP 31** (Cassataro y col., 2007a). También se han analizado proteínas de choque térmico como **GroEL**, **GroES**, **HtrA** y **UvrA**, todos altamente inmunogénicos en el transcurso de la infección con *Brucella* (Roop II y col., 1994; Oliveira y col., 1996). Hasta el momento no hay resultados de niveles de protección similares a las vacunas tradicionales en ninguno de los casos.

- **Vacunas ADN y ARN:**

El principio de esta metodología se basa en la expresión *in vivo* de algún antígeno seleccionado que inducirá una respuesta inmunológica protectora. En el caso de la brucelosis, las vacunas de ADN estudiadas hasta el momento que indujeron un nivel significativo de protección en el modelo murino son las que contienen los genes que codifican para **L7/L12**, **lumazina sintetasa** y para **OMP31** (Kurar y Splitter, 1997; Velikovsky y col., 2002, Cassataro y col., 2007b). También se describió que un plásmido ADN que codifica para la proteína **SOD Cu/Zn** (pcDNA SOD) promueve, en ratones, la producción de anticuerpos específicos contra la proteína recombinante rSOD, preferentemente del isotipo IgG2a sobre IgG1, lo que produce una respuesta proliferativa de células T con inducción de IFN- $\gamma$ , pero no de IL10 e IL-4 característico de una respuesta de tipo Th1. Así, esta estrategia vacunal promovió una respuesta protectora en ratones (Oñate y col., 2003). Además, los primeros ensayos en ganado sugieren que esta vacuna induce inmunidad mediada por células (Sáez y col., 2008).

Las vacunas a ARN consisten en partículas virales suicidas del virus Semliki Forest (VSF), cuya secuencia contiene el gen que expresa para el antígeno seleccionado.

Se ha evaluado la inducción de respuesta inmune y protección en un modelo murino, por un ARN recombinante que codifica para la proteína SOD Cu/Zn de *B. abortus* empaquetado en el interior de partículas suicidas del virus Semliki Forest (VSF-SOD), obteniéndose resultados similares a los obtenidos con el plásmido pcDNA SOD. La construcción generó una respuesta inmune de tipo Th1, con la inducción de proliferación de linfocitos T antígeno específica y activación de células T citotóxicas. Además, VSF-SOD fue protectoro en ratones (Oñate y col., 2005) y en ensayos en ganado bovino indujo inmunidad mediada por células (Sáez y col., 2008).

### **6. Sistemas de expresión heteróloga con el fin de vacunación**

Las cepas atenuadas de las bacterias intracelulares como *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella* o *Mycobacterium bovis* BCG (BCG), y los vectores Vaccinia han sido estudiados por su potencial como vectores de expresión de antígenos heterólogos. La ventaja del uso de *carriers* vivos de antígenos es que generan tanto respuesta inmune humoral como mediada por células, los antígenos heterólogos no sólo

son conducidos a una vía de presentación correcta, si no que también generan un contexto de citoquinas adecuado para promover respuestas específicas contra el antígeno. Otra ventaja de estos sistemas es el bajo costo de producción que además facilita su aplicación en los programas de vacunación.

### **Vectores virales**

Los virus se adhieren y penetran la membrana celular a través de receptores virales. Los virus pueden ser modificados como vectores para expresar antígenos de otros patógenos. Se presenta el antígeno heterólogo al sistema inmune en el contexto de una infección de forma tal que el sistema inmune responda al antígeno como un inmunógeno “vivo” y de esta forma se desarrolle tanto una respuesta humoral como celular ante la presencia del patógeno. El ADN viral es utilizado como molde para expresar las proteínas utilizando la maquinaria celular; y estas son transportadas a través de la vía endógena de las CPAs donde se asocian con las moléculas del MHC clase I y son presentadas a las células T CD8+ (Bona y col., 1998).

Los vectores virales que se encuentran en estudio en la actualidad son el virus vaccinia (un proxvirus utilizado en el programa de inmunización que erradicó la viruela) y sus derivados, (para una revisión ver Pastoret y Vanderplasschen, 2003), avipoxvirus (canarypox y fowlpox) (Zanotto y col., 2010 y Pantaleo y col., 2010) y adenovirus (Liu, 2010). Han sido utilizados para expresar antígenos de una variedad de virus animales como: hepatitis B, hepatitis C, stomatitis vesicular, herpes simplex, rabia, parainfluenza y HIV (Zanotto y col., 2010; Pantaleo y col., 2010). También han sido utilizados para el desarrollo de inmunidad antitumoral (Donson y Foreman, 1998). Otros vectores virales en estudio son los herpes virus simples (HVS) junto con sus derivados (para una revisión Griffiths y col., 2006). La principal limitación de estos vectores es la posible preinmunidad que pudiera existir, lo que debilitaría la efectividad del vector. También existe el temor de posibles integraciones al genoma. Con respecto a los adenovirus, se ha observado una reacción inflamatoria con el uso de los mismos (Bråve y col., 2005).

Se han expresado varios antígenos de *B. abortus* usando al virus vaccinia como vector de expresión. Entre ellos se expresaron GroEL y GroES (Bae y col., 2002), la proteína ribosomal L7/L12 (Baloglu y col., 2005) y la superóxido dismutasa Cu/Zn (SOD) (Toth y col., 1995), pero su uso para vacunación no ha prosperado.

### Vectores bacterianos

Se han utilizado vehículos bacterianos vivos para inducir respuestas inmunes contra ellos mismos o contra los antígenos heterólogos que expresan. La existencia de cepas atenuadas, que establecen una infección limitada e “imitan” la enfermedad natural activando todas las vías del sistema inmune tanto a nivel de mucosas como sistémico, permite considerarlas como herramienta para el control de enfermedades y como posible vehículo de antígenos heterólogos (Drabner y Guzman, 2001; Medina y Guzman, 2000). Las bacterias más utilizadas son *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., *Shigella* spp. (las tres Gram negativas), y las Gram positivas *Mycobacterium* spp., *Listeria monocytogenes* y Bacterias Ácido-Lácticas (BAL), y todas han sido estudiadas como efectivos vectores de expresión (para una revisión referirse a Drabner y Guzman, 2001 y Detmer y Glenting, 2006). Dado el amplio espectro de respuestas que generan los vehículos bacterianos, se ha propuesto su utilización no sólo para prevenir enfermedades infecciosas, sino también para controlar varios problemas clínicos como: desordenes autoinmunes, alergias, cáncer, etc. (Drabner y Guzman, 2001).

A partir de mediados de los años 90s, también se han utilizado vectores bacterianos como transportadores de ácidos nucleicos (vacunas ADN) (revisión en Xiang y col., 2010 y Drabner y Guzman, 2001; Sizemore y col., 1997). La bacteria se convierte solamente en un vehículo del ADN plasmídico, ya que el mismo contiene un promotor eucarionte. Este enfoque no sólo ha sido estudiado para el control de enfermedades infecciosas sino también como profilaxis contra el cáncer (Drabner y Guzman, 2001).

### 7. *Brucella abortus* como sistema de expresión heteróloga

A partir de mediados de los años 90, con el desarrollo de plásmidos replicativos en *B. abortus* (Kovach y col., 1994 y 1995), se ampliaron las perspectivas para el uso de este microorganismo como sistema de expresión heteróloga.

Previamente a los primeros trabajos con *B. abortus* como sistema de expresión se había demostrado que este patógeno inactivado por irradiación puede ser utilizado como adyuvante de antígenos. Golding y colaboradores conjugaron gp120 recombinante de VIH-1 o un péptido derivado de la región variable 3 de gp120 (V3), obteniendo anticuerpos específicos en el modelo murino con preponderancia del isotipo IgG2a

(Golding y col., 1995); además, se observó que este microorganismo conjugado a otro péptido sintético derivado de la región V3 también genera una respuesta celular citotóxica (Lapham y col., 1996).

En 1998, Comerci y colaboradores expresaron, por primera vez, un antígeno heterólogo en la cepa vacunal de *B. abortus* S19. En ese trabajo, desarrollaron un plásmido, en base al vector pBBR4MCS, que contiene la secuencia regulatoria y la secuencia del péptido señal del gen *bcp31* de *Brucella*. Se expresó establemente en dicho plásmido una quimera de un antígeno repetitivo de *T. cruzi* en fusión a este péptido señal, generándose una buena respuesta de anticuerpos específica contra la proteína heteróloga (Comerci y col., 1998). El objetivo de estos ensayos era la marcación de S19 de manera de poder distinguir la respuesta inmune contra las cepas de campo de *Brucella* de la respuesta contra la vacuna.

Con la intención de aumentar la inmunogenicidad de la cepa vacunal RB51, se realizaron ensayos expresando la proteína HSP65 de *Mycobacterium bovis* y  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* bajo el control de los promotores de *sod* y *groE* de *B. abortus*. Se detectó mayor expresión de  $\beta$ -galactosidasa bajo el promotor de *groE* y esta proteína generó una respuesta celular y de anticuerpos específica con un isotipo preferencial de IgG2a y liberación de IFN- $\gamma$ , pero no de IL-4, ante la estimulación con la proteína recombinante. Este tipo de perfil de citoquinas, característico de una respuesta tipo Th1 también se observó en las cepas RB51 recombinantes que expresaban únicamente HSP65. Estas recombinantes no se vieron afectadas en su atenuación aunque tampoco aumentó su capacidad protectora contra la cepa salvaje de 2308 de *B. abortus* (Vemulapalli y col., 2000c).

Más recientemente, y en paralelo con esta tesis, en la cepa RB51 también se expresaron individualmente distintos antígenos protectivos del parásito protozoario *Neospora caninum* como: MIC1, MIC3, GRA2, GRA6, GRA7 y SRS2. Luego de la inmunización con las cepas recombinantes, los linfocitos obtenidos de los bazos de los ratones inoculados secretaron altos niveles de IFN- $\gamma$  e IL-10 ante su estimulación *in vitro* con antígenos provenientes de lisados totales de células de *N. caninum*. Se detectaron anticuerpos específicos del subtipo IgG1 e IgG2a en los sueros de los ratones inoculados. Además, se observó una protección completa en el grupo de ratones MIC1 y GRA6, y los grupos SRS2, GRA2 y MIC3 tuvieron una protección parcial cuando se los desafió con *N. caninum*, con una mortalidad del 10 al 50% (Ramamoorthy y col., 2007a;



Vemulapalli y col., 2007). Este grupo también observó que estas cepas inducen una protección sustancial contra la transmisión vertical de *N. caninum* en el modelo murino (Ramamoorthy y col., 2007b).

### 8. Otros patógenos de interés veterinario

#### 8.1. *Babesia bovis*: Babesiosis bovina

Las enfermedades transmitidas por garrapatas (ETG) son responsables de grandes pérdidas económicas debido a la pérdida de peso y la muerte por anemia del ganado en regiones tropicales y subtropicales en todo el mundo (Jonsson y col., 2008). La babesiosis y la anaplasmosis son los dos componentes del bien conocido síndrome "Tristeza Bovina", y ambas comparten características clínicas y epidemiológicas comunes, aunque los agentes causales presentan rasgos morfológicos, patogenicidad, ciclos de desarrollo, transmisión y susceptibilidad a las drogas diferentes.

La tristeza bovina puede ser causada por hemoprotozoarios intra-eritrocítico del género *Babesia* (*B. bigemina* y *B. bovis*), como es el caso de la babesiosis (Hunfeldt y col., 2008); o por Rickettsia como *Anaplasma marginale* que es responsable de la anaplasmosis. Ambas son transmitidas por garrapatas del género *Boophilus*, aunque *Anaplasma* spp. también puede transmitirse por garrapatas del género *Dermacentor* (revisión en Jonsson y col., 2008).

Estas enfermedades se caracterizan por una lisis eritrocítica extensiva que lleva a la anemia, la ictericia y la muerte (Ristic y Carson, 1977). Los animales con infecciones persistentes son clínicamente sanos pero sirven como reservorios para la transmisión del organismo.

En nuestro país, la zona endémica de la babesiosis se encuentra en el Noreste y Noroeste Argentino. El número de bovinos infectados con *B. bovis* o *Anaplasma marginale* alcanza los 9.900.000 animales, lo que constituye el 19% de la población bovina total del país. Las pérdidas directas y los costos para el tratamiento y la prevención de estas enfermedades se han estimado en 38,9 millones de dólares por año (Späth y col., 1994).

Las medidas que se toman para el control de la enfermedad incluyen el control químico de las garrapatas, el tratamiento del ganado, vacunación y quimioprofilaxis (Jonsson y col., 2008). En la actualidad, el control químico de las garrapatas se



encuentra limitado por la existencia de vectores resistentes a acaricidas y por el temor de la existencia de residuos en la carne y en la leche (Shkap y col., 2007). Se necesita de la respuesta innata y adaptativa para controlar la infección por *Babesia* (Brown y col., 2006a). Los mecanismos de la respuesta adaptativa serían por una respuesta rápida de las células de memoria y las efectoras T CD4<sup>+</sup> que secretan IFN- $\gamma$ , activando así a las células fagocíticas y estimulando la producción de anticuerpos por las células B (Brown y col., 2006a; Norimine y col., 2003). Se cree que la variación antigénica es la responsable de que el sistema inmune del hospedador sea incapaz de generar una respuesta protectora fuerte (Allred y Al-Khedery, 2006).

En la actualidad, se están utilizando en las áreas endémicas vacunas atenuadas contra *B. bovis* y *B. bigemina* que son relativamente eficientes y ofrecen razonables niveles de protección de largo plazo (Pérez de León y col., 2010). La vacuna más utilizada contiene eritrocitos parasitados con cepas de *B. bovis* y de *B. bigemina* atenuadas (Mangold y col., 1996). Sin embargo, estas vacunas son inseguras ya que son derivados de células sanguíneas bovinas lo que podría provocar la dispersión de otras enfermedades, dificulta su estandarización como vacuna, además existe el peligro de reversión a las formas patogénicas (Timms y col., 1990) y requieren cadena de frío para su conservación. Además, dificulta el diagnóstico dado que los animales se vuelven seropositivos con la vacunación y no pueden diferenciarse los animales vacunados de los infectados (Pérez de León y col., 2010). También existe un potencial riesgo de pérdida de la inmunogenicidad al mantenerlo *in vitro* por períodos largos (Bock y col., 2004).

Se han realizado estudios de vacunas a subunidad en los últimos años, siendo RAP1 el antígeno con el que se han obtenido mejores resultados. (Brown y col., 2006b, Normine y col., 2003; Wirght y col., 1992).

### **Proteína asociada a roptria (RAP1, por su sigla en inglés)**

La proteína RAP1 de los complejos apicales de *Babesia* cumple con el requisito de contener epítopes tanto B como T conservados entre las diferentes cepas (Suárez y col., 1998). Se ha descrito que este antígeno también se expresa en los esporozoitos y que anticuerpos específicos contra esta proteína inhiben la adhesión al eritrocito (Mosqueda y col., 2002). Aún no se conoce la función de esta proteína pero se especula que participa en los mecanismos de invasión del eritrocito. Se ha descrito que cuando se

inmunizan bovinos con RAP-1 los mismos desarrollan una parasitemia reducida luego del desafío cuando es comparado con bovinos controles sin inmunizar (McElwain y col., 1991, Brown y col., 2006b). Sin embargo, los datos de la efectividad de esta proteína en su uso como vacuna a subunidad son controversiales ya que en otro trabajo se describe que a pesar de que el antígeno genera una respuesta inmune con inducción de IFN- $\gamma$  y secreción específica de IgG contra RAP-1 o la mitad N-terminal de RAP-1, no genera una respuesta protectora luego del desafío con *B. bovis* (Norimine y col., 2003). A pesar de los resultados controversiales, RAP1 es el antígeno mejor descrito hasta ahora y por esta razón fue elegido para ser expresado en *B. abortus*.

### **8.2. *Mycobacterium bovis*: Tuberculosis bovina**

La tuberculosis bovina (TBb), causada por *Mycobacterium bovis*, es una zoonosis con distribución mundial. El ganado es el hospedador y reservorio principal de esta infección crónica, pero puede infectar a otras especies de mamíferos, entre ellos el humano (Chambers, 2009). Las principales rutas de infección en el hombre son el consumo de productos lácteos no pasteurizados y el contacto con animales enfermos. *M. bovis* generalmente se transmite por vía aérea.

Argentina cuenta con 48 millones de bovinos (SENASA, 2010) y se estima que la prevalencia media de la TBb sería de 0,9 % (Dubarry, 2005). Esta infección está distribuida sobre la mayor parte del territorio y 38% de los rodeos tienen uno o varios bovinos que dan positivos al ensayo de la tuberculina. El porcentaje de bovinos con lesiones compatibles con tuberculosis detectadas en frigorífico fluctuó de 6 a 0,9 % durante las últimas 2 décadas (Torres, 2009; SENASA, 2010). La presencia de la TBb amenaza al desarrollo de la industria ganadera y lechera afectando el comercio internacional. Por esta razón, es esencial el control y la erradicación de esta enfermedad.

Está establecido que la inmunidad a la tuberculosis es desarrollada a través de la respuesta inmune mediada por células (IMC), en la cual la acción cooperativa de células T antígeno específicas y los macrófagos controlan en definitiva la infección por inhibición del crecimiento de las micobacterias contenidas en los fagolisosomas. La modulación de la actividad de los macrófagos por las células T es mediada por un conjunto de citoquinas secretadas, que es complejo y coordinado, y que incluye INF- $\gamma$ , factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e IL-2. Todas ellas son moléculas requeridas para

la inducción de una potente actividad microbicida. Las células T CD4+ sensibilizadas secretan INF- $\gamma$  que activa a los macrófagos para expresar actividad antimicobacteriana. La activación de células T CD4+ y el reclutamiento de células T CD8+ al sitio de la infección junto con la producción de citoquinas proinflamatorias contribuyen al mantenimiento de la respuesta inmune adquirida.

Al igual que en otras infecciones de tuberculosis, la TBb es principalmente una infección del sistema respiratorio (Allen y col., 2010). El ganado probablemente se infecte con *M. bovis* a través de la inhalación de aerosoles. La infección ocurre primero en los macrófagos alveolares y probablemente en las células dendríticas intersticiales (Banchereau y col., 2000), donde las células de *M. bovis* son capaces de sobrevivir, replicar y dispersarse hacia otros sitios (Abadie y col., 2005).

Se ha demostrado que para que una respuesta inmune sea efectiva contra la tuberculosis, se necesita principalmente el desarrollo de una respuesta inmune mediada por células (IMC) tipo Th1 (revisión en Andersen, 1997). La producción de citoquinas como el TNF- $\alpha$  e IL-12 por parte de las células dendríticas (CDs) o los macrófagos infectados con *M. tuberculosis* o *M. bovis* participan en el desarrollo de las células Th1 (revisión en Andersen, 1997). Por el contrario, la respuesta Th2 inducida por la infección con *M. bovis* contrarresta la respuesta Th1, conteniendo las respuestas IMC y aumentando las respuestas humorales a medida que la enfermedad progresa. La respuesta Th2 se caracteriza por la producción de citoquinas tales como IL-4, IL-5 e IL-10. Los estudios de tuberculosis sugieren que el balance entre las respuestas Th1/Th2 determina el progreso y la aparición de la enfermedad (Thacker y col., 2007; Villarreal-Ramos y col., 2006; Blanco y col., 2009).

La vacuna corrientemente usada contra la tuberculosis humana (TB), el bacilo de Calmette-Guérin (BCG), es una vacuna viva atenuada derivada de *M. bovis*. BCG protege contra las formas severas de la enfermedad en niños (Eisenhut y col., 2009), pero falla en proteger contra formas pulmonares en adultos en países donde la enfermedad es endémica. La eficacia de esta vacuna en adultos varía entre 0 y 80% (Brewer, 2000).

Por otro lado, el uso de BCG como vacuna para el control de la TBb ha sido resistido por dos razones principales. Primero, aunque es segura, existen dudas significativas de la eficacia de la vacunación con BCG (McNair y col., 2007). Segundo, una vacunación efectiva con BCG podría interferir con la detección de animales infectados con *M. bovis*,

comprometiendo así los programas de erradicación de la tuberculosis en el ganado bovino. Debido a esto último, el desarrollo de un nuevo sistema de diagnóstico que permita diferenciar los animales vacunados de los infectados deberá acompañar a la generación de una nueva vacuna viva contra la TBb. Así, con la erradicación de la TB en el horizonte, el desarrollo de nuevas vacunas con mejor protección que BCG es una necesidad de urgencia.

En los últimos 10 ó 15 años, se ha realizado un considerable avance en la generación de nuevas vacunas contra la TB humana, muchas de las cuales se encuentran en la fase clínica de investigación (revisión en Parida y Kaufmann, 2010) gracias al alto financiamiento de estos estudios. El desarrollo de vacunas para el ganado bovino se ha beneficiado enormemente a partir de estos avances, y en la actualidad hay diversas vacunas candidatas, incluyendo vacunas a base de proteínas adyuvantes, basadas en vectores virales y vacunas de micobacterias atenuadas que han sido ensayadas en bovinos. Ninguna de ellas ha mostrado por ellas mismas mayor inducción de protección que BCG (Buddle, 2010). Las vacunas más prometedoras en bovinos son las que constan de un refuerzo (*boost*) heterólogo que combinan vacunas BCG–DNA (Skinner y col., 2003; Maue y col., 2007), BCG–proteína (Wedlock y col., 2005 y 2008) o BCG–vector viral (Vordermeier y col., 2009) (para una revisión ver Buddle y col., 2011).

El diagnóstico de la enfermedad se basa en tuberculina, PPD (sigla en inglés de derivado proteico purificado), y además en algunos países se utiliza el Bovigam que cuantifica liberación de IFN- $\gamma$  (Lange y col., 2009).

Uno de los planes de control de la TBb es el de llevar a cabo un ensayo PPD y la subsiguiente eliminación del animal infectado. Esta metodología ha sido eficaz en la erradicación en algunos países, pero su resultado fue parcial en regiones que tienen un reservorio silvestre de animales infectados. Por otra parte, esta metodología resulta muy cara y es inaceptable en territorios subdesarrollados o en vía de desarrollo (Buddle y col., 2003).

Los antígenos protectivos estudiados son principalmente los antígenos identificados del filtrado de cultivo (CFP, de las siglas en inglés): ESAT 6, CFP 10, TB10.4, MPB83, MPB70, MPB63, MPB64, Ag85A y Ag85B (Dietrich y col., 2006; Wiker, 2009, Delogu y Fadda, 2009); de los cuales se detalla más adelante MPB83. Por otra parte, también se han estudiado los antígenos asociados a membrana HSP65 y HBHA (Delogu y Fadda, 2009).

Más recientemente, los avances en el estudio de ESAT 6 y Ag85 por separado o en combinación demostraron que son antígenos muy prometedores (Delogu y Fadda, 2009).

### MPB83

MPB83 es un antígeno sero-dominante en el ganado infectado con *M. bovis* (Wiker y col., 1996). Es una lipoproteína glicosilada que es procesada por la peptidasa de señal II y se localiza en membrana (Hewinson y col., 1996), posiblemente a través de la interacción de su residuo lipídico ubicado en el N-terminal con la membrana de la micobacteria. En SDS-PAGE seguido de Western blot, en los extractos totales de las micobacterias se detectan dos bandas una de 26 kDa y otra de 23 kDa que es secretada en micobacterias (Harboe y col., 1998) y se postula que serían diferentes formas glicosiladas (Wiker y col., 1996). No se conoce cuál sería la función de esta proteína.

Se sabe que este antígeno induce una respuesta humoral y celular en infecciones experimentales en varios modelos animales y en infecciones naturales en humanos (Harboe y col., 1995; Wiker y col., 1996) y se lo considera un importante candidato para el desarrollo de vacunas (Delogu y Fadda., 2009). Se han realizado ensayos en ganado utilizando ADN que codifica para este antígeno y para MPB70. Los resultados de protección contra la cepa virulenta resultaron poco alentadores (Wedlock y col., 2003), pero los resultados mejoraron al inocular simultáneamente ADN que codifica para MPT64 y Ag85B (Cai y col., 2004).

**Tabla 0.2: Características de las especies de microorganismos utilizadas en este trabajo**

	Distribución geográfica	Huéspedes	Tropismo celular	Enfermedad	Principal vector
<i>B. abortus</i>	Todo el mundo	ganado bovino	macrófagos y otras células fagocíticas no profesionales	Brucelosis bovina	–
<i>M. bovis</i>	Todo el mundo	ganado bovino	macrófagos y otras células fagocíticas no profesionales	Tuberculosis bovina (TBb)	–
<i>B. bovis</i>	Trópico y subtropical	ganado bovino, venado	eritrocitos	Babesiosis	<i>Boophilus</i>

### 9. Selección de antígenos

Debido a la respuesta inmune celular que despierta *B. abortus*, la misma es considerada una candidata atractiva para la expresión de antígenos de otros patógenos que requieren para su control la intervención de una vía inmunológica equivalente a la que desencadena *Brucella* (Comerci y col., 1998). Con el objeto de validar a *B. abortus* S19 como un vehículo de expresión de antígenos heterólogos *in vivo* que sea capaz de dirigir la respuesta inmune hacia un perfil del tipo protectorio, en este trabajo de tesis se seleccionaron antígenos de *Mycobacterium bovis* como modelo de bacteria intracelular (MPB83) y *Babesia bovis* como protozoario (RAP1).

Si bien se ha reportado anteriormente el uso de *Brucella* como sistema de expresión heteróloga, en el presente estudio hemos ahondado en la caracterización de este sistema para la generación de vacunas multivalente al evaluar el efecto que produce la localización subcelular del antígeno heterólogo en *Brucella* sobre la respuesta inmune inducida. Asimismo, se estudia la respuesta mediada por células generadas. Hasta el momento, se ha publicado sólo un trabajo con S19 como vector de expresión (Comerci y col., 1998). Todos los otros estudios reportados fueron realizados en RB51. Dado que en nuestro país se utiliza como vacuna la cepa S19, resulta importante profundizar el estudio de esta cepa, que a su vez luego puede servir como modelo para otras. Por otro lado, en este trabajo se hace hincapié en antígenos de sumo interés en la salud ganadera de nuestro país, como es el caso de la babesiosis y la tuberculosis bovina.

Hipótesis

**La cepa vacunal de *Brucella abortus* S19 utilizada como vector de expresión de antígenos heterólogos genera una respuesta inmune tipo Th1 específica contra estos antígenos, sin verse afectadas las características de infección y protección de la cepa en el modelo murino.**



# Objetivos

### **Objetivo General**

Desarrollar cepas de *Brucella abortus* S19 que expresen antígenos de patógenos de interés veterinario y evaluar su utilización para inducir una respuesta inmune tipo Th1 adecuada contra el antígeno heterólogo, así como contra *Brucella*, en un modelo animal de experimentación.

### **Objetivos específicos:**

- 1. Desarrollar plásmidos que permitan la expresión de los genes *mpb83* de *Mycobacterium bovis* y *rap1* de *Babesia bovis* en *Brucella abortus* bajo distintos promotores.**
- 2. Generar cepas recombinantes de *B. abortus* S19 que expresen en forma estable y en diferentes contextos de presentación los antígenos heterólogos MPB83 de *M. bovis* y RAP1 de *B. bovis*.**
- 3. Analizar la capacidad de las cepas recombinantes de *Brucella* de inducir respuesta inmune específica para los distintos antígenos en animales de experimentación.**

# Materiales y Métodos

1 Materiales Biológicos y Químicos

1.1 Cepas

Las cepas de *E. coli* y *B. abortus* utilizadas en este trabajo se detallan a continuación:

Tabla 1: cepas utilizadas en este trabajo

Cepas	Genotipo/características	Procedencia
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	F- <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i> $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, <i>hsdR17</i> (rK- mK+), $\lambda$ -	Gibco
<i>Escherichia coli</i> BL21	<i>E. coli</i> B F- <i>dcm ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> - m <sub>B</sub> -) gal [malB <sup>+</sup> ] <sub>K-12</sub> ( $\lambda$ <sup>S</sup> )	Invitrogen
<i>E. coli</i> XL1-blue	<i>endA1 gyrA96</i> (nal <sup>R</sup> ) <i>thi-1 recA1 relA1 lac glnV44</i> F'[ ::Tn10 proAB <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> $\Delta$ (lacZ)M15] <i>hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> )	Stratagene
<i>Brucella abortus</i> 2308	Cepa de referencia, virulenta.	Cepario del laboratorio
<i>Brucella abortus</i> S19 (S)	Cepa lisa vacunal, atenuada	Cepario del laboratorio
<i>Brucella abortus</i> RB51 (R)	Cepa rugosa vacunal, atenuada	Cepario del laboratorio
<i>Brucella abortus</i> S19 p26::MPB83 (Sp26-83)	Cepa atenuada conteniendo el plásmido p26-83 integrado al genoma (Kn <sup>r</sup> ).	Este trabajo
<i>Brucella abortus</i> S19 p83 (Sp83)	Cepa atenuada conteniendo el plásmido replicativo p83 (Kn <sup>r</sup> )	Este trabajo
<i>Brucella abortus</i> S19 pomp19-83 (Spomp19-83)	Cepa atenuada conteniendo el plásmido replicativo pomp19-83 (Amp <sup>r</sup> ).	Este trabajo
<i>Brucella abortus</i> S19	Cepa atenuada conteniendo el plásmido pRAP (Kn <sup>r</sup> )	Este trabajo

Cepas	Genotipo/características	Procedencia
<b>pRAP (SpRAP)</b>  <i>Brucella abortus</i> S19 <b>pomp19-RAP (Spomp19-RAP)</b>	Cepa atenuada conteniendo el plásmido pomp19-RAP (Amp <sup>r</sup> )	Este trabajo
<i>Brucella abortus</i> RB51 <b>pRAP (RpRAP)</b>	Cepa atenuada conteniendo el plásmido pRAP (Kn <sup>r</sup> )	Este trabajo
<i>Mycobacterium bovis</i> AN5	Cepa de referencia, virulenta	cepario del laboratorio

## 1.2 Oligonucleótidos

Empleando las herramientas del sitio web JustBio ([www.justbio.com](http://www.justbio.com)) de acceso libre de Internet se realizaron los diseños de oligonucleótidos para las reacciones de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando el programa Primer3, así como el análisis de sitios de restricción en las secuencias.

Los oligonucleótidos se adquirieron de la firma Alpha DNA (<http://www.alphadna.com>, [orders@alphadna.com](mailto:orders@alphadna.com)). Los mismos se detallan en el siguiente cuadro:

**Tabla 2:** Oligonucleótidos empleados en este trabajo

Oligonucleótidos	Secuencia (orientación 5'-3')	Utilidad/Blanco de restricción
<b>pomp19f</b>	<u>gaattc</u> CATTCTTCCTGCGGCTTT	Amplificación por PCR de la región promotora del gen <i>omp19</i> de <i>B. abortus</i> para subclonar en pBBR1MCS4. (EcoRI)
<b>pomp19r</b>	<u>accggt</u> GCCTTTCTGCACCGTGCCTGC	Amplificación por PCR de la región promotora del gen <i>omp19</i> de <i>B. abortus</i> para subclonar en pBBR1MCS4. (AgeI)
<b>p2683f</b>	<u>gcgcgc</u> ATGATCAACGTTTCAGG	Amplificación por PCR del gen <i>mpb83</i> de <i>M. bovis</i> para subclonar en pBBR1MCS2 y en pKS26 (BssHII)
<b>p2683r</b>	<u>gcgcgc</u> GAGGCAAACCGCCTACAC	Amplificación por PCR del gen <i>mpb83</i> de <i>M. bovis</i> para subclonar en pBBR1MCS2 y en pKS26 (BssHII).
<b>p1983f</b>	<u>ctgcagc</u> GATGATCAACGTTTCAGGC	Amplificación por PCR del gen <i>mpb83</i> de <i>M. bovis</i> para subclonar en pomp19 (Pst1).
<b>p1983r</b>	<u>ctgcagc</u> GAGGCAAACCGCCTACAC	Amplificación por PCR del gen <i>mpb83</i> de <i>M. bovis bovis</i> para subclonar en pomp19 (Pst1).
<b>prapf</b>	<u>aagctt</u> AGAATCATTAGCGGCGTTG	Amplificación por PCR del gen <i>rap1</i> de <i>B. bovis</i> para subclonar en pBBR1MCS2 (HindIII).
<b>prapr</b>	<u>tctaga</u> TCAGAGGTATCCGGCGGT	Amplificación por PCR del gen <i>rap1</i> de <i>B. bovis</i> para subclonar en pBBR1MCS2 (XbaI).
<b>p26rapstf</b>	<u>gcgcgc</u> GCTTTCGCCACAATCAGAGAGT	Amplificación por PCR del gen <i>rap1</i> de <i>B. bovis</i> , sin la secuencia que codifica para la región de membrana, para subclonar en pΔ26 (BssHII)
<b>p26rapstr</b>	<u>gcgcgc</u> TCAGAGAGGTATCCGGCGGT	Amplificación por PCR del gen <i>rap1</i> de <i>B. bovis</i> para subclonar en pΔ26 (BssHII).
<b>p19rapstf</b>	<u>ctgcagc</u> GCTTTCGCCACAATCAGAGA	Amplificación por PCR del gen <i>rap1</i> de <i>B. bovis</i> . Para subclonar en pomp19 (PstI).
<b>p19rapstr</b>	<u>ctgcagc</u> TCAGAGAGGTATCCGGCGGT	Amplificación por PCR del gen <i>rap1</i> de <i>Babesia bovis</i> para subclonar en pomp19 (PstI).

Los sitios de restricción incorporados a los oligonucleótidos que fueron utilizados en este trabajo se encuentran subrayados; en mayúsculas, las secuencias complementarias al gen a amplificar; en negrita se señalan los codones de iniciación (ATG) y el triplete complementario a los codones de terminación.

En la reacción de PCR se utilizó como templado el ADN genómico de:

*B. abortus* S19.

*M. bovis* AN5, cedido por el Dr. Ángel Cataldi.

*B. bovis* R1A, provisto por el Dr. Ignacio Echaide.

### 1.3 Plásmidos

En la siguiente tabla se detallan los plásmidos utilizados en el presente trabajo:

**Tabla 3:** Plásmidos usados en este trabajo

Plásmido	Resistencia/ origen de replicación	Descripción	Referencia
<b>pGEM-T Easy vector</b>	Amp <sup>r</sup> ColE1	Plásmido comercial para clonado de productos de amplificación por <i>taq</i> .	Promega
<b>pGE19-83</b>	Amp <sup>r</sup> ColE1	Plásmido pGEMT-Easy vector con fragmento de 0,71 kb que contiene el gen <i>mpb83</i> de <i>M. bovis</i> amplificado con los oligonucleótidos p1983f/p1983r a partir de ADN genómico de la cepa de referencia <i>M. bovis</i> AN5 clonado.	Este trabajo
<b>pGE26-83</b>	Amp <sup>r</sup> ColE1	Plásmido pGEM-T Easy vector con fragmento de 0,71 kb que contiene el gen <i>mpb83</i> de <i>Mycobacterium bovis</i> amplificado con los oligonucleótidos p83f /p83r a partir de ADN genómico de la cepa de referencia <i>M. bovis</i> AN5 clonado.	Este trabajo
<b>pGE-rap</b>	Amp <sup>r</sup> ColE1	Plásmido pGEM-T Easy vector con fragmento de 1,68 kb que contiene el gen <i>rap1</i> de <i>B. bovis</i> amplificado con los oligonucleótidos prapf / prapr a partir de ADN genómico de <i>B. bovis</i> clonado.	Este trabajo

Plásmido	Resistencia/ origen de replicación	Descripción	Referencia
<b>pGE-26rapst</b>	Amp <sup>r</sup> ColE1	Plásmido pGEM-T Easy vector con fragmento de 1,54 kb que contiene el gen <i>rap1</i> de <i>B. bovis</i> , sin la secuencia que codifica para la señal de transmembrana. Amplificado con los oligonucleótidos p26rapstf / p26rapstr a partir de ADN genómico de <i>B. bovis</i> clonado.	Este trabajo
<b>pGE-19rapst</b>	Amp <sup>r</sup> ColE1	Plásmido pGEM-T Easy vector con fragmento de 1,54 kb que contiene el gen <i>rap1</i> de <i>B. bovis</i> amplificado con los oligonucleótidos p19rapstf / p19rapstr a partir de ADN genómico de <i>B. bovis</i> clonado.	Este trabajo
<b>pBBR1MCS2</b>	Kan <sup>r</sup> Amplio rango	Plásmido replicativo para <i>Brucella</i> spp.	Kovach y col., 1995
<b>pBBR1MCS4</b>	Amp <sup>r</sup> Amplio rango	Plásmido replicativo para <i>Brucella</i> spp.	Kovach y col., 1995
<b>pomp19</b>	Amp <sup>r</sup> Amplio rango	Plásmido pBB1RMC4 con fragmento de 0.4 Kb conteniendo el promotor y la secuencia que codifica para extremo N-terminal de OMP19 (replicativo para <i>Brucella</i> spp).	Sabio y García y col., 2007 y este trabajo
<b>pKS26</b>	Kan <sup>r</sup> ColE1	Plásmido pBK (vector comercial de clonado, Stratagene) con fragmento de 4,7 kb EcoRI del plásmido p26DL (Campos, 2002) que contiene el gen <i>luc</i> clonado en el sitio BssHIII de <i>bp26</i> .	Campos y col., 2002 y 2003, Boschiroli y col., 1997
<b>p83</b>	Kan <sup>r</sup> Amplio rango	Inserto de 0,7 kb conteniendo el gen <i>mpb83</i> proveniente de pGE26-83 y clonado como fusión en el sitio EcoRI del plásmido pBBR1MCS2.	Sabio y García y col., 2010
<b>pomp19-83</b>	Amp <sup>r</sup> Amplio rango	Plásmido pomp19 con inserto de 0,7 kb conteniendo el gen <i>mpb83</i> proveniente de pGE19-83 y clonado como fusión en el sitio PstI.	Sabio y García y col., 2010



Plásmido	Resistencia/ origen de replicación	Descripción	Referencia
<b>p26-83</b>	Kan <sup>r</sup> ColE1	Plásmido pKS26 con inserto de 0,4 kb conteniendo el gen <i>mpb83</i> proveniente de pGE26-83 y clonado como fusión en el sitio BssHII.	Sabio y García y col., 2010
<b>pRAP</b>	Kan <sup>r</sup> Amplio rango	Plásmido pBBR1MCS2 con inserto de 1,68 kb conteniendo el gen <i>rap1</i> proveniente de pGE-rap y clonado como fusión en el sitio HindIII/XbaI.	Sabio y García y col., 2008
<b>pomp19-RAP</b>	Amp <sup>r</sup> Amplio rango	Plásmido pomp19 con inserto de 1,54 kb conteniendo el gen <i>rap1</i> proveniente de pGE19-rapst y clonado como fusión en el sitio PstI.	Sabio y García y col., 2008

### 1.4 Anticuerpos

Los antisueros policlonales primarios de conejo contra BP26 y OMP19 fueron obtenidos en nuestro laboratorio (Boschiroli y col., 1995; Rossetti y col., 1991) y ambos fueron utilizados en diluciones de 1/200.

Los anticuerpos policlonales anti-MPB83 y anti-MPB70 (que cruza con MPB83) y el monoclonal anti-MPB83 fueron donados por Harald Wiker. Los sueros policlonales se usaron en diluciones de 1/200 y el monoclonal 1/100.

Mab BABB75A4, anticuerpo monoclonal específico contra RAP1 de *B. bovis* fue cedido por Dr. Carlos Suárez del Animal Disease Research Unit, USDA Agricultural Research Service, Pullman, Washington y se usó 1/200.

## 1.5 Buffers y otras soluciones

**Tabla 4:** Soluciones utilizadas en este trabajo

Nombre	Composición	Uso
Solución I de miniprep	Tris-HCL 25mM pH 8, EDTA 10 mM glucosa 50 mM	Aislamiento de ADN plasmídico
Solución II de miniprep	NaOH 0,2 N, SDS 1%	Aislamiento de ADN plasmídico
Solución III de miniprep	Acetato de potasio 3M	Aislamiento de ADN plasmídico
<i>Buffer</i> de siembra DNA	Azul de bromofenol 0,5%, glicerol 25%	Preparación de muestras de DNA para su análisis en geles de agarosa.
<i>Buffer</i> TAE 1x	Tris-acetato 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8	Electroforesis en geles de agarosa.
<i>Buffer</i> de muestra de proteínas	Tris-HCl 100 mM pH 6,8, SDS 2%, $\beta$ -Mercaptoetanol 2%, glicerol 20%, azul de Bromofenol 0,2%, EDTA 25 mM	Preparación de muestras de proteínas para su análisis en SDS-PAGE
<i>Buffer</i> de electroforesis 5X (Laemmli)	Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 250 mM, SDS 20 0,1%	<i>Buffer</i> para SDS-PAGE
<i>Buffer</i> de transferencia	<i>Buffer</i> Laemmli suplementado con metanol al 20%	Transferencia de proteínas a membrana de PVDF con método semiseco
Azul de <i>Coomasie</i> 0,05%	<i>Coomasie Brilliant Blue</i> R250 0,05%, ácido acético 10%	Tinción de proteínas
Solución de lavado de <i>Coomasie</i>	Metanol 50%, ácido acético 10%	Lavado del exceso de <i>Coomasie Blue</i>
Solución Rojo <i>Ponceau</i>	Rojo <i>Ponceau</i> 0,1% (Sigma), acético glacial 5%	Verificación de transferencia de las proteínas a la membrana
TBS-leche 5%	Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 150 mM, leche descremada en polvo 5%	Solución de bloqueo y dilución de anticuerpos para ensayos de Western blot

Nombre	Composición	Uso
<i>Buffer</i> BREFA	Tris-HCl 100mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl <sub>2</sub> 5mM	Lavado de membrana en el caso de usar anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina
Solución de revelado de BREFA	10 ml <i>buffer</i> BREFA, 66 µl NBT 50 mg/ml en dimetilformamida 70% y 33 µl BCIP 50 mg/ml en dimetilformamida 100% (Promega)	Revelado de membrana en el caso de usar anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina
PBST	PBS 1X, 0,05% de Tween 20, pH 7,2	Solución de lavado del ensayos de ELISA
PBS-SFB	PBS 1X, FBS 10%, pH 7	Solución de bloqueo y dilución de anticuerpos para ensayos de ELISA
Solución de revelado	ABTS 0,04M en buffer citrato pH 5 y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1 mM 100 vol.	Solución de revelado de ELISA (no IFN-γ)
TBS 1x	Tris-HCl 50 mM, NaCl 50 mM, pH 7,5	Lavado de células

## 2 Métodos microbiológicos

### 2.1 Medios y condiciones de cultivo

Las cepas de *Escherichia coli* se crecieron en medio Luria Bertani (LB) con agitación constante (200 rpm) o en LB solidificado con 1,5% de agar (DIFCO).

Las cepas de *Brucella* se crecieron en Tryptic Soy Broth (TSB) (DIFCO) con agitación constante (200 rpm). El medio sólido utilizado fue agar triptosa (TA) (DIFCO). En todos los casos las bacterias se crecieron a 37 °C.

Los antibióticos utilizados en este trabajo y sus concentraciones se detallan a continuación:

**Tabla 5: Antibióticos utilizados en este trabajo**

Antibiótico o droga	Origen	Concentración	
		<i>E. coli</i>	<i>B. abortus</i>
Ampicilina (Amp)	USB	100 g/ml	10 µg/ml
Kanamicina (Kn)	Sigma	50 µg/ml	25 µg/ml

### 2.2 Transformación de *E. coli* y selección de los vectores recombinantes

En todos los casos, se transformaron 50  $\mu$ l de *E. coli* competentes obtenidas por el método de incubación en cloruro de calcio y congelado para su almacenamiento a  $-70$  °C (Sambrook y col., 1989) con 5  $\mu$ l del producto de ligación. Se introdujo el ADN plasmídico mediante choque térmico a 42 °C y luego se recuperaron las bacterias y se plaquearon en medio de cultivo sólido suplementado con los correspondientes antibióticos y 40  $\mu$ l 2% X-gal (5-bromo-4cloro-3indolil- $\beta$ -*D*-galactósido), 40  $\mu$ l de IPTG 100 mM (Ispropil-1tio- $\beta$ -*D*-galactósido) en el caso de selección por  $\alpha$ -complementación. El análisis de la obtención de los plásmidos recombinantes deseado se realizó mediante minipreparaciones de ADN plasmídico de las colonias resistentes a antibióticos y por el análisis en geles de agarosa de los fragmentos generados por la digestión de estos plásmidos con enzimas de restricción o por PCR de colonias con oligonucleótidos específicos.

### 2.3 Transformación de *B. abortus*

En todos los casos la metodología utilizada para la transformación de *B. abortus* fue electroporación.

#### 2.3.1 Preparación de *B. abortus* electrocompetentes

Se inocularon 100 ml de TSB con 1 ml de cultivo saturado de *B. abortus* S19 o RB51, según correspondiese. Se cultivó con agitación constante a 37 °C hasta llegar a  $OD_{600nm}=0,5$ . El erlernmeyer conteniendo las bacterias se enfrió por 15 min en hielo; y posteriormente, se centrifugó el cultivo a 7.000 rpm a 4 °C durante 15 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las bacterias en 50 ml de H<sub>2</sub>O apirogénica estéril. Estos lavados se repitieron 3 veces. En el último lavado las bacterias se resuspendieron en 2 ml de H<sub>2</sub>O apirogénica estéril y esta resuspensión se fraccionó en volúmenes de 50  $\mu$ l y se guardaron a  $-70$  °C hasta ser utilizadas.

### 2.3.2 Electroporación y selección de recombinantes de *B. abortus*

Se descongelaron las bacterias en baño de hielo. Se pusieron en contacto 50  $\mu$ l de bacterias competentes junto con 0,5 a 1  $\mu$ g de ADN ( $\sim$ 1 $\mu$ g/ $\mu$ l) durante 5 min en hielo. Luego se lo colocó en cubetas de electroporación de 0,2 cm preenfriadas y estériles. El pulso aplicado para la electroporación fue de 25  $\mu$ F, 2,5 kV (12,5 kV/cm) y 400 $\Omega$ . El electroporador utilizado fue Gene Pulser/Pulse controller (BioRAD). Inmediatamente después de la electroporación, se agregó 1 ml de medio SOC (BRL-Bethesda) y se cultivaron las bacterias a 37 °C a agitación constante (300 rpm) durante 6 a 16 h. Posteriormente, las bacterias se sembraron en placas de agar triptosa (TA) suplementadas con el antibiótico correspondiente para la selección y se aislaron las bacterias transformadas.

### 2.4 Identificación de recombinantes y mutantes de *B. abortus* por PCR en colonias

Para la identificación de las colonias recombinantes o mutantes de *B. abortus* conteniendo los genes heterólogos en estudio, ya sea en los plásmidos recombinantes o incorporados en el genoma por un evento de recombinación, se realizó PCR de colonias. Se picaron al azar 10 colonias y se formó una suspensión celular con cada una de ellas en 100  $\mu$ l de  $d_4$ H<sub>2</sub>O estéril. Se realizó un choque osmótico por congelamiento a -70 °C y calentamiento a 100 °C repetido 3 veces. Posteriormente, se centrifugaron a 10.000 rpm 5 min y 5  $\mu$ l del sobrenadante se utilizaron como fuente de ADN en reacciones de amplificación de volumen final 50  $\mu$ l, utilizando los oligonucleótidos específicos de cada antígeno con ciclos de amplificación de 94 °C, 2min; 30 x (94 °C, 1 min; 58 °C, 1 min; 72 °C, 1 min); 72 °C, 10 min.

## 3 Análisis de ADN

### 3.1 Aislamiento de plásmidos

Para el aislamiento de los plásmidos a partir de *E. coli* se utilizó el método de lisis alcalina (Sambrook y col., 1989), usándose columnas de intercambio iónico de Qiagen o el *kit* Wizard de mini o midipreps (Promega).

### 3.2 Enzimas de restricción y modificantes

Estas enzimas se utilizaron según las recomendaciones de los proveedores (NEB y Promega). Se usaron los *buffers*, temperaturas y tiempos de incubación predeterminados.

### 3.3 Electroforesis en geles de agarosa

La concentración de la agarosa fue de entre 0,7 y 2% según el tamaño del fragmento de restricción o amplificación a analizar. A las muestras de ADN se les agregó 1/10 del volumen del sembrado de *buffer* de siembra y se procedió con la siembra en geles de agarosa con bromuro de etidio (0,5 µg/ml). La corrida se hizo a temperatura ambiente en TAE a 5-10 V/cm. Se visualizaron las bandas por fluorescencia al UV. Los marcadores utilizados fueron *ladder* de 100 pb y de 1kb (Promega). Los geles se documentaron usando un equipo Fotodyne y el programa Collage 3.0 PWR-Mac.

### 3.4 Aislamiento de fragmentos de interés de geles de agarosa

Se realizaron los aislamientos de los fragmentos de ADN de los geles de agarosa utilizando el *kit* de Purificación de geles de agarosa de Qiagen o GeneClean (Promega), siguiendo las indicaciones del proveedor.

### 3.5 Ligación

Para realizar las reacciones de ligación de fragmentos de ADN, a una mezcla que contenía al menos 50 ng de plásmido vector y una molaridad entre 1 a 5 veces mayor de fragmentos de ADN del inserto se le agregó 1 unidad de T4 ADN ligasa (NEB). Se usó el *buffer* del proveedor. La incubación se realizó durante 16 h a 4 °C en un volumen final de 10 µl.

## 4 Análisis de proteínas

### 4.1 Producción de proteínas recombinantes (rRAP-1, rMPB83) en *E. coli*

Se transformaron células competentes *E. coli* BL21 (Invitrogen) con los plásmidos pBAD/thioTOPO-rap-1 (Santangelo y col., 2007) o pRSET-MPB83 (cedido por el Dr.

Ángel Cataldi). La expresión de la proteína 6His-rRAP-1 se indujo mediante arabinosa 0,1% (3 h, 37 °C), y la de 6His-rMPB83 con el uso de isopropil-b-D-tiogalactopiranosido (IPTG) (16 h, 37 °C). Las células fueron precipitadas por centrifugación suave (5000 rpm por 10 min), resuspendidas en *buffer* fosfato salino (PBS) y se homogeneizaron mediante 3 ciclos de sonicación (200–300W, 10 s cada uno) manteniéndolas en frío. El lisado se centrifugó para precipitar los restos celulares y las proteínas recombinantes, RAP-1 y MPB83 fueron purificadas mediante columnas de afinidad con resina de Ni (Probond, Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Todos los pasos de purificación fueron evaluados por SDS-PAGE, seguido de tinciones con Coomassie Blue. La concentración de proteínas se determinó usando el *kit* Micro BCA Protein Assay Reagent (Pierce).

Las proteínas recombinantes se trataron con polimixina B sefarosa (Sigma-Aldrich) con la finalidad de eliminar el potencial LPS de *E. coli* contaminante.

### **4.2 Expresión y localización subcelular de la proteína heteróloga en *E. coli* y *B. abortus***

#### **4.2.1 Expresión de los antígenos heterólogos**

Para la obtención de proteínas totales tanto de *E. coli* como de *B. abortus*, los cultivos crecidos a saturación se precipitaron por centrifugación suave (3000 rpm, 5 min). El sedimento celular fue resuspendido en 100 µl de agua y 100 µl de *buffer* de muestra. Las muestras se hirvieron durante 10 min y posteriormente fueron centrifugadas durante 10 min a 12000 rpm para separar los restos insolubles correspondientes a la envoltura celular. Este extracto así obtenido fue cargado directamente en geles de SDS-PAGE para su análisis, o se congelaron a -20 °C hasta ser usadas. Las cepas de *Brucella* se inactivaron previamente por calentamiento 1 h a 60 °C. La ausencia de viabilidad luego de la inactivación fue corroborada por la falta de crecimiento en agar triptona.

#### **4.2.2 Localización subcelular de las proteínas heterólogas**

##### **4.2.2.1 *E. coli***

Las cultivos de *E. coli* (50 ml) crecidos a fase exponencial fueron sometidos a una centrifugación suave y resuspendidos en PBS. La suspensión celular fue sonicada

mediante 2 pulsos de 30 s–1 min a 18  $\mu$ m de amplitud en un sonicador Branson Sonifier 250 (VWR Scientific) (potencia: máxima; intensidad: alta; frecuencia de ciclo: 0,5 s). Posteriormente a la lisis, se obtuvieron los sobrenadantes libres de células mediante centrifugación a alta velocidad a 13.000g por 10 min a 4 °C. Este sobrenadante se ultracentrifugó a 61.000g por 1 h a 4 °C (Beckman Coulter Optima L-100 XP Ultracentrifuge) separando así las fracciones de membrana y citoplasma. La fracción insoluble fue resuspendida en un volumen igual a la fracción soluble del *buffer* usado. La concentración de las fracciones fueron determinadas usando el Micro BCAProtein Assay Reagent Kit (Pierce). Las fracciones se procesaron como en el caso de las proteínas totales antes de ser sembradas en geles de poliacrilamida y transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) para su posterior análisis mediante Western blot.

### 4.2.2.2 *B. abortus*

Los cultivos de *B. abortus* (50ml) se crecieron durante 16 h a 37 °C hasta fase exponencial y luego se inactivaron por calentamiento 1h a 60 °C. Se centrifugaron y se realizaron dos lavados, del precipitado celular, con PBS frío. Luego se resuspendieron los precipitados en 1 ml del mismo *buffer* y se transfirieron a tubos de 2 ml conteniendo cuentas de zirconium de 0,1 mm (Bio 101). Se disgregaron las células usando un *Ribolyser* (Bio 101 Savant) a una velocidad de 6,5 (4 ciclos de 30 s cada uno, con enfriamiento en hielo entre cada ciclo). Luego de la lisis, los sobrenadantes libres de células fueron colectados por centrifugación a 13.000g por 10 min a 4 °C. La concentración de las fracciones de las rS19 se determinó usando el Micro BCAProtein Assay Reagent Kit. Las fracciones se sembraron en geles de poliacrilamida y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para ser analizadas por Western blot.

## 4.3 Tratamiento con globomicina

Para evaluar la inhibición del procesamiento proteico por acción de la peptidasa señal II, se trataron cultivos líquidos de *B. abortus* y *E. coli* con, o sin, globomicina. La globomicina, que fue provista por M. Inukai, Sankyo Co. (Tokyo, Japan), se disolvió en etanol en una concentración final de 2% y se utilizó a 100  $\mu$ g/ml en cultivos crecidos en la fase exponencial. Como control negativo se trató un cultivo con etanol 2%. Los cultivos de *B. abortus* y *E. coli* se incubaron por 12 h o 6 h, respectivamente. Se



centrifugaron, se realizaron lavados con PBS y se resuspendieron en *buffer* de muestra. Las fracciones se sembraron en geles de poliacrilamida y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para análisis por Western blot.

## 5 Western blot

### 5.1 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

Se usaron geles de poliacrilamida de distintas concentraciones dependiendo la proteína a analizar: 10% para RAP; 12,5% para BP26 y 15% para MPB83 y OMP19 (o BMP18). Los geles utilizados fueron en general minigeles (8 x 8). Se usó una relación de acrilamida: bisacrilamida de 30:0,8. Se corrieron en *buffer* Laemmli a 100V (aproximadamente 40 mA iniciales) durante 2 h.

Terminada la corrida, la visualización de las proteínas fue realizada mediante tinción con Azul de Coomassie y posterior lavado con metanol 45%, acético 10%; o bien, se electrotransfirieron las proteínas a membranas de nitrocelulosa utilizando *buffer* Laemmli suplementado con 20% de metanol, durante 2 h a 200 mA o 16 h a 100 mA. La correcta transferencia se confirmó por tinción de la membrana con una solución de Rojo *Ponceau* 0,1% (SIGMA) en ácido acético glacial 5%.

### 5.2 Inmunodetección

Las membranas se bloquearon incubándolas a temperatura ambiente durante 1 h en una solución TBS-leche 5%. Se incubó la membrana 1 h con el primer anticuerpo según la dilución especificada en cada caso. Se lavó la membrana 3 veces con TBS-0,05% Tween 20 durante 10 min a temperatura ambiente cada vez. Se incubó 1 h con el segundo anticuerpo anti IgG de ratón o de conejo según correspondiera. El segundo anticuerpo conjugado a peroxidasa de rabanito en el caso de los ensayos de RAP1 y BP26 y con fosfatasa alcalina para el resto. Se incubó 1 h a temperatura ambiente y se repitieron los lavados. Se reveló con una solución que contiene 1 volumen de 4-cloro naftol (3 mg/ml en metanol), 5 volúmenes de H<sub>2</sub>O y 1:1000 de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% en el caso de que el segundo anticuerpo estuviera conjugado a peroxidasa. En el caso de anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina el último lavado se realizó con el *buffer* BREFA por 10 min y se reveló en la solución que contiene BCIP/NBT (Promega).

## 6 Ensayos en ratones

### 6.1 Animales de laboratorio

Se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/c de 6 a 8 semanas de edad, provenientes del bioterio del CICVyA-Castelar.

Los ensayos de respuesta inmune de las cepas recombinantes que expresan RAP se realizaron en colaboración con el grupo del Dr. Sergio Costa Oliveira en Brasil. Los ratones fueron cedidos por la Universidad Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brasil.

### 6.2 Estimación de la virulencia residual de las cepas recombinantes S19 y RB51 y estabilidad de las construcciones

Se inocularon intraperitonealmente grupos de ratones de 6 a 8 semanas con  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonia (UFC) de las distintas cepas S19 de *Brucella* en 200  $\mu$ l de PBS o con PBS solo. A distintas fechas post inoculación, se sacrificaron 5 ratones por grupo y se obtuvieron muestras de sangre del seno retroorbital en los casos en que se analizaron los sueros. El suero se obtuvo por incubación de la sangre durante 2 h a 37 °C, luego se centrifugó a 2.000g por 15 min, se fraccionó el suero y se guardó a -20 °C para los análisis posteriores. En el caso de las cepas RB51 se utilizaron  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonia (UFC).

Se extrajeron los bazos, se pesaron y se procedió a cortarlos en 2 mitades. Una de las mitades fue homogeneizada en 5 ml de solución salina (PBS) estéril y se determinó el número de bacterias por bazo por diluciones seriadas de los homogenatos y plaqueo en TA con los antibióticos de selección correspondientes o sin antibiótico para la determinación de la estabilidad de los plásmidos. Las placas se incubaron a 37 °C por 72 h y luego se procedió a contar las colonias para determinar las UFC por bazo. La otra mitad de los bazos se reservó para ensayos de respuesta celular (ver 6.4).

### 6.3 Respuesta humoral en ratones BALB/c

#### 6.3.1 Detección de anticuerpos anti-proteína heteróloga por Western blot

Para el análisis de la reactividad de los sueros de ratones se corrieron proteínas de sobrenadantes de cultivo de *M. bovis* o extractos de *B. bovis* en geles preparativos de

SDS-PAGE. También se corrieron las proteínas recombinantes RAP1 y MPB83 obtenidas a partir de *E. coli*. Se transfirieron los geles a membranas de nitrocelulosa y se cortaron las membranas en tiras de 0,5 mm de ancho para su posterior confrontación con los sueros de los ratones. Se formaron pooles con los sueros de los ratones de cada grupo por cada tiempo de muestreo. La dilución de los pooles de suero fue de 1/100 en TBS con 5% de leche descremada. Se usó como segundo anticuerpo un anticuerpo monoclonal antiIgG de ratón o de conejo conjugado a fosfatasa alcalina en una dilución de 1:2000.

### 6.3.2 Detección de anticuerpos anti-RAP1 por ELISA

Se utilizó como antígeno la proteína recombinante RAP1 (rRAP1) purificada a partir de *E. coli*. La concentración de proteínas totales en los extractos de sobrenadante y precipitado de *E. coli* y *B. abortus* fue determinada utilizando el *kit* comercial Micro BSA Protein Assay Reagent Kit (Pierce). Se sensibilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos (Nunc-Immuno™ con superficie MaxiSorp™ (Nunc)) con 0,5 µg de rRAP1 disuelto en 100 µl *buffer* de carbonato (pH 9,6) en un volumen de 100 µl y se incubaron por 16 h a 4 °C. Se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 20 0,05% y se bloqueó por 1 h con 100 µl una solución de bloqueo (suero fetal bovino, 2%, en una solución de PBS). Se incubó el suero de los ratones a una dilución de 1/100 (50 µl por pocillo) en solución de bloqueo durante 2 h a 37 °C. Se incluyó control positivo, control negativo y blanco (sólo solución de bloqueo). Se lavaron las placas 6 veces con PBS-Tween 20 0,05% y 1 vez con PBS. Como segundo anticuerpo, se dispensaron 100 µl de anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón, anticuerpos de conejo anti-IgG1 o anti-IgG2 de ratón conjugado a peroxidada (HRP) (Promega Biosciences Inc.) en una dilución 1:2000 en solución de bloqueo y se incubaron las placas a 37 °C durante 2 h, tiempo después del cual fueron lavadas con PBS-Tween 20 0,05% 3 veces y 2 veces con PBS. Para revelar, se agregó en cada pocillo 100 µl de solución de revelado (0,04 M ABTS en buffer citrato pH 5 y 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 vol.) y las placas fueron mantenidas en oscuridad por un periodo de 20-30 min, la reacción se detuvo añadiendo 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 N y las placas se leyeron en un espectrofotómetro para placas de ELISA a una D.O. de 405 nm. Todas las reacciones se hicieron por duplicado.

### 6.4 Respuesta celular en ratones BALB/c

#### 6.4.1 Preparación de cultivos de esplenocitos

Se maceraron las mitades de los bazos en PBS 1X usando una jeringa de tuberculina sin aguja. Se prepararon las suspensiones celulares por medio de pasajes sucesivos por la jeringa. Posteriormente a la lisis de los eritrocitos, se determinó la concentración y la viabilidad de los esplenocitos por medio de tinción con Trypan Blue y recuento usando una cámara de Neubauer. En placas de 96 *wells* (pocillos), se incubaron un total de  $2 \times 10^5$  esplenocitos/pocillo (resuspendidos en 1 ml de medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) 1640 medium (Gibco) suplementado con 10% suero fetal bovino, 100 U de penicilina/ml y 100  $\mu$ g de estreptomicina/ml) a 37 °C en 5% CO<sub>2</sub> con diferentes estímulos: 1 ó 5  $\mu$ g de rMPB83 o rRAP1, 0,5  $\mu$ g de concanavalina A, 5  $\mu$ g de extracto crudo de *B. abortus* S19 inactivado por calor o RPMI 1640 solo. Luego de 72 h, se colectó el sobrenadante con el fin de determinar la producción de IFN- $\gamma$ . Los ensayos se hicieron por triplicado.

#### 6.4.2 Detección de IFN- $\gamma$ por ELISA

La detección de IFN- $\gamma$  se realizó por ELISA de captura (Mouse IFN- $\gamma$  ELISA Kit, OptEIA™, BD Pharmingen) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Brevemente, se sensibilizaron placas (BD Falcon™ ELISA) con 100  $\mu$ l del anticuerpo de captura anti-IFN  $\gamma$  (clon R4-6A2) en *buffer* carbonato, se incubaron las muestras provenientes de los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos estimulados y los correspondientes estándares. Se expusieron las muestras al anticuerpo de detección anti-ratón biotinilado (BD Pharmingen) junto al reactivo de SA<sub>v</sub>-HRP y se reveló utilizando el set BD Pharmingen™ TMB Substrate Reagent Set. Se mantuvieron las placas en oscuridad por un periodo de 20-30 min y la reacción se detuvo añadiendo 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 N. Se hizo una lectura a 450 nm y otra a 570 nm, para corrección de la primera. El límite menor de detección de este sistema es de 0,7 pg/ml.

### 6.5 Protección contra el desafío con una cepa patógena de *B. abortus*

Se utilizó el modelo de protección estándar para *B. abortus* (Boschioli y col., 1997). Se inocularon intraperitonealmente ratones BALB/c con  $1 \times 10^5$  UFC de las distintas recombinantes de *B. abortus* S19 o *B. abortus* S19 en 200  $\mu$ l de PBS y con PBS como control negativo. A distintos tiempos posinoculación, grupos de 5 ratones por grupo fueron sacrificados y se determinó el número de UFC en el bazo por homogeneización como se indicó en 6.2. También se determinó la presencia de esplenomegalia inducida en cada grupo por peso de los bazos.

A las 8 semanas posinoculación, los ratones fueron desafiados con  $5 \times 10^4$  UFC de *B. abortus* 2308 (cepa virulenta). A las dos semanas posdesafío, 5 ratones de cada grupo fueron sacrificados y se procesaron los bazos como se indicó anteriormente. Para diferenciar *B. abortus* 2308 de las recombinantes S19 se plaqueó la suspensión esplénica en TA y TA suplementado con el antibiótico de selección correspondiente o con 0,1% de eritritol (que permite el crecimiento de S2308 pero no de S19) (Sangari y col., 1998). Después de 72 h a 37 °C se observaron las colonias y se determinó el número de UFC de S2308 por bazo.

## 7 Bioinformática

### 7.1 Secuencias

Se accedió a las secuencias de *bp26* y *omp19* de *B. abortus*, *rap1* de *B. bovis* y *mpb83* de *M. bovis* por medio de los programas del sitio NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)) y/o ([www.genome.jp](http://www.genome.jp)).

### 7.2 Estudio de promotores

Por medio de algoritmos de redes neuronales, desarrollado en la Universidad de Berkley (USA), que permiten la predicción de una secuencia determinada se realizó el análisis del promotor de *omp19*. Se puede acceder a este programa en el sitio de Internet [www.fruitfly.org](http://www.fruitfly.org) de acceso libre.

### **8 Análisis estadístico**

El peso de los bazo y el recuento de bacterias en el bazo fueron analizados, debido a la gran dispersión observada en los datos, por el test no paramétrico KruskaleWallis seguido de un test de comparación múltiple de datos.

Para los datos de ELISA y de producción de IFN- $\gamma$  se realizaron análisis de varianza y las medias fueron comparadas con el test de Tukey.

Todos los análisis de significancia estadística se realizaron utilizando el programa GraphPad InStat.

### **9 Financiación**

Este trabajo contó con la financiación de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica a través del subsidio BID1201 oc/ar PICT 08-09624), una beca (grant) de investigación IFS (número B/3087-1) y del INTA, a través de la financiación de proyectos nacionales.

También fue posible gracias a la beca interna de doctorado de CONICET.

# Resultados

# **CAPÍTULO I**

**Construcción de vectores de expresión para  
*Brucella abortus***

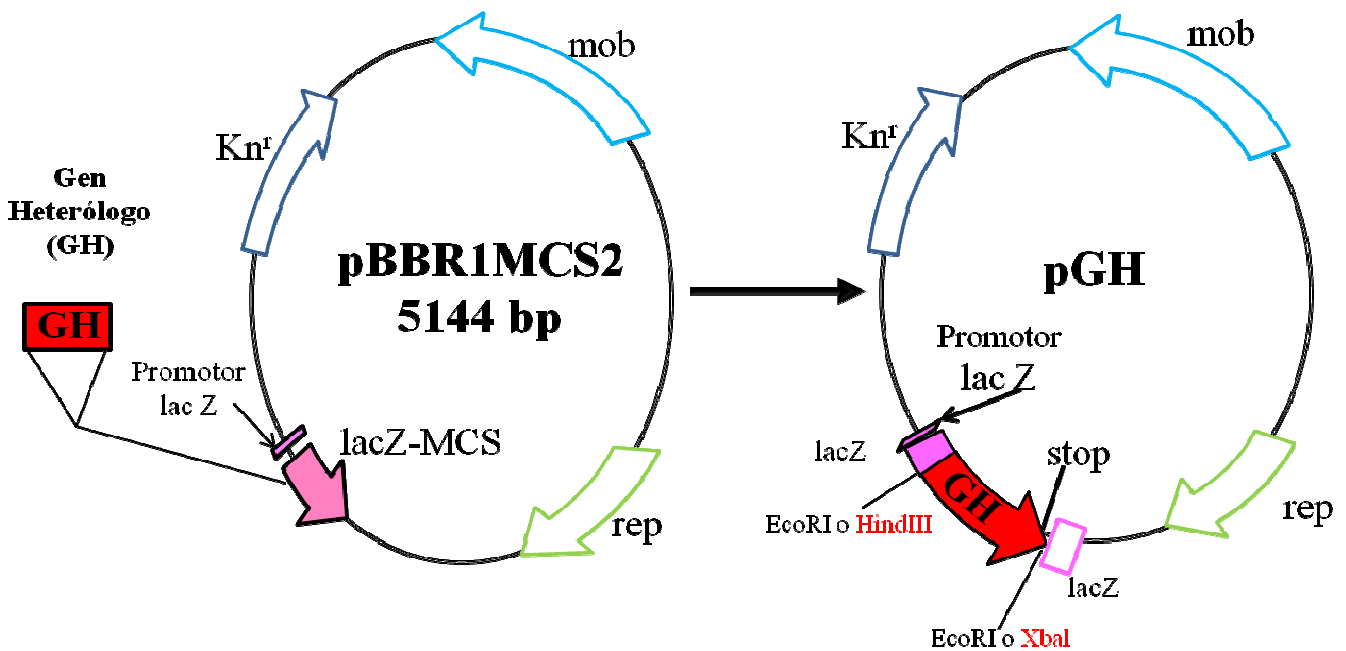


## Construcción de vectores para la expresión de las proteínas heterólogas en *Brucella abortus*:

### A. Vectores replicativos

#### A.1 En citoplasma

La serie de vectores de expresión utilizados o desarrollados para esta tesis se seleccionaron con el fin de expresar los antígenos heterólogos seleccionados en distintas localizaciones subcelulares (citoplasma, membrana externa, periplasma), y así analizar cuál despertaría la mejor respuesta inmunológica. Para la expresión de los antígenos heterólogos en citoplasma de *Brucella*, se utilizó del plásmido pBBR1MCS-2 (Kovach y col., 1995) de amplio rango de hospedador, resultando la expresión como fusión a los primeros aminoácidos de  $\beta$ -galactosidasa. Este plásmido es replicativo en *B. abortus*. En la figura I.1 se esquematiza la construcción general de los plásmidos derivados de este vector.



**Figura I.1:** Esquema de la construcción de los plásmidos pGH: p83, prap: El gen heterólogo *mpb83* se clonó en el sitio EcoRI y el gen *rap1* en los sitios HindIII/XbaI del plásmido replicativo pBBR1MCS-2. GH: gen heterólogo

A.2 En asociación a la membrana

Con el propósito de expresar los antígenos asociados a la membrana externa de *B. abortus*, se generó un vector replicativo derivado de pBBR1MCS-4 conteniendo el promotor y la región que codifica para los primeros aminoácidos de la proteína OMP19. Este vector se denominó pomp19 (Figura I.2). El gen *omp19* de *B. abortus* expresa una lipoproteína asociada a membrana externa (Tibor y col., 1996).

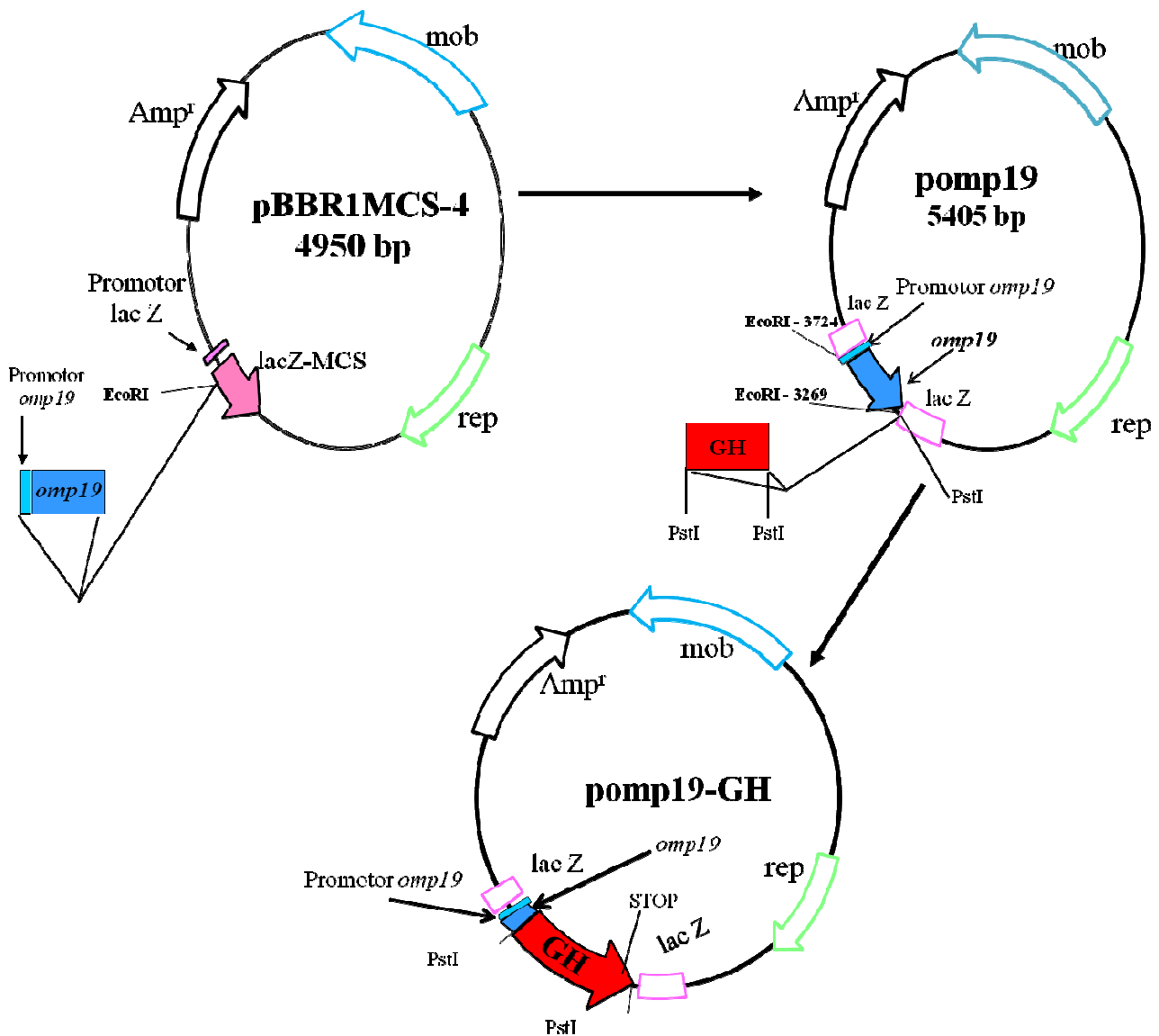


Figura I.2: Esquema de los plásmidos pomp19-GH (representa a los plásmidos pomp19-RAP, pomp19-83). Para ambos genes se utilizó el sitio de corte PstI.

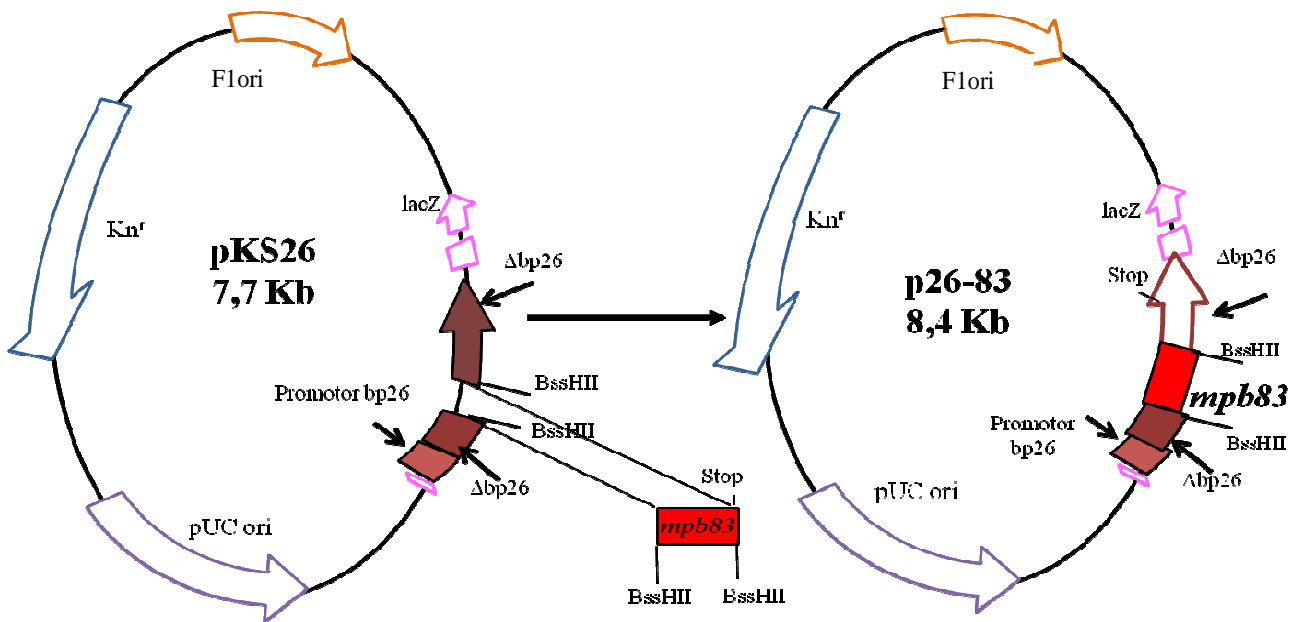
Las secuencias que codifican para los antígenos heterólogos se clonaron en el sitio PstI y como fusión al aminoterminal de la proteína OMP19, que llevan las señales de anclaje a membrana y el sitio de lipidación. De esta manera las proteínas quiméricas quedarían asociadas a membrana externa y lipidadas. Estos clonados se esquematizan en la figura I.2 (plásmido pomp19-GH que representa a ambos plásmidos: pomp19-83 y pomp19-RAP).

### **B. Vector integrativo**

#### **B.1 En región periplásmica**

En trabajos anteriores de nuestro laboratorio se habían diseñado varios plásmidos no replicativos en *B. abortus* conteniendo el gen *bp26* de *B. abortus* deletado en 555 pb en su región codificante (pKS26) (Campos y col., 2002 y Boschioli y col., 1997). Este vector tiene origen de replicación ColE1 lo que le confiere un rango de hospedador restringido y no puede replicar en *Brucella*, por lo que si el plásmido no se integra al cromosoma, se pierde en las sucesivas divisiones celulares. BP26 es una proteína periplásmica fuertemente inmunogénica. Mutantes *knock out* para *bp26* de *B. abortus* S19 y de *B. melitensis* Rev1 mostraron las mismas características protectivas que las cepas parentales (Fiorentino y col., 2008; Jacques y col., 2007). En base a estos resultados previos y con el fin de expresar las proteínas heterólogas a partir de un gen integrado al cromosoma, se decidió hacer las construcciones en fusión a BP26.

Se construyeron distintos plásmidos, todos ellos manteniendo la región codificante para su péptido señal e incluyendo su región promotora. Los genes heterólogos fueron clonados de manera tal que la proteína quimérica se exprese en fusión a la secuencia señal de traslocación a periplasma. Si bien se ensayaron numerosas estrategias con distintos vectores, es interesante remarcar que la única construcción lograda es la que se esquematiza a continuación en la figura I.3.



**Figura I.3: Esquema del plásmido p26-83:** p26-83 derivado de pKS26. Se utilizó el sitio BssHII como sitio de clonado.

## **CAPÍTULO II**

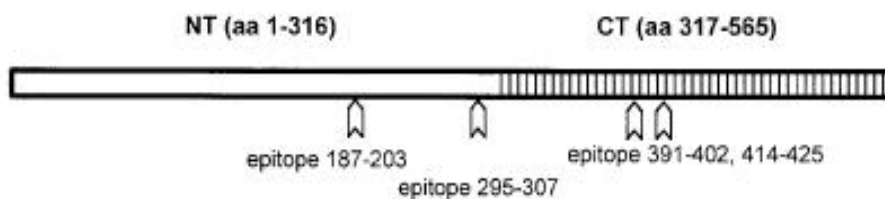
***Brucella abortus* como vector de expresión  
de antígenos de protistas parásitos  
(*Babesia bovis*)**

### Tristeza bovina

Como se mencionó en la introducción general, la babesiosis es una de las enfermedades transmitidas por garrapatas (ETG) que está involucrada en el conjunto de enfermedades que causan la denominada Tristeza Bovina y produce pérdidas económicas importantes. En la actualidad no existen vacunas mundialmente aceptadas para esta enfermedad (Späth y col., 1994; Kocan y col., 2010). En nuestro país, la vacuna más utilizada contiene eritrocitos parasitados con cepas de *B. bovis* y de *B. bigemina* atenuadas en su patogenicidad (Mangold y col., 1996).

Los mecanismos de la respuesta adaptativa contra *Babesia* serían por una respuesta rápida de las células de memoria y las efectoras T CD4+ que secretan IFN- $\gamma$ , activando así a las células fagocíticas y estimulando la producción de anticuerpos por las células B (Brown y col., 2006a; Norimine y col., 2003), por esta razón el uso de *B. abortus* como sistema de expresión de antígenos de *Babesia* es prometedor.

Para este estudio se seleccionó el antígeno RAP1 (Figura II.0) de *Babesia bovis*, que es el antígeno mejor caracterizado y con el que se han obtenido mejores resultados en ensayos de vacunas a subunidades (Brown y col., 2006b, Normine y col., 2003; Wirght y col., 1992). RAP1 de *B. bovis* es una proteína de 60 kDa que se localiza en la superficie apical y dentro de la roptria del merozoito



**Figura II.0: Estructura esquemática de RAP1 de *B. bovis*.** RAP1 consiste en una región N-terminal (aminoácidos 1 al 316) y una región C-terminal (aminoácidos 317 al 565) que contiene repeticiones en tándem de secuencias aminoacídicas degeneradas. Las flechas indican los epitopes T (de Norimine y col., 2002).

### 1. Obtención de cepas recombinantes de *Brucella* que expresen RAP1

#### 1.1. Clonado del gen *rap1* y expresión de las proteínas quiméricas $\beta$ gal-RAP, BP26-RAP y OMP19-RAP.

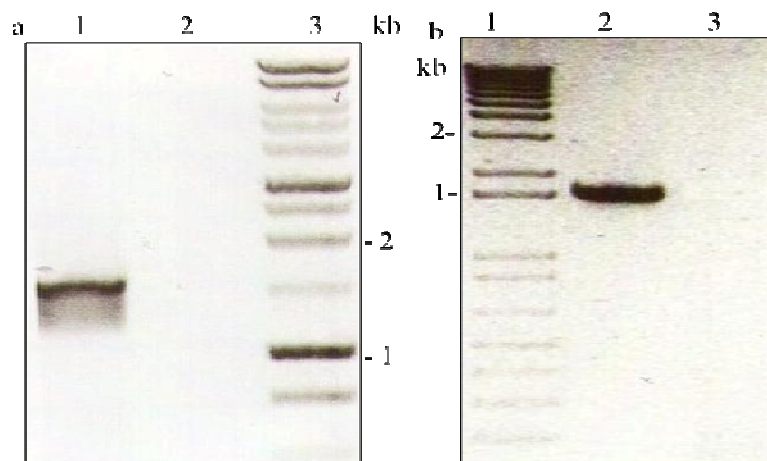
Con la finalidad de expresar RAP1 en diversos contextos de presentación antigénica, este antígeno se expresó como fusión a los primeros aminoácidos de la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* y de BP26 y OMP19, de *B. abortus*.

La secuencia completa del gen *rap1* fue amplificada por PCR a partir de ADN de *B. bovis* R1A (Figura II.1 a) y clonada en pBBR1MCS-2 (Kovach, 1995) como fusión a los primeros aminoácidos de  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli* con el objetivo de que sea expresado en el citoplasma bacteriano. Se analizó la expresión de RAP1 en la cepa de *E. coli* por medio de Western blot revelado con un anticuerpo monoclonal anti-RAP. Posteriormente, se seleccionó un clon que expresaba la proteína de fusión, se extrajo el plásmido recombinante y se confirmó la construcción por secuenciación. A este plásmido se lo denominó pRAP y con él se transformaron por electroporación bacterias de la cepa S19 de *B. abortus* obteniéndose la cepa SpRAP. La expresión fue confirmada por Western blot (Figura II.2). Se detectó una banda de peso molecular aparente de 66 kDa ( $\beta$ gal-RAP1) en extractos totales de las cepas de rS19 (Figura II.a calle 3).

Con el objetivo de expresar la proteína en un contexto asociado a membrana a través de un residuo lipídico, lo que podría llegar a otorgarle mayor inmunogenicidad al antígeno heterólogo, RAP1 sin su región transmembrana se expresó como fusión a los primeros aminoácidos de la proteína de membrana externa OMP19 de *B. abortus*, incluyendo el péptido señal y la señal de lipidación de OMP19. Para esto, se clonó el gen *rap1* en el vector replicativo *pomp19* (Sabio y García, 2008; y esta tesis) como fusión a los primeros 38 aminoácidos de la proteína de membrana externa OMP19 (Figura I.2, capítulo I). Se detectó la expresión de la proteína quimérica en *E. coli*. La construcción fue confirmada por secuencia del plásmido recombinante obtenido. Con este plásmido se transformaron bacterias *B. abortus* S19 por electroporación y se confirmó por Western blot la expresión de la proteína de fusión en las bacterias obtenidas (Figura II.2). Se seleccionó una de las colonias y se la denominó Spomp19-RAP. Se detectó una banda de peso molecular aparente de 62.5 kDa (OMP19-RAP1) en extractos totales de las cepas de rS19 (Figura II.2 a calle 5).

Para la expresión de RAP como fusión a BP26 de *B. abortus*, se amplificó el gen

*rap1* sin la secuencia correspondiente al péptido señal (Figura II.1 b). Este amplicón fue clonado en el plásmido integrativo  $\Delta 3.1$ , derivado de pBR322, que contiene el promotor y la secuencia que codifica para la proteína periplásmica BP26 de *B. abortus* con una deleción de 500pb (Campos y col., 2002). No se pudo lograr el clonado del gen bajo este promotor, encontrándose el gen en todos los casos en la orientación inversa. Se intentó clonar el gen *rap1* bajo el promotor *lacZ*, con la secuencia Shine Delgarno (SD) del gen *bp26* y la secuencia codificante al péptido señal de BP26, pero todos los clones resultantes tenían *rap1* en la orientación inversa. Esto nos hizo suponer que, o bien la fusion BP26-RAP1 es tóxica para *E. coli* o la secuencia SD incluida es la responsable de la toxicidad. Para descartar esta última posibilidad, se realizaron nuevas construcciones sin la secuencia SD de *bp26*, pero tampoco fue posible el clonado en estas condiciones.



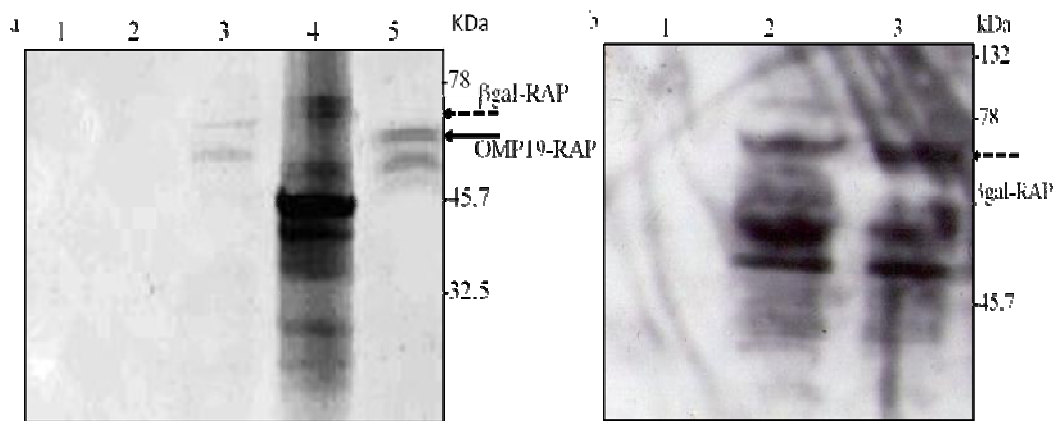
**Figura II.1 Análisis en agarosa al 1,5% de productos de amplificación por PCR obtenidos con (a) los oligonucleótidos prapf y prapr para amplificar el gen *rap1* completo.** 1: amplificación sobre extracciones de ADN de *B. bovis*; 2: control negativo amplificación sin DNA; 3: marcador de peso molecular 1 kb (Promega) y **(b) los oligonucleótidos p26rapstf y p26rapstr para amplificar el gen *rap1* sin la secuencia que codifica para la región transmembrana.** 1: marcador de peso molecular 1 kb (Promega); 2: amplificación sobre extracciones de ADN de *B. bovis*; 3: control negativo

Tanto para la quimera  $\beta$ gal-RAP1 como para OMP19-RAP, se detectó degradación de la proteína quimérica. Lo mismo se observó cuando se expresaron estas proteínas en *E. coli* (no se muestran los datos). Aparentemente, RAP1 fusionada a los primeros aminoácidos de OMP19 sería más estable ya que se puede observar menor degradación



de la proteína en este caso.

Dado que para el control de la babesiosis existe gran interés en poder vacunar también animales adultos, se evaluó la expresión de RAP en RB51. En este caso, se utilizó el plásmido pRAP. Al igual que con la cepa *B. abortus* S19, RAP1 pudo ser expresada, aunque los niveles de expresión fueron menores y el Western blot tuvo que ser revelado por quimioluminiscencia. En este caso también se observó degradación de la quimera  $\beta$ gal-RAP1 (Figura II.2 b).

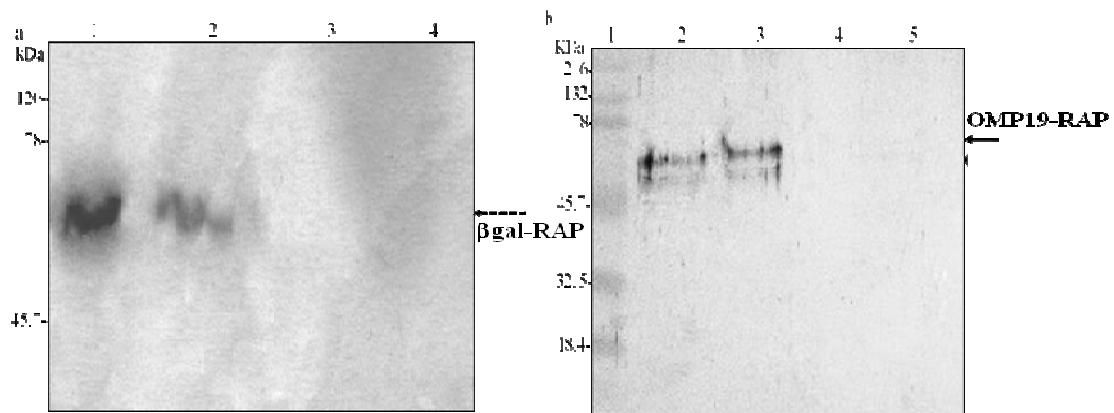


**Figura II.2. Análisis de la expresión de RAP1 en *B. abortus* S19 y *B. abortus* RB51.** Western blot realizado en membranas de nitrocelulosa con extractos proteicos totales revelado con anticuerpos anti-RAP1 (anticuerpo monoclonal MoBAB75A4), dilución 1:200. **(a) S19.** Las calles corresponden a extractos proteicos totales de: 1. Sp, 2. Spomp19, 3. SpRAP, 4. rRAP y 5. Spomp19-RAP. **(b). RB51.** Las calles corresponden a extractos proteicos totales de: 1. Rp, 2. RpRAP 1, 3. RpRAP 2, El peso molecular se indica a la derecha (en kDa).  $\beta$ gal-RAP1 así como RAP1 fusionada a la secuencia señal de OMP19 (OMP19-RAP) se encuentran señaladas con una flecha discontinuada y continua, respectivamente. Sp: S19 pBBR1MCS2; SpRAP: S19 pRAP; Spomp19: S19 pomp19-RAP; Rp: RB51 pBBR1MCS2; RpRAP: RB51 pRAP. (Ver Abreviaturas)

### 1.2. Localización subcelular de OMP19-RAP y $\beta$ gal-RAP en S19

Con el objetivo de determinar la localización subcelular de las proteínas heterólogas en S19, se realizó un fraccionamiento subcelular de ambas cepas, SpRAP y Spomp19-RAP. Sorprendentemente, el fraccionamiento reveló que RAP1 se localiza en asociación a la membrana en ambos casos: como fusión a OMP19 (Figura II.3 a) y a  $\beta$ -galactosidasa (Figura II.3 b). Posiblemente esto se deba a propiedades intrínsecas de RAP1. La pureza de la fracción de membrana se confirmó por la detección de OMP19

usando antisuero anti-OMP19 y por la ausencia de bandas al usar antisuero anti-L7/L12 (proteínas de citoplasma) o BP26 (periplásmica) en ensayos adicionales de Western blot (no se presentan los datos).



**Figura II.3. Análisis de la localización subcelular de RAP1 expresada en la cepa de *Brucella abortus* S19.** Detección de proteínas quiméricas en fracciones subcelulares de *B. abortus* S19 por medio de Western blot revelados con anticuerpo monoclonal MoBAB75A4 (dilución 1/200). Las fracciones subcelulares se sometieron a SDS-PAGE (10%) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. **(a) SpRAP:** 1. Extracto proteico total de SpRAP, 2. SpRAP P150000 (fracción proteica de membrana), 3. SpRAP S150000 (fracción citoplásmica,), 4. Extracto proteico total de Sp. **(b) Spomp19-RAP:** 1. El marcador de peso molecular utilizado es preteñido de amplio rango (Broad Range, BioRAD),. 2. Extracto proteico total de Spomp19-RAP, 3. Spomp19-RAP P150000 (fracción proteica de membrana; *pellet* de ultracentrifugación), 4. Spomp19-RAP S150000 (fracción citoplásmica, sobrenadante de ultracentrifugación), 5. Extracto proteico total de Sp. Las bandas esperadas se señalan con una flecha continua, OMP19-RAP, y discontinua, βgal-RAP.

### 1.3. Ensayo de lipidación de OMP19-RAP en *B. abortus*

La globomicina es un inhibidor específico de la peptidasa señal II e induce acumulación de precursores lipoproteicos (Inukai y col., 1978; Harrington y col., 2000). OMP19 es una lipoproteína y en presencia de globomicina se acumula su precursor (Tibor y col., 1999).

Se analizó la posible lipidación de RAP1 al ser expresada como fusión a OMP19 de *B. abortus*, dado que la secuencia de OMP19 mantiene la región de lipidación. Para esto, se realizó un tratamiento de las cepas de *E. coli* (no se muestran los resultados) y *B. abortus* que expresan la proteína quimérica OMP19-RAP (EpompOMP19-RAP y SpompOMP19-RAP, respectivamente) con globomicina B o etanol al 2% (como control). En ningún caso se observó la banda esperada correspondiente a la proteína de fusión sin procesar (precursor) en el análisis por Western blot de extractos totales de

estas recombinantes. De esta manera no fue posible confirmar la naturaleza lipoproteica de la quimera.

### **2. Ensayos en ratones de las cepas recombinantes de *Brucella* para RAP1**

La siguiente pregunta fue si RAP1 expresada en *B. abortus* era capaz de generar una respuesta inmune en el curso de una infección experimental en el modelo de ratón y si existían diferencias entre las construcciones obtenidas. A su vez, el primer paso es la evaluación de la estabilidad de las construcciones y las características de infección de las cepas recombinantes.

Se inocularon intraperitonealmente (i. p.) grupos de 5 ratones BALB/c con  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias (UFC) de S19 pRAP (SpRAP), S19 pomp19-RAP (SpompOMP19-RAP), o S19 pBB1MRC2 (Sp) en 200  $\mu$ l de solución salina (PBS). Se incluyó un grupo inoculado sólo con la proteína recombinante como control (25  $\mu$ g/ml en adyuvante de Freund). A distintos tiempos posinoculación (semanas 3 y 4), se tomaron muestras de sangre de cinco animales por grupo y se separó el suero para analizar por Western blot su reactividad contra la proteína RAP1 purificada (rRAP1). Los bazos fueron extraídos, pesados y una mitad de cada uno fue homogeneizada en 5 ml de PBS con el objetivo de hacer recuento de bacterias y analizar la estabilidad de los plásmidos en las cepas recombinantes. La otra mitad fue utilizada para el análisis de liberación de IFN- $\gamma$  ante la estimulación específica contra RAP1 y sus controles.

Otro grupo fue inoculado con  $1 \times 10^8$  UFC de RB51 (R) o RB51 pRAP (RpRAP) en 200  $\mu$ l de solución salina (PBS). Se realizaron los mismos procedimientos.

#### **2.1. Virulencia residual de las cepas recombinantes S19 y estabilidad de los plásmidos en el modelo murino de infección para *Brucella***

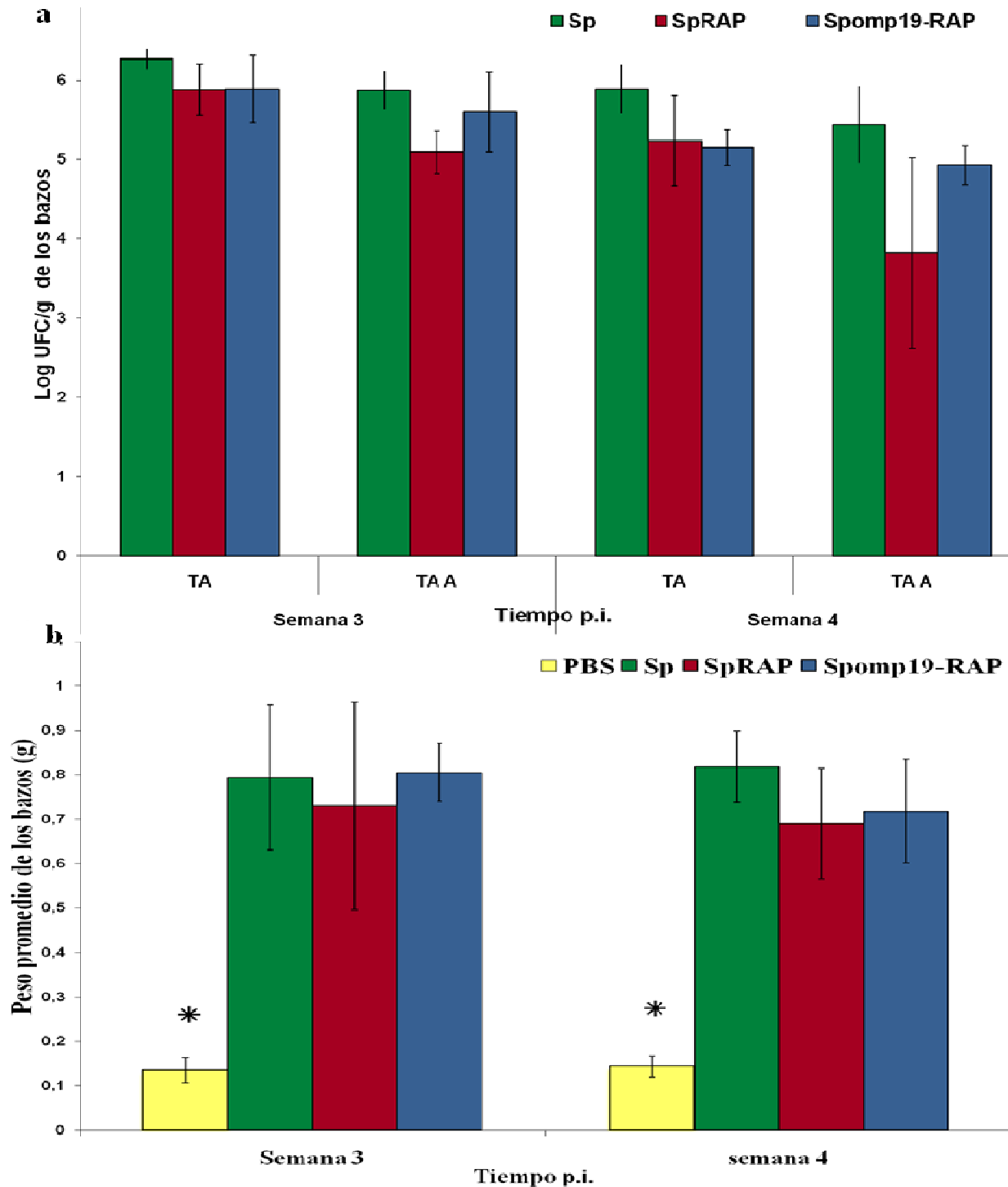
Se evaluó la estabilidad de los vectores comparando las UFCs de cada cepa recuperadas de los bazos. Se determinó el número de bacterias en el bazo por diluciones seriadas de los homogenatos y plaqueo por duplicado en agar triptosa (TA) y en agar triptosa con el antibiótico de selección correspondiente (TA A): kanamicina (25  $\mu$ g/ml) o ampicilina (10  $\mu$ g/ml) (Figuras II.4 y II.5).

Si bien en los bazos de los ratones inoculados con SpRAP hubo una disminución en el número de bacterias resistentes a antibióticos a las cuatro semanas posinoculación, las diferencias no son estadísticamente significativas (Figura II.4a). Sin embargo, es

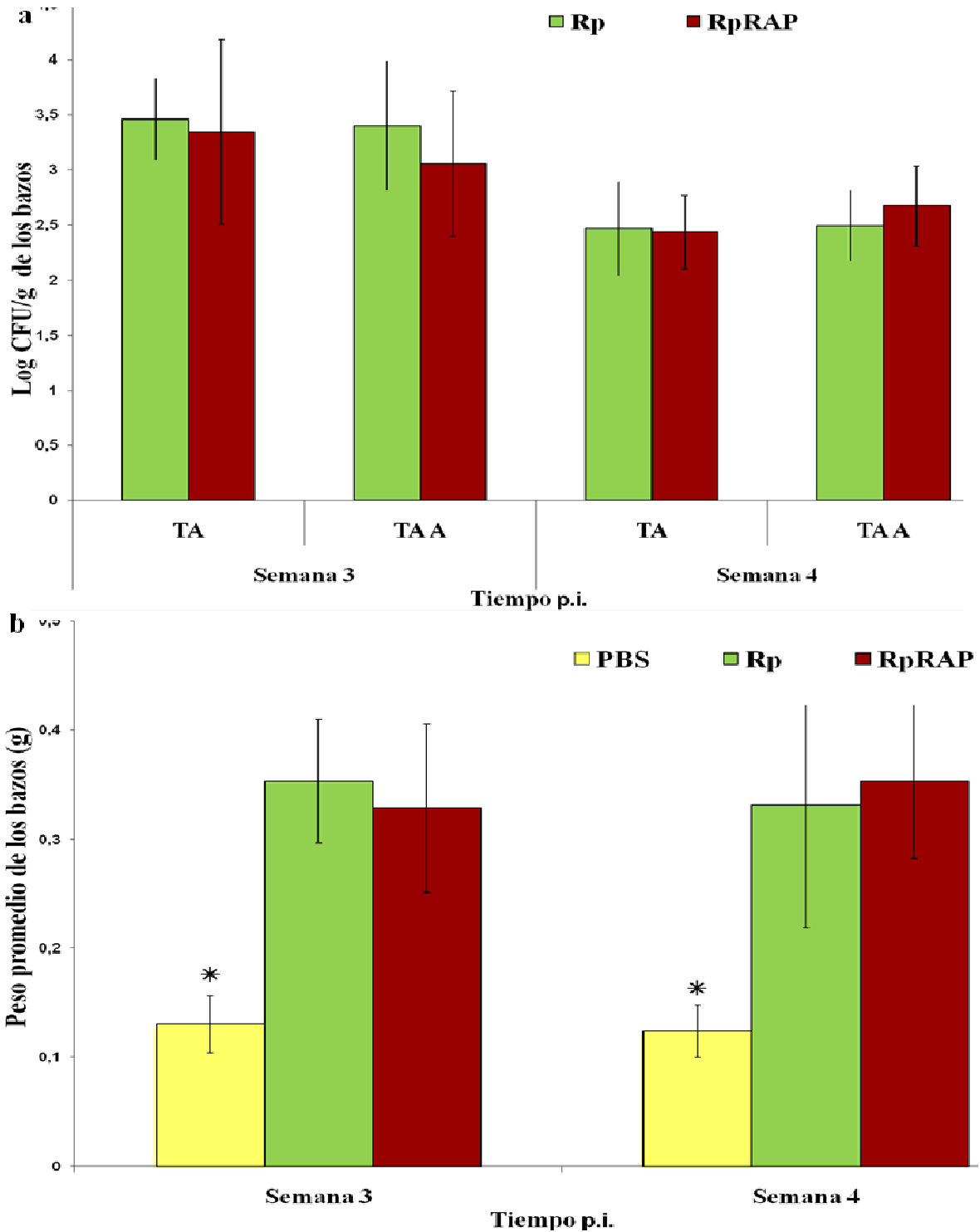
interesante mencionar que se encontró que SpRAP presenta mayor pérdida del plásmido que Spomp19-RAP, como lo indica el menor número de UFCs de SpRAP en el medio sólido suplementado con antibiótico (TA A) comparado al sin antibiótico (TA).

Queda por investigar si alguna característica de pomp19-RAP le confiere al plásmido mayor estabilidad durante la replicación de la bacteria *in vivo*. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el número de UFCs de Sp, SpRAP y Spomp9-RAP recuperadas de los bazos de los ratones cuando se compararon los grupos entre sí, lo que indica que las tres cepas mantienen características de colonización similar. Tampoco se detectaron diferencias en el número de bacterias recuperadas en presencia o no del antibiótico de selección en la cepa RpRAP (Figura II.5 a). Esto indicaría que el plásmido pRAP es estable durante la replicación de *B. abortus* RB51 en el ratón. El tamaño del bazo se correlaciona con la replicación de las bacterias en el mismo y con la atracción de células del sistema inmune. Concordantemente con los resultados de las UFCs, no se encontraron diferencias en el tamaño del bazo de los ratones inoculados con Sp y con SpRAP o Spomp19-RAP (Figura II.4 b); ni entre los bazos de los inoculados con RpRAP y Rp (Figura II.5 b). Estos resultados sugieren que la expresión de RAP1 en S19 y RB51 no alteran las características de infección de *Brucella* en el modelo murino empleado.

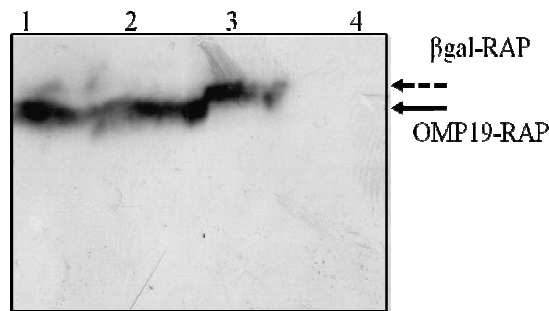
La expresión de RAP1 en las cepas recombinantes luego del pasaje *in vivo* se confirmó por SDS- PAGE seguido por Western blot analizando extractos totales de bacterias tomadas al azar recuperadas de los bazos de los ratones inmunizados (Figura II.6).



**Figura II.4. Estabilidad de los plásmidos y colonización de los bazo en ratones Balb/c inmunizados con las cepas recombinantes de S19.** Se inocularon intraperitonealmente ratones BALB/c con cada una de las cepas indicadas. Los bazo fueron procesados y se plaquearon diluciones seriadas en placas con o sin antibióticos, con el fin de determinar la estabilidad de los plásmidos. **Número de bacterias en bazo (a) y peso del bazo (b)** a las semanas 3 y 4 posinoculación. Las siglas TA y TAA corresponden a agar triptosa y agar triptosa suplementado con 10 ó 25 µg/ml de ampicilina o kanamicina, respectivamente. Los resultados están expresados como las medias de 5 ratones ± el desvío estándar (de). En el panel, los grupos con un asterisco mostraron diferencias significativas con respecto al grupo inoculado con PBS. (P<0.001). p.i.: posinoculación.



**Figura II.5. Estabilidad de los plásmidos y colonización de los bazos en ratones Balb/c inmunizados con las cepas recombinantes de RB51.** Se inocularon intraperitonealmente ratones BALB/c con cada una de las cepas indicadas. Los bazos fueron procesados y se plaquearon diluciones seriadas en placas con o sin antibióticos, con el fin de determinar la estabilidad de los plásmidos. **Número de bacterias en bazo (a) y peso del bazo (b)** a las semanas 3 y 4 posinoculación. Las siglas TA y TAA corresponden a agar triptosa y agar triptosa suplementado con 25 µg/ml de kanamicina. Los resultados están expresados como las medias de 5 ratones ± el desvío estándar (de). En el panel, los grupos con un asterisco mostraron diferencias significativas con respecto al grupo inoculado con PBS. (P<0.001). p.i.: posinoculación.



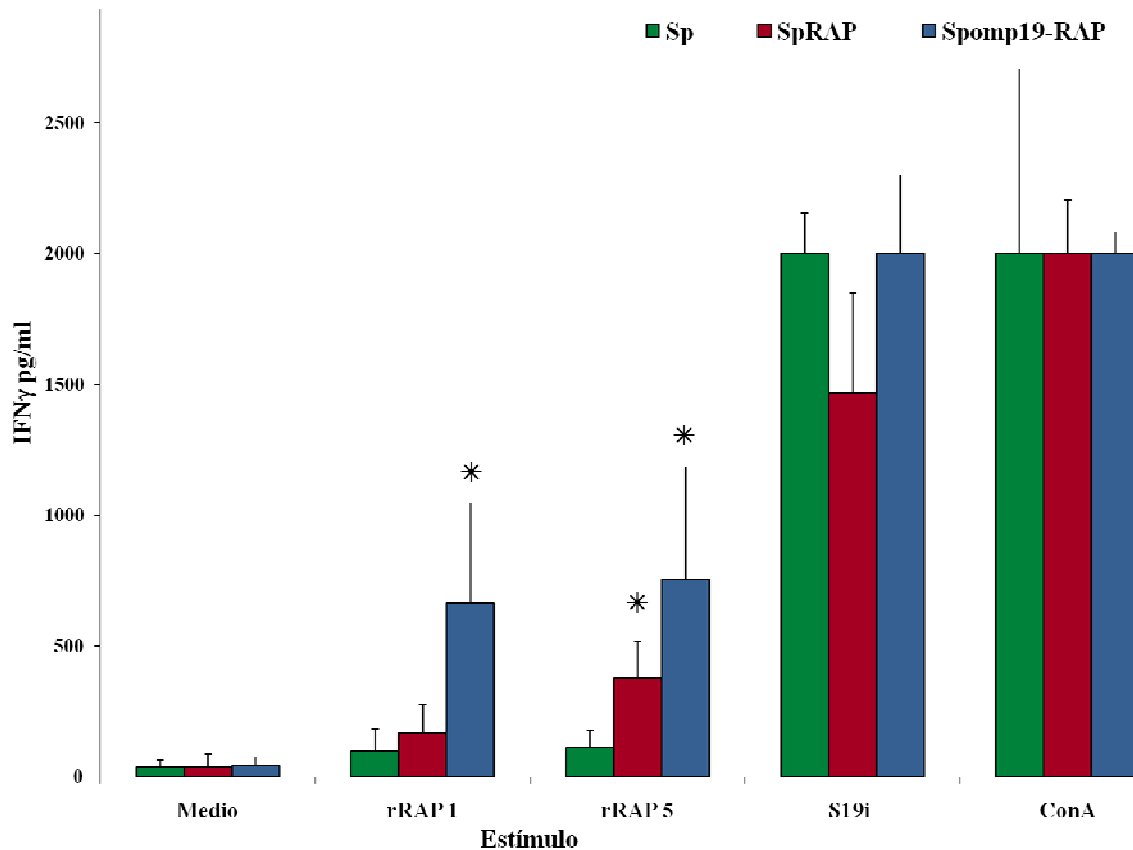
**Figura II.6. Expresión de  $\beta$ gal-RAP y OMP19-RAP de bacterias recuperada de los bazos de ratones inoculados.** Western blot realizado en membranas de nitrocelulosa con extractos proteicos totales de bacterias revelado con anticuerpos anti-RAP1 (anticuerpo monoclonal MoBAB75A4). Las calles corresponden a bacterias recuperadas de los bazos de ratones inoculados con: 1: Spomp19-RAP 1; 2: Spomp19-RAP 2; 3: SpRAP; 4: Sp.

## 2.2. Respuesta celular de las rS19 y rRB51 en el modelo murino de infección

Con el objeto de determinar la producción específica de IFN- $\gamma$  inducida por las cepas recombinantes de *Brucella* expresando RAP1, se sometieron los esplenocitos obtenidos de los bazos de los distintos grupos de ratones a diversos estímulos. Entre estos estímulos se incluyó a la proteína RAP expresada y purificada a partir de *E. coli* (rRAP) pretratada con polimixina B para reducir posibles trazas de LPS (Figura II.7). Los esplenocitos de los ratones infectados con SpRAP y Spomp19-RAP produjeron niveles de IFN- $\gamma$  significativamente mayores a los de los infectados con Sp cuando fueron estimulados con 5  $\mu$ g de RAP1 recombinante ( $P < 0,05$  y  $P < 0,01$ , respectivamente). Con menores concentraciones de RAP1, solamente el grupo infectado con Spomp19-RAP mostró diferencias significativas comparado con el control ( $P < 0,01$ ). A pesar de que parece haber una producción mayor por parte de los esplenocitos estimulados con rRAP en el grupo de ratones inoculados con Spomp19-RAP comparado con los del grupo inoculado con SpRAP, la diferencia no es estadísticamente significativa. Se obtuvieron resultados similares en otro experimento independiente (no se muestran los resultados). Como controles, el nivel de producción de IFN- $\gamma$  producido por la estimulación de los esplenocitos con concanavalina o S19 inactivada por calor fue alto en todos los casos. A su vez, no se detectó respuesta celular específica contra rRAP en animales inoculados con PBS (no se muestra).

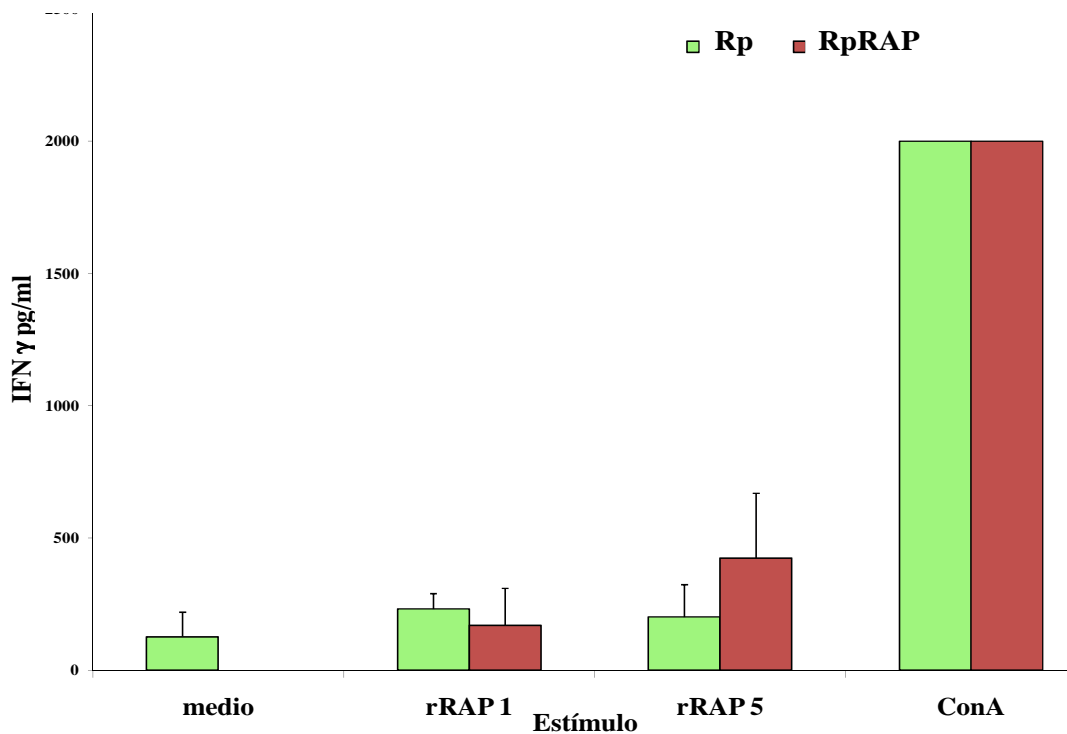
Como se observa en la figura II.8 los esplenocitos de los ratones inoculados con

RpRAP producen mayores niveles de IFN- $\gamma$  frente al estímulo con rRAP que los de los ratones inoculados con Rp. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas para ninguna de las concentraciones utilizadas. Esto podría deberse a bajos niveles de expresión de RAP1 en RB51. En base a estos resultados, se realizó una única experiencia en el caso de RB51 y se decidió continuar sólo con S19.



**Figura II.7. Producción de IFN- $\gamma$  a la semana 3 posinfección con rS19.** Se realizó un ELISA cuantitativo de IFN- $\gamma$  secretado por esplenocitos ante la estimulación de distintos antígenos durante 72 h. Las células ( $4 \times 10^6$  /ml) de los bazo de ratones inoculados con Sp, SpRAP, Spomp19-RAP o PBS (no se muestra) fueron estimuladas con 1 o 5  $\mu$ g de rRAP (rRAP.1 y RAP.5, respectivamente), concanavalina A (Con A), extractos totales de *B. abortus* inactivadas por calor (S19 i) o medio de cultivo RPMI 1640 (medio) como control negativo. Los resultados están expresados como (pg/ml) y representan las medias de 5 ratones  $\pm$  el error estándar.

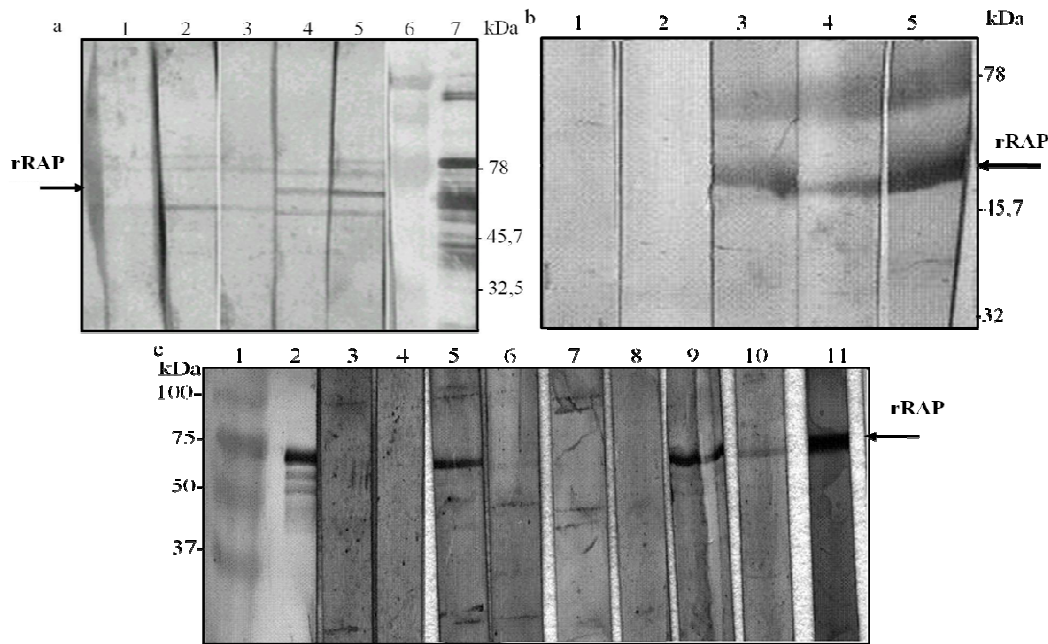




**Figura II.8. Producción de IFN- $\gamma$  a la semana 3 posinfección con rRB51.** Se realizó un ELISA cuantitativo de IFN- $\gamma$  secretado por esplenocitos ante la estimulación de distintos antígenos durante 72 h. Las células ( $4 \times 10^6$  /ml) de los bazo de ratones inoculados con Rp, RpRAP o PBS fueron estimuladas con 1 o 5  $\mu$ g de rRAP (rRAP.1 y RAP.5, respectivamente), concanavalina A (Con A), extractos totales de *B. abortus* inactivadas por calor (S19 i) o medio de cultivo RPMI 1640 (medio) como control negativo. Los resultados están expresados como (pg/ml) y representan las medias de 5 ratones  $\pm$  el error estándar.

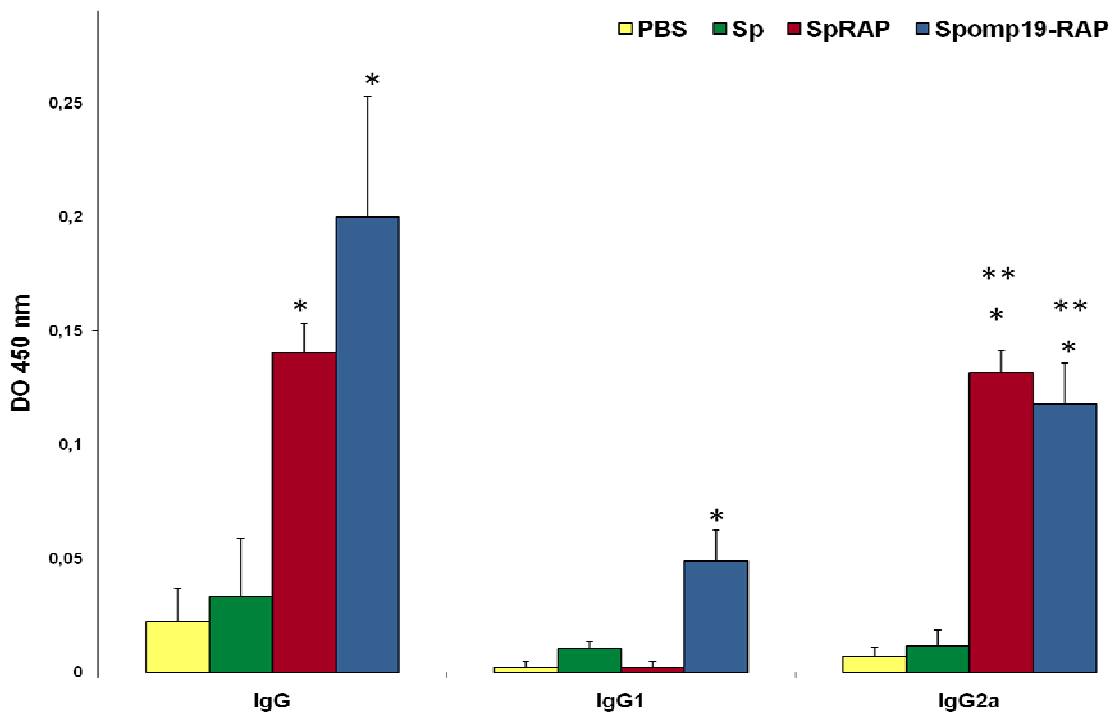
### 2.3. Respuesta humoral contra RAP

Para determinar si la inmunización con las cepas recombinantes genera una respuesta de anticuerpos contra RAP, se examinó la respuesta humoral por Western blot (Figura II.8). En todos los tiempos evaluados se detectó reactividad serológica contra RAP1 (Figura II.9 a y b) o extractos de *B. bovis* (Figura II.8 c) en los sueros de los animales inoculados con SpRAP (Figura II.8 a y c) y Spomp19-RAP (Figura II.9 b y c). En ninguno de los controles negativos (sueros de ratones inoculados con PBS o S19) se detectaron anticuerpos específicos contra rRAP.



**Figura II.9. Respuesta humoral específica contra rRAP1 en los ratones inoculados con las distintas rS19. (a):** antígeno rRAP; suero de ratones inmunizados con **SpRAP**: Referencias: 1. PBS, 2. Sp semana 3; 3. Sp semana 5, 4. SpRAP semana 3, 5. SpRAP semana 5. 6. Peso molecular Kaleidoscope Biorad y 7. Incubación con el anticuerpo monoclonal anti-RAP1 (MoBAB75A4). **(b): antígeno rRAP**; suero de ratones inmunizados con **Spomp19-RAP**: Referencias: 1. PBS; 2. Spomp19; 3. Spomp19-RAP semana 3; 4. Spomp19-RAP semana 5; 5. rRAP1. **(c): extracto proteico total de *Babesia bovis***; suero de ratones inoculados con **SpRAP y Spomp19-RAP**: 1. Peso molecular Broad range, Biorad. 2. anticuerpo monoclonal MoBAB75A4 (control) 3. PBS semana 3; 4. PBS semana 5; 5. SpRAP semana 3; 6. SpRAP semana 5; 7. Sp semana 3; 8. Sp semana 5; 9 Spomp19-Rap semana 3; 10. Spomp19-Rap semana 5; 11. rRAP1. Se indican los pesos moleculares (en kDa). La banda esperada se señala con una flecha.

Estos resultados indican que al utilizar S19 como vector de expresión se genera respuesta de anticuerpos contra la proteína rRAP1. Las subclases de anticuerpos fueron estudiadas por ELISA indirecto. Se observó una mayor presencia de IgG2a (Figura II.10) en los sueros de ratones inoculados con SpRAP y Spomp19-RAP comparado a los de los inoculados con Sp, sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre los dos primeros grupos mencionados. Estos resultados sugieren que con este sistema se desarrolla una respuesta de tipo Th1. En conjunto, estos resultados confirman la inducción de una respuesta celular y de anticuerpos específica contra rRAP1 al usar *B. abortus* S19 como un vector de expresión *in vivo*. Los resultados preliminares en RB51 sugieren que no se generaría una respuesta humoral (datos no mostrados) y habría una respuesta celular específica contra rRAP1 aunque las diferencias estadísticas con las cepas que llevan el plásmido vacío (pBBR1MCS) no fueron significativas con respecto al control (Figura II.9).



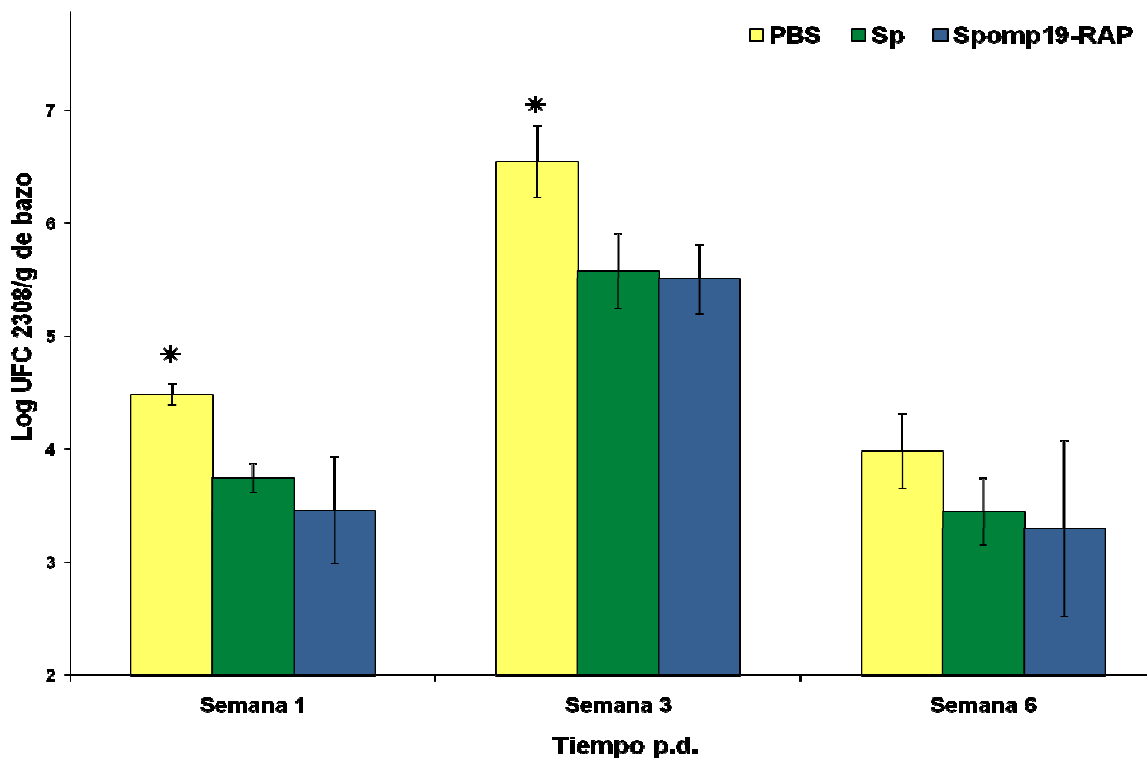
**Figura II.10. Detección de anticuerpos específicos contra rRAP en suero de ratones inoculados con las distintas cepas de *Brucella abortus* S19 y controles inoculados con PBS.** Se recolectó el suero de los ratones de cada grupo a las 3 y 4 semanas posinoculación. Cada barra corresponde a la media de la absorbancia a 450 nm del color desarrollado (n= 5 ratones); las barras de error indican el error estándar. Grupos: PBS (barra amarilla), *B. abortus* Sp (barras verde), *B. abortus* SpRAP (barra roja) o *B. abortus* Spomp19-RAP (barra azul). En todos los casos el suero se probó contra rRAP1 (5 µg/ml). Los grupos marcados con un asterisco mostraron diferencias significativas con respecto a ambos grupos control (PBS y Sp) (P<0,05). Los grupos con 2 asteriscos mostraron diferencias significativas de acuerdo al subtipo de anticuerpo IgG, siendo IgG2a significativamente mayor a IgG1 (P<0,01).

#### 2.4. Capacidad protectora frente al desafío con la cepa patógena 2308 de *B. abortus*.

Con el objetivo de determinar si la capacidad protectora de *B. abortus* S19 se ve afectada por la expresión del antígeno heterólogo RAP1, se comparó el nivel de protección conferido por Spomp19-RAP con respecto al de S19. Se eligió Spomp19-RAP por ser la cepa que presentó mejores resultados en los ensayos anteriores. Cinco ratones por grupo fueron inoculados i.p. con 0,2 ml de PBS (grupo control) o con 0,2 ml de PBS conteniendo  $10^5$  UFC de Sp o Spomp19-RAP. Todos los grupos fueron desafiados a las 10 semanas posinoculación con  $5 \times 10^4$  UFC de *B. abortus* S2308 por ratón. Los ratones fueron sacrificados, se les extrajo el bazo y se examinó la replicación de *Brucella* a

distintos tiempos posdesafío. Con el objetivo de descartar que las bacterias presentes en el bazo fueran producto de reactivación de las cepas vacunales, el recuento de las bacterias obtenidas después del desafío se realizó por duplicado en placas suplementadas y no suplementadas con eritritol. El eritritol es un hidrato de carbono que puede ser utilizado como fuente de carbono por las cepas salvajes de *Brucella* pero que resulta tóxico para S19 (Sangari y col., 1994). Se obtuvieron recuentos del mismo orden en ambos casos, demostrando que las bacterias contadas son efectivamente S2308.

Los ratones vacunados con la cepa recombinante Spomp19-RAP presenta menor número de S2308 esplénicas que los ratones control, y niveles similares a los del grupo inoculado con Sp (Figura II.11). No se observan diferencias significativas entre ambos grupos, Sp y Spomp19-RAP. Estos resultados indicarían que la capacidad protectora de S19 no se ve afectada por la expresión de RAP1 y que la cepa de S19 recombinante es capaz de despertar una respuesta anti-brucella equivalente a la generada por S19.



**Figura II.11. Protección de ratones vacunados con Spomp19-RAP y Sp contra el desafío con la cepa patógena S2308.** Las barras corresponden al promedio de 5 ratones y su desvío estándar. \*( $P < 0.01$ ) grupo significativamente distinto de los demás por prueba de ANOVA seguido de comparaciones múltiples.

### Resumen de resultados:

- El antígeno RAP1 de *B. bovis* fue expresado como fusión a los primeros aminoácidos de  $\beta$ galactosidasa de *E. coli* ( $\beta$ gal-RAP) y como fusión a los primeros aminoácidos de OMP19 de *B. abortus* (OMP19-RAP) en *B. abortus* S19.
- No pudo clonarse el gen *rap1* como fusión a *bp26* de *B. abortus*
- Ambas quimeras,  $\beta$ gal-RAP y OMP19-RAP, se localizaron en la fracción de membrana de S19.
- Los plásmidos utilizados pRAP y pomp19-RAP resultaron estables *in vivo* sin presión de selección; y las secuencias promotoras seleccionadas expresaron las distintas quimeras de RAP activamente durante la replicación de *Brucella* en el ratón.
- La expresión de RAP1 en los contextos ensayados no alteró las características de infección de S19 y RB51 en el modelo murino empleado.
- Los ratones inmunizados con SpRAP o Spomp19-RAP desarrollaron una respuesta inmune celular y de anticuerpos específica contra RAP1, siendo IgG2a el isotipo predominante.
- La capacidad protectora de S19 no se vio afectada por la expresión de OMP19-RAP1 y las cepas de S19 recombinantes fueron capaces de despertar una respuesta anti-brucella equivalente a la generada por S19.

Se necesitan más datos para sacar conclusiones de la respuesta inmunológica generada por los ratones inoculados con RpRAP, aunque los datos preliminares sugieren que la respuesta celular generada sería menor.

En conjunto, estos resultados confirman la posibilidad de utilizar a S19 como vector de expresión de RAP1 de *B. bovis* con una inducción de respuesta inmune tanto de anticuerpos como celular específica contra RAP1 de tipo Th1 en el modelo de experimentación utilizado y manteniendo la capacidad protectora equivalente a la cepa vacunal S19.

## **CAPÍTULO III**

***Brucella abortus* como vector de expresión  
de antígenos de micobacterias  
(*Mycobacterium bovis*)**

### **Tuberculosis bovina**

La tuberculosis bovina (TBb), causada por *Mycobacterium bovis*, es una zoonosis con distribución mundial. El ganado es el hospedador y reservorio principal de esta infección crónica, pero puede infectar a otras especies de mamíferos, entre ellos el humano (Chambers y col., 2009). *M. bovis* generalmente se transmite vía aérea y las principales vías de contagio al hombre son el contacto con animales enfermos y el consumo de productos lácteos no pasteurizados.

### **MPB83**

MPB83 es un antígeno de función desconocida sero-dominante en el ganado infectado con *M. bovis* (Wiker y col., 1996). Es una lipoproteína glicosilada que se localiza en membrana (Hewinson y col., 1996), posiblemente a través de la interacción de su residuo lipídico ubicado en el N-terminal con la membrana de la micobacteria y que es procesada por la peptidasa de señal II. En extractos totales de micobacterias se detectan por Western blot dos bandas una de 26 kDa y de 23 kDa que se postula corresponderían a diferentes formas glicosiladas de la misma (Wiker y col., 1996).

Debido a su capacidad de inducir respuesta humoral y celular contra micobacterias tanto en infecciones experimentales en varios modelos animales y en infecciones naturales en humanos (Harboe y col., 1995; Wiker y col., 1996), se lo considera un importante candidato para el desarrollo de vacunas (Chambers y col., 2010; Delogu y col., 2009). Sin embargo, en ensayos de vacunas a ADN desnudo en bovinos utilizando ADN que codifica para este antígeno y para MPB70, los resultados de protección contra el desafío con una cepa virulenta resultaron bajos (Wedlock y col., 2003), aunque mejoraron al inocular simultáneamente DNA que codifica para los antígenos MPT64 y AG85B (Cai y col., 2004). Por estas razones, si bien MPB83 no es en sí mismo un antígeno suficiente para conferir protección, resulta un modelo atractivo para estudiar la respuesta a antígenos humorales y celulares a la vez que podría formar parte de un grupo de antígenos protectivos.

### 1. Obtención de cepas recombinantes de *Brucella* que expresen MPB83 de *Mycobacterium bovis*.

#### 1.1. Clonado del gen heterólogo y expresión de las proteínas quiméricas $\beta$ gal-MPB83, BP26-MPB83 y OMP19-MPB83.

Con la finalidad de expresar MPB83 en diversos contextos de presentación antigénica, este antígeno se expresó como fusión a los primeros aminoácidos de la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* y de BP26 y OMP19, de *B. abortus*.

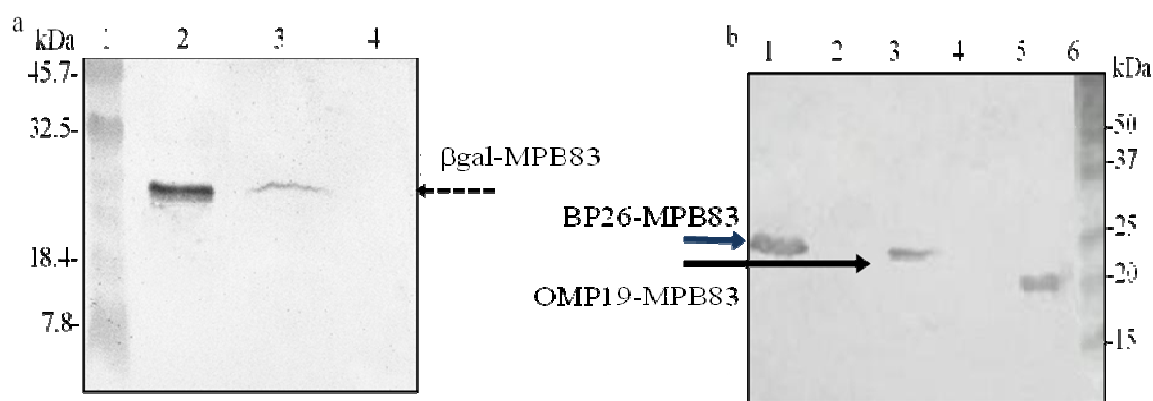
Se amplificó *mpb83* a partir de ADN de *M. bovis* AN5. El producto de amplificación fue clonado bajo el promotor *lacZ* como fusión a la secuencia que codifica para los primeros 36 aminoácidos de  $\beta$ -galactosidasa en el vector replicativo pBBR1MCS-2 (Kovach y col., 1995) (Figura I.1, capítulo I) y se verificó la orientación correcta del clonado por PCR de colonia (no se muestran los resultados). Se analizó la expresión de MPB83 en la cepa de *E. coli* por medio de Western blot revelado con un anticuerpo monoclonal anti-MPB83. Posteriormente, se seleccionó un clon que expresaba la proteína de fusión, se extrajo el plásmido recombinante y se confirmó la construcción por secuenciación. A este plásmido se lo denominó p83 y con él se transformaron por electroporación bacterias de la cepa S19 de *B. abortus* obteniéndose la cepa Sp83. La expresión fue confirmada por Western blot (Figura III.1 a).

Con el objetivo de expresar la proteína en un contexto asociado a membrana a través de un residuo lipídico, lo que podría llegar a otorgarle mayor inmunogenicidad al antígeno heterólogo, MPB83 se expresó como fusión a los primeros aminoácidos de la proteína de membrana externa OMP19 de *B. abortus*, incluyendo el péptido señal y la señal de lipidación. Para esto, se clonó el *mpb83* en el vector replicativo *pomp19* (Sabio y García y col., 2008; y esta tesis) como fusión a los primeros 38 aminoácidos de la proteína de membrana externa OMP19 (Figura I.2, capítulo I). Se detectó la expresión de la proteína quimérica en *E. coli*. La construcción fue confirmada por secuencia del plásmido recombinante obtenido. Con este plásmido se transformaron bacterias *B. abortus* S19 por electroporación y se confirmó por Western blot la expresión de la proteína de fusión en las bacterias obtenidas (Figura III.1 b). Se seleccionó una de las colonias y se la denominó Spomp19-83.

Para la expresión en el periplasma bacteriano, se construyó una fusión del antígeno MPB83 al péptido señal y primeros aminoácidos de la proteína periplásmica de *Brucella*



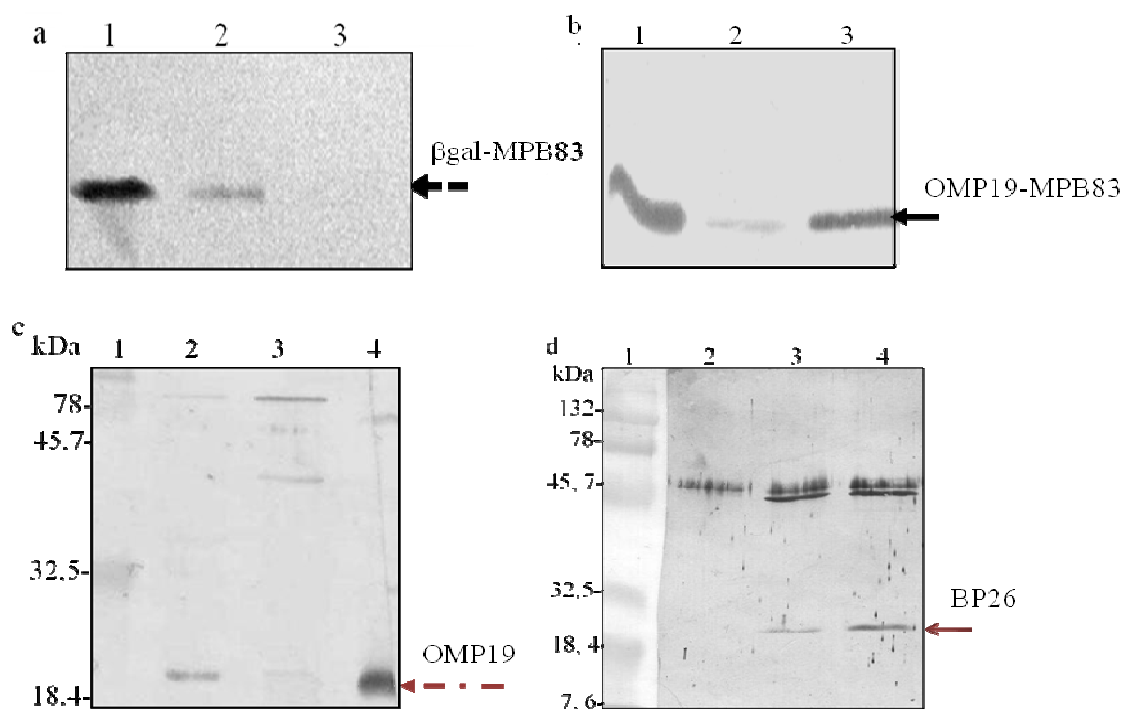
BP26 (Arese y col., 1999) en un plásmido integrativo. Con este fin, el producto de amplificación fue clonado en el vector no replicativo pKS26 (Campos y col., 2002) como fusión al péptido señal de la proteína periplásmica BP26 de *B. abortus*, dando origen al plásmido p26-83 (Figura I.3 del capítulo I). Se transformaron bacterias competentes de la cepa *B. abortus* S19 por electroporación con el vector p26-83. Las bacterias transformadas fueron seleccionadas por plaqueo en medio sólido suplementado con kanamicina (resistencia portada por el plásmido). Como se trata de un plásmido suicida para *Brucella*, con la selección con kanamicina, las colonias obtenidas corresponden a bacterias en las que el plásmido se integró al cromosoma por un único evento de recombinación homóloga (por homología de las secuencia *bp26*). Por medio de Western blot se corroboró la expresión de la proteína BP26-MPB83 (Figura III.1 b). De estas colonias se seleccionó una y se la denominó Sp26-83.



**Figura III.1: Análisis de expresión de MPB83 como proteína de fusión en *B. abortus* S19.** Detección de proteínas quiméricas por Western blot realizado en membranas de nitrocelulosa con extractos totales de *B. abortus* S19 revelado con anticuerpo monoclonal anti-MPB83 (dilución 1/200) (a).  **$\beta$ gal-MPB83** 1: marcador de peso molecular (Kaleidoscope, BioRad); 2: control positivo: sobrenadante de *Mycobacterium bovis* AN5; 3: Sp83; 4: Sp. (b). **OMP 19-MPB83 y 26-MPB83** 1: Sp26-83; 2: Sp26; 3: Somp19-83, 4: Somp19; 5 control positivo: extracto proteico total de *Mycobacterium bovis* AN5; 6 marcador de peso molecular (All Blue, BioRad).  $\beta$ gal-MPB83, OMP19-MPB83 y BP26-MPB83 se encuentran señaladas con una flecha discontinua negra, continua negra o continua azul, respectivamente.

### 1.2. Localización subcelular de las proteínas quiméricas

Con el objetivo de analizar la localización subcelular de MPB83 en las cepas recombinantes generadas (rS19), se realizó un fraccionamiento subcelular de Sp83, Sp26-83 y Spomp19-83. La proteína quimérica como fusión a  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ gal-MPB83) se encontró en la fracción citoplasmática (Figura III.2 a) y la proteína quimérica como fusión a OMP19 (OMP19-MPB83) se detectó principalmente en la fracción de membrana (Figura III.2 b), como era esperado. Debido a la dificultad para aislar periplasma de *Brucella*, no pudimos confirmar la localización periplásmica de BP26-MPB83. Sin embargo, BP26-MPB83 se encontró en la fracción soluble (no se muestran los resultados), apoyando el hecho de que a pesar de la fusión al péptido señal de BP26, la proteína MPB83 fusionada a BP26 no se encuentra anclada a la membrana. Estos resultados sugieren, si bien no confirman, la localización periplásmica de la fusión. Como control de fraccionamiento se utilizaron antisueros policlonales de conejo contra OMP19 y BP26. Se muestran los resultados con el fraccionamiento de Spomp19-83. La detección de OMP19 coincidió con la fracción de membrana y la de BP26 con la fracción soluble (Figura III.2 b y c).

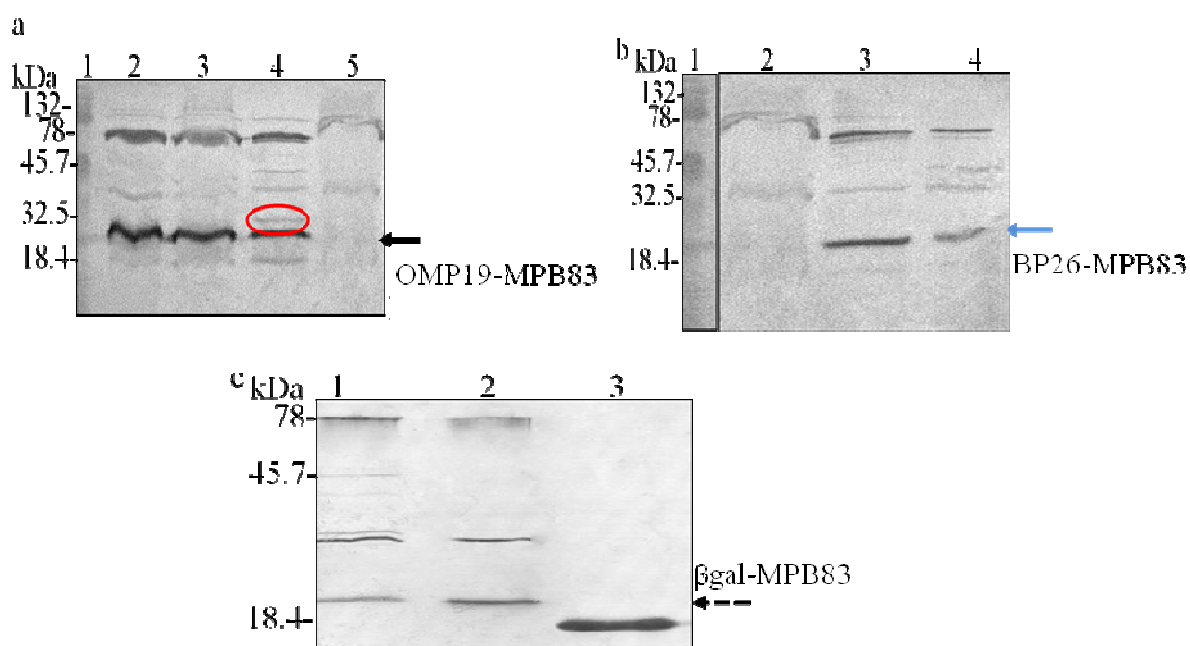


**Figura III.2: Análisis de la localización subcelular de MPB83 como proteína de fusión expresada en *B. abortus* S19.** Detección de proteínas quiméricas en fracciones subcelulares de *B. abortus* S19 por medio de Western blot revelados con anticuerpo anti-MPB83 (dilución 1/200). Las fracciones subcelulares se sometieron a SDS-PAGE (15%) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. **Panel (a):** Sp83. **Panel (b):** Spomp19-83. 1: extracto total de bacterias, 2: fracción citoplasmática, S150000, 3: fracción de membrana, precipitado de ultracentrifugación P150000. **(c) y (d) Control de fraccionamiento de Spomp19-83.** Detección de OMP19 y BP26 en fracciones subcelulares de *B. abortus* S19 por medio de Western blot revelados con anticuerpo anti-OMP19 (dilución 1/200) **(c)** o anti-BP26 (dilución 1/200) **(d)** según se indica en las figuras Referencias: 1. Peso molecular Kaleidoscope Biorad, 2. Spomp19-83 P150000 (fracción proteica de membrana; *pellet* de ultracentrifugación); 3. Spomp19-83 S150000 (fracción citoplásmica, sobrenadante de ultracentrifugación; 4 Lisado total de Spomp19-83. La flecha sólida marrón indica BP26, y la punteada marrón muestra a OMP19.

### 1.3. Ensayo de lipidación de OMP19-MPB83 en S19

Dado que OMP19 es una lipoproteína y que se mantuvo la región de lipidación en la construcción quimérica, se analizó la posible lipidación de OMP19-MPB83 en *B. abortus*. Para esto, se realizó un tratamiento con globomicina B, o etanol al 2% como control, en las cepas de *E. coli* (no se muestran los resultados) y de *B. abortus* (Fig III.3 a) que expresan la proteína quimérica OMP19-MPB83 (Epomp19-83 y Spomp19-83,

respectivamente). En el análisis por Western blot de extractos totales de estas recombinantes se observó que en ambos casos se detecta la aparición de una nueva banda correspondiente a la proteína de fusión sin procesar, correspondiente al precursor. En las tratadas con etanol al 2% (control), sólo se detectó la proteína quimérica madura. La inhibición del procesamiento por medio del uso de globomicina confirma la naturaleza lipoproteica de la proteína quimérica. Como controles, también fueron tratadas de igual manera las recombinantes Sp26-83 (Figura III.3 b) y Sp83 (Figura III.3 c) y en ningún caso se observó el precursor sin procesar.



**Figura III.3: Ensayo de lipidación de OMP19-MPB83 por tratamiento con globomicina:** Western blot de extractos totales de *B. abortus* S19 revelado con anticuerpo policlonal anti-MPB83. *B. abortus* S19 fueron tratadas con globomicina 50 ng/ml solubilizada en etanol 2% por 12 hs. **(a) Lipidación de OMP19-MPB83.** Referencias: 1. peso molecular Kaleidoscope (BioRad); 2. Spomp19-83 sin tratar; 3. Spomp19-83 tratadas con etanol; 4. Spomp19-83 tratado con globomicina diluída en etanol 5. Sp tratadas con globomicina. La elipse roja indica el precursor no procesado, y la flecha sólida muestra a OMP19-MPB83. **(b) Sp26-83 tratada con globomicina.** Referencias: 1. peso molecular Kaleidoscope (BioRad); 2 Sp tratadas con globomicina; 3: Sp26-83 tratadas con globomicina diluída en etanol; 4: Sp26-83 tratadas con etanol **(c) Sp83 tratada con globomicina.** Referencias: 1. tratadas con globomicina diluída en etanol, 2. tratadas con etanol; 3. control positivo: sobrenadante de la cepa de referencia *Mycobacterium bovis* AN5 (se detecta la forma secretada de MPB83 de 23 kDa). Las flechas sólidas negra y azul muestran las proteínas quiméricas **OMP19-MPB83 y BP26-MPB83, respectivamente, y la punteada negra indica La proteína  $\beta$ gal-MPB83.**

### 2. Ensayos en ratones de las cepas recombinantes de *Brucella* para MPB83

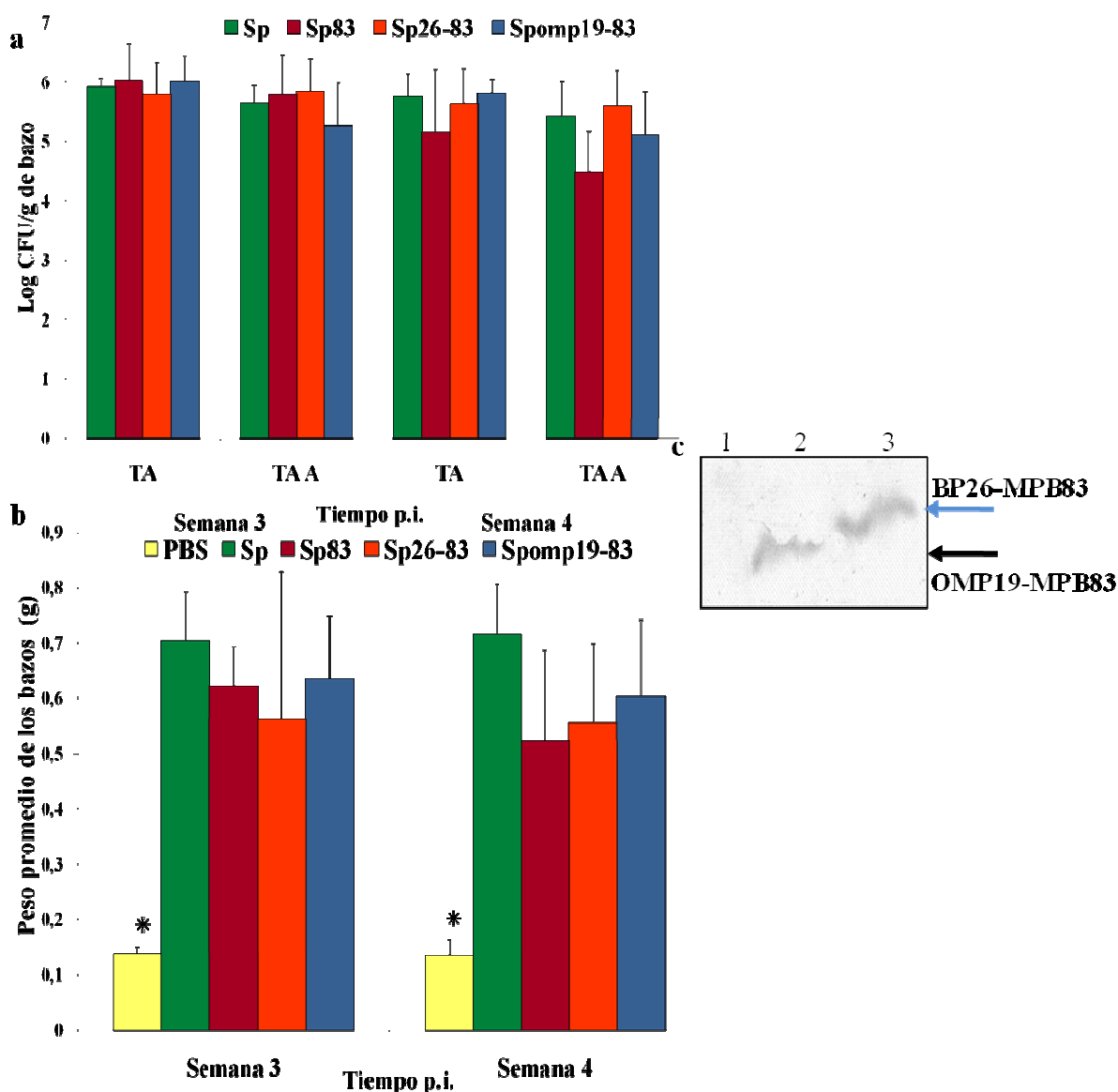
Con el objetivo de evaluar si la expresión de MPB83 afecta el patrón de infección de *B. abortus*, y la estabilidad de los vectores replicativos que portan *mpb83*, se realizaron ensayos de cinética de infección en el modelo murino de infección para *Brucella*. Grupos de 5 ratones BALB/c con fueron inoculados intraperitonealmente (i. p.) con  $1 \times 10^6$  UFCs de las distintas cepas en 200  $\mu$ l de solución salina (PBS). También se incluyeron grupos controles inoculados sólo con la proteína recombinante (rMPB83 (25  $\mu$ g/ml) en adyuvante incompleto de Freund's Adyuvant (SIGMA)) y otro PBS solo. A la tercera y cuarta semana posinoculación, se extrajeron los bazos. Se midió la cinética de la replicación bacteriana en bazo así como la esplenomegalia inducida por el microorganismo. Para determinar el número de bacterias se homogeneizó la mitad de cada bazo en 5 ml de PBS y se hicieron plaqu coastos de diluciones seriadas en medio con o sin el antibiótico de selección.

Por otro lado, parte de los bazos fueron utilizados para determinar la respuesta celular inducida por la proteína heteróloga. La reactividad humoral se analizó por medio de Western blot con el suero obtenido de los ratones sangrados vía retroplexoocular previo a ser eutanizados.

#### 2.1. Virulencia residual de las cepas recombinantes de S19 expresando MPB83 y estabilidad de los plásmidos en el modelo murino de infección para *Brucella*

La estabilidad de los vectores heterólogos se evaluó comparando el número de UFCs de cada cepa recuperadas de los bazos por diluciones seriadas de los homogenatos de los bazos y plaqueo por duplicado en agar triptosa (TA) y en agar triptosa suplementada con el antibiótico correspondiente (TA A). Aunque hay un menor número UFCs en los medios con los antibióticos de selección para las cepas que portan los plásmidos replicativos (Sp, Sp83 y Spomp19-83), las diferencias no fueron estadísticamente significativas para ninguno de los tiempos estudiados (Figura III.4 a). Esto indicaría que los vectores replicativos p83 y pomp19-83 son estables *in vivo*. El vector p26-83 es integrativo y como se esperaba, no se observaron diferencias entre el número de bacterias sembradas en placas con o sin antibióticos. Además, cuando estas cepas fueron crecidas en medios líquidos con o sin antibióticos no se observaron diferencias en los patrones de crecimiento en las cepas.

Con respecto al patrón de infección, las cepas de S19 recombinantes presentaron los mismos niveles de colonización del bazo que S19 con el plásmido vacío pBBRMCS-2 (Sp). Además, este nivel de colonización correlaciona con el esperado para este tipo de infección experimental con *B. abortus* S19 (Campos y col., 2002 y Boschioli y col., 1997). El tamaño del bazo se correlaciona con la replicación de las bacterias en el mismo, y con la atracción de células del sistema inmune. Concordantemente, se observó esplenomegalia en todos los grupos de ratones con respecto a los controles no infectados (PBS y rMPB83), dentro de los valores esperados para las infecciones de S19. No se observaron diferencias en el peso de los bazos entre los grupos de ratones infectados en ninguno de los tiempos (Figura III.4 b). Estos resultados sugieren que la expresión de MPB83 en S19 no altera las características de infección de *Brucella* en el modelo de infección murino. La expresión de MPB83 luego del pasaje *in vivo* se confirmó por SDS- PAGE seguido por Western blot analizando extractos totales de bacterias tomadas al azar recuperadas de los bazos de los ratones inmunizados (Figura III.4 c).



**Figura III.4: Estabilidad de los plásmidos y colonización de los bazos en ratones Balb/c inmunizados con las cepas recombinantes.** Se inocularon intraperitonealmente ratones BALB/c con cada una de las cepas indicadas. Los bazos fueron procesados y se plaquearon diluciones seriadas en placas con o sin antibióticos, con el fin de determinar la estabilidad de los plásmidos. **Número de bacterias detectadas en los bazos (a)** y **peso del bazo (b)**. Los datos son de 5 ratones infectados por grupo analizados a las semanas 3 y 4 posinfección y están representados por la media con sus respectivos desvíos estándar. El asterisco indica diferencias significativas con respecto a todos los otros grupos ( $p < 0.05$ ) analizados por el test no paramétrico de Kruskal Wallis. TA: Agar triptosa, TA A: agar triptosa suplementado con 25  $\mu\text{g/ml}$  de kanamicina. Los datos presentados corresponden a la media, con sus respectivos desvíos estándar (c) **Expresión de BP26-MPB83 y OMP19-MPB83 de bacterias recuperada de los bazos de ratones inoculados.** Western blot realizado en membranas de nitrocelulosa con extractos proteicos totales de bacterias revelado con anticuerpos anti-MPB83. Las calles corresponden a bacterias recuperadas de los bazos de ratones inoculados con: 1 Sp, 2. Spomp19-83, 3. Sp26-83. Los datos presentados corresponden a la media, con sus respectivos desvíos estándar

### 2.2. Respuesta celular de las rS19 en el modelo murino de infección

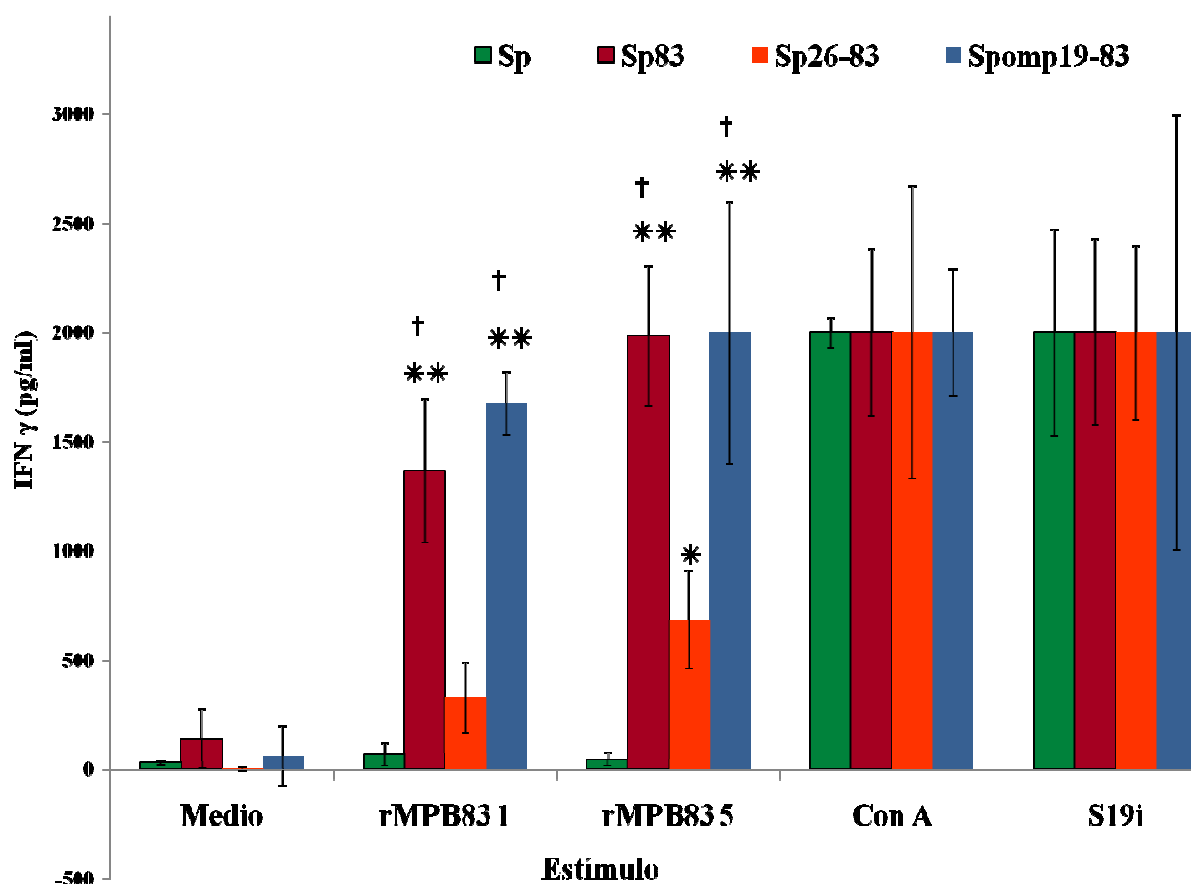
La siguiente pregunta que surgió fue si las proteínas heterólogas expresadas por las cepas recombinantes *B. abortus* serían capaces de generar una respuesta inmune específica contra el antígeno heterólogo en el curso de una infección experimental en el modelo murino de infección, y si había diferencias entre las construcciones evaluadas.

Con el objetivo de evaluar la estimulación de una respuesta celular específica, se midió la inducción de la producción de INF- $\gamma$  contra rMPB83 en esplenocitos aislados de ratones inmunizados con las cepas recombinantes.

El antígeno recombinante utilizado para la detección fue MPB83 expresada y purificada de *E. coli* (rMPB83) y pretratada con polimixina B, para reducir la potencial contaminación con LPS. Se inmunizaron ratones con las cepas Sp83, Sp26-83, Spomp-83 y con las cepas controles y a las 3 semanas posinfección se extrajeron y procesaron los bazos. Se obtuvieron los esplenocitos correspondientes a los bazos de los ratones inoculados con las distintas cepas. Los esplenocitos fueron estimulados durante 72 h con distintas concentraciones de rMPB83 (1 o 5  $\mu\text{g/pocillo}$ ), medio RPMI solo (control negativo), extracto de *B. abortus* S19 inactivado por calor o concanavalina A (Con A) (control positivo). Posteriormente, se evaluó la liberación de IFN- $\gamma$  por ELISA en los sobrenadantes de cultivo (Figura III.5).

Los resultados obtenidos mostraron que cuando fueron estimulados con 5  $\mu\text{g}$  de rMPB83, los esplenocitos de los ratones inoculados con Sp83 y Spomp19-83 produjeron mayor cantidad de IFN- $\gamma$  que los ratones inoculados con Sp o con PBS. Si bien la secreción de IFN- $\gamma$  es significativamente mayor en los esplenocitos de los ratones inoculados con Sp26-83 con respecto a los ratones inoculados con Sp, esta es estadísticamente menor que la respuesta de los otros grupos correspondientes a Sp83 y Spomp19-83. Además, a concentraciones menores (1  $\mu\text{g/pocillo}$ ) de rMPB83, solamente los esplenocitos de los grupos inoculados con Sp83 y Spomp19-83 muestran niveles mayores de IFN- $\gamma$  estadísticamente significativos con respecto a los controles ( $p < 0,001$ ). Como era de esperar, los esplenocitos estimulados con extractos de *B. abortus* S19 o con concanavalina A secretaron altos niveles de IFN- $\gamma$ , en todos los casos y los esplenocitos del grupo de ratones inoculados con la proteína recombinante rMPB83 o PBS no secretaron IFN- $\gamma$  al ser estimulados con rMPB83.



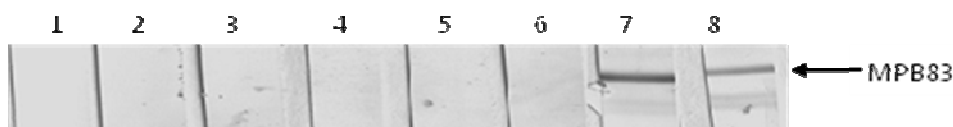


**Figura III.5: Producción de IFN- $\gamma$  de esplenocitos de ratones a la semana 3 posinfección con rS19.** Se realizó un ELISA cuantitativo de IFN- $\gamma$  secretado por esplenocitos ante la estimulación de distintos antígenos durante 72 hs. Las células ( $4 \times 10^6$  /ml) de los bazo de ratones inoculados con Sp, Sp83, Sp26-83, Spomp19-83 o PBS (no se muestra) fueron estimuladas con 1 o 5  $\mu$ g de rMPB83 (rMPB83.1 y MPB83.5, respectivamente), concanavalina A, extractos totales de *B. abortus* inactivadas por calor (S19 i) o medio de cultivo RPMI 1640 (medio) como control negativo. Cada barra representa a la mediana con su correspondiente intervalo de confianza de las respuestas de las células de los bazo de 5 ratones individuales. El doble asterisco representa diferencias significativas con respecto al grupo Sp ( $p < 0,001$ ). Un único asterisco indica diferencias significativas con respecto a Sp ( $p < 0,05$ ). † indica diferencias significativas con respecto a Sp26-83 ( $p < 0.05$ ). El análisis estadístico se hizo por análisis de varianzas y con el test de Tukey.

Estos datos confirman la inducción de una respuesta celular específica contra MPB83 al usar *B. abortus* como vector de expresión *in vivo*.

### 2.3 Respuesta humoral contra MPB83

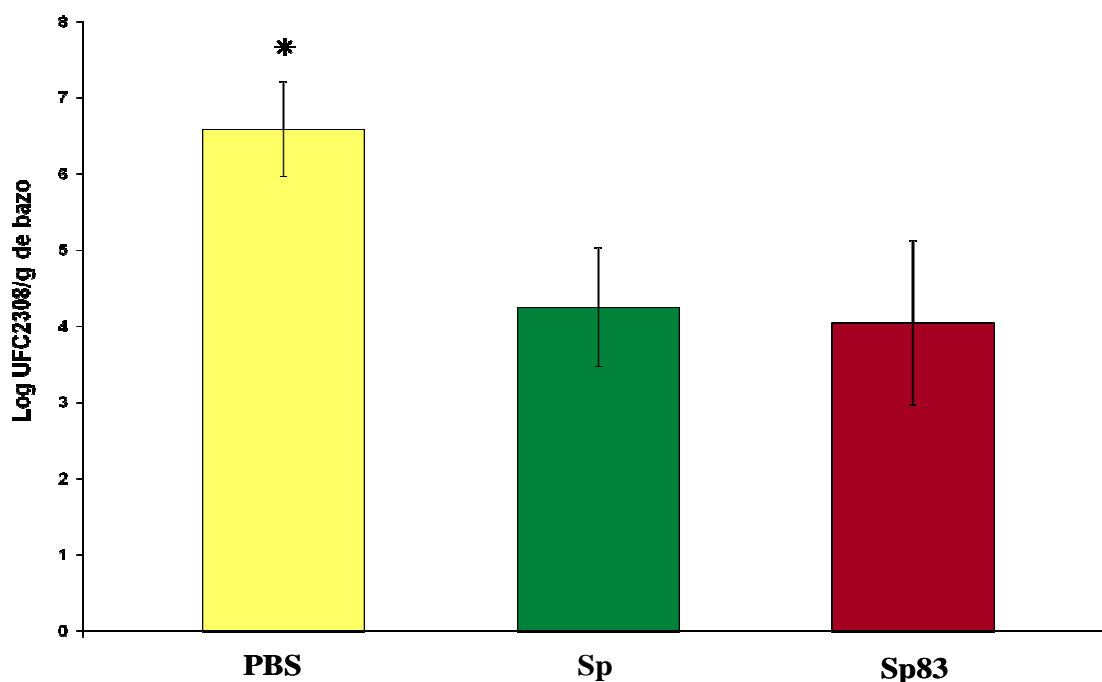
Dado que MPB83 es un antígeno que despierta fuerte reacción de anticuerpos, se buscó determinar si al inmunizar con las cepas de *B. abortus* que expresan MPB83 se genera una respuesta humoral específica contra la proteína heteróloga. Para ello, los sueros obtenidos mediante la inmunización de los ratones con las distintas cepas recombinantes de *B. abortus* S19 fueron enfrentados a rMPB83 expresada en *E. coli*. Contrariamente a lo esperado, no fue posible detectar anticuerpos específicos contra el antígeno en ninguno de los grupos de ratones inoculados con las cepas recombinantes. Se produjo reconocimiento específico en el grupo control inoculado con rMPB 83 únicamente (Figura III.6).



**Figura III.6: Respuesta humoral específica contra rMPB83 en los ratones inoculados con las distintas rS19.** Cada calle corresponde a la inmunodetección de rMPB83 con dilución 1/200 del grupo de sueros de ratones inmunizados con las diferentes cepas (o sin inmunizar, inoculados con PBS). Referencias: sueros de ratones inoculados con: 1. PBS; 2. Sp semana 3; 3. Sp83 semana 3; 4. Sp83 semana 4; 5. Spomp19-83 semana 4; 6. Sp26-83 semana 4; 7. rMPB83 semana 3; 8. rMPB83 semana 4. Se indica con una flecha la banda de MPB 83.

### 2.4 Capacidad protectora frente al desafío con la cepa patógena 2308 de *B. abortus*.

Con el objetivo de determinar si la capacidad protectora de *B. abortus* S19 se ve afectada por la expresión del antígeno heterólogo MPB83, se comparó el nivel de protección conferido por Sp83 con respecto al de S19. Tres grupos de 5 ratones fueron inoculados i.p. con 0,2 ml de PBS (grupo control) o con 0,2 ml de PBS conteniendo  $10^5$  UFC de Sp o Sp83. Todos los grupos fueron desafiados a las 10 semanas post inoculación con  $5 \times 10^4$  UFC de *B. abortus* S2308 por ratón. Los ratones fueron sacrificados, se les extrajo el bazo y se examinó la replicación de *Brucella* a las dos semanas posdesafío. Con el objetivo de descartar que las bacterias presentes en el bazo sean producto de reactivación de las cepas vacunales, el recuento de las bacterias obtenidas después del desafío se realizó por duplicado en placas suplementadas y no suplementadas con eritritol (Sangari y col., 1994).



**Figura III.7: Protección de ratones vacunados con Sp83 contra el desafío con la cepa patógena S2308.** Las barras corresponden al promedio de 5 ratones y su desvío estándar a las dos semanas posdesafío \*( $P < 0.01$ ) grupo significativamente distinto de los demás por prueba de ANOVA seguido de comparaciones múltiples.

Se obtuvieron recuentos del mismo orden en ambos casos, demostrando que las bacterias contadas son efectivamente S2308. Los ratones vacunados con la cepa recombinante Sp83 presentan menor número de S2308 esplénicas que los ratones control (PBS), y niveles similares a los del grupo inoculado con Sp (Figura III.7). No se observan diferencias significativas entre ambos grupos, Sp y Sp83. Estos resultados indicarían que la capacidad protectora de S19 no se ve afectada por la expresión de MPB83 y que las cepas de S19 recombinantes son capaces de despertar una respuesta anti-brucella equivalente a la generada por S19, al igual que lo que se describe para el antígeno heterólogo RAP1 (capítulo II de esta tesis, Sabio y García y col., 2010).

### Resumen de resultados:

- El antígeno MPB83 de *M. bovis* se expresó tanto como fusión a los primeros aminoácidos de  $\beta$ galactosidasa de *E. coli* ( $\beta$ gal-MPB83) como en fusión a los primeros aminoácidos de OMP19 y BP26 de *B. abortus* (OMP19-MPB83 y BP26-MPB83) en *B. abortus* S19.
- Las quimeras  $\beta$ gal-MPB83 y BP26-MPB83 se localizaron en la fracción correspondiente a la fracción soluble de S19, mientras que OMP19-MPB83 se localizó en la fracción que corresponde a membrana.
- Los resultados sugieren que OMP19-MPB83 se encuentra lipídada. Su ubicación en la fracción de membrana y la aparición de una banda correspondiente al precursor de la proteína al ser tratada con globomicina, apoyan esta conclusión.
- Los plásmidos utilizados p83 y pomp19-83 fueron estables *in vivo* sin la presión de selección; y las secuencias promotoras seleccionadas expresaron las distintas quimeras de MPB83 activamente durante la replicación de *Brucella* en el ratón.
- El plásmido integrativo p26-83 expresó la quimera BP26-BMP83 activamente durante la replicación de *Brucella* en el ratón.
- La expresión de MPB83 en los contextos empleados no alteró las características de infección de S19 en el modelo murino empleado.
- Los ratones inmunizados con Sp83, Sp26-83 o Spomp19-83 desarrollaron una respuesta inmune celular específica contra rMPB83.
- Los ratones inmunizados con Sp83, Sp26-83 o Spomp19-83 no desarrollaron una respuesta humoral específica contra rMPB83 detectable con la metodología utilizada.
- La capacidad protectora de S19 no se vio afectada por la expresión de  $\beta$ gal-MPB83 y las cepas de S19 recombinantes fueron capaces de despertar una respuesta antibacteriana equivalente a la generada por S19

En conjunto, estos resultados confirman la posibilidad de utilizar a S19 como vector de expresión de MPB83 de *M. bovis* con una inducción de respuesta inmune celular específica contra MPB83.

# Discusión

En Argentina, el sector agropecuario cumple un rol protagónico en la economía del país, conformando alrededor del 50 % del monto de las exportaciones. Dentro de este sector, el complejo ganadero consta de una población bovina aproximada de 48 millones de cabezas de ganado, de las cuales el 78 % se encuentra en la región pampeana (SENASA, 2010). Las enfermedades que afectan al ganado bovino son uno de los tantos factores que limitan el desarrollo de la producción y de la comercialización de productos de origen animal y de los mismos animales entre países. A su vez, estas enfermedades en muchos casos también son un problema para la salud humana. Por esto, mejorar la salud animal genera aumento de las divisas producto de este área y genera alimentos de mejor calidad para el consumo de la población.

La brucelosis, la tuberculosis y la babesiosis bovina son enfermedades que afectan al ganado de nuestro país. La brucelosis bovina tiene una prevalencia en el país de aproximadamente el 4,5% en el ganado bovino de carne (Samartino, 2007). Se estima que la prevalencia de la tuberculosis bovina sería en la actualidad del 0,9 % (Dubarry y col., 2005) y la de la babesiosis (junto con la anaplasmosis) sería del 19% (Späth y col., 1994). En los últimos años se ha observado un desplazamiento de las garrapatas hacia el sur aumentando el riesgo de infección de enfermedades transmitidas por este insecto en la región pampeana (babesiosis y anaplasmosis). Esta situación podría incrementarse por el calentamiento global, lo que podría empeorar la situación en el futuro. En la actualidad, existen vacunas contra la babesiosis que son utilizadas en las regiones endémicas del país que son relativamente eficientes y ofrecen razonables niveles de protección de largo plazo (Pérez de León, 2010). Sin embargo, estas vacunas, que contienen cepas atenuadas de *B. bovis* y *B. bigemina*, presentan varios inconvenientes: no son muy seguras, ya que son derivados de células sanguíneas bovinas lo que podría provocar la dispersión de otras enfermedades; existe el peligro de reversión a las formas patógenas (Timms y col., 1990); requieren cadena de frío para su conservación, y el período de vencimiento es muy corto (7 días desde su elaboración) (De Vos y Bock, 2002).

En cuanto a la tuberculosis bovina, hay una resistencia a la utilización de la BCG como vacuna por las dudas existentes sobre su eficacia (McNair y col., 2007) y porque podría interferir con la detección de animales infectados con *M. bovis*, comprometiendo así los programas de erradicación de tuberculosis en el ganado bovino. Con respecto a la

brucelosis, las dos cepas vacunales actualmente más utilizadas en el mundo son *B. abortus* S19 y *B. abortus* RB51. En nuestro país, se utiliza la cepa S19 y la vacunación es obligatoria. Se sabe que aplicada correctamente confiere un 70% de protección contra el aborto y un 55% contra la infección. Aunque en nuestro país la cepa RB51 fue autorizada provisoriamente (en 1998) en hembras mayores de 10 meses, su uso fue prohibido en 2003, dado que en la actualidad sólo se recomienda su uso en países que tienen baja prevalencia de la enfermedad (Samartino, 2007).

*B. abortus* es un importante inductor de la respuesta inmune humoral y celular siendo la respuesta celular la requerida para controlar la infección (Baldwin y Goenka, 2006), lo que la convierte en una importante candidata para el uso como *carrier* vivo de antígenos heterólogos. En este trabajo evaluamos el uso de *Brucella abortus* como vector de expresión de antígenos heterólogos de patógenos responsables de enfermedades de importancia en la ganadería de nuestro país como son la babesiosis y la tuberculosis bovina. En el desarrollo de bacterias como sistemas de expresión es importante conocer la fisiología de la bacteria y la respuesta del hospedador a dicha bacteria; la existencia de cepas atenuadas; el desarrollo de herramientas de expresión que no sólo modulen la producción de antígeno sino también el contexto y la topología con las que se expresan; etc. En este enfoque racional, se deben optimizar los parámetros de la vacunación según la respuesta requerida para el control de la infección, siendo de suma importancia el tipo de respuesta que se induce. Por ejemplo, para el control de la mayoría de los nematodos intestinales se precisa de una respuesta de tipo Th2 (Drabner y Guzmán, 2001), mientras que el control de muchos patógenos intracelulares como *B. abortus* y *Mycobacterium bovis* necesitan de la estimulación de una respuesta de tipo Th1. La vía de inoculación y las propiedades intrínsecas del antígeno también influyen en la respuesta que se generará.

Otro factor importante en la modulación de la respuesta tiene que ver con la topología y el nivel de expresión del antígeno expresado. Hay estudios que demuestran que la secreción de antígenos y su exposición en la superficie de la membrana son más eficientes en la promoción de una respuesta protectora comparado con las proteínas retenidas en el citoplasma en *Salmonella* (Hess y col., 1996). Asimismo, la acumulación de proteínas heterólogas podrían comprometer el *fitness* de la bacteria utilizada como vector de expresión (Drabner y Guzmán, 2001). La selección del promotor bajo el cual se expresa la proteína heteróloga también podría influir en la respuesta inmune contra el

antígeno recombinante (Medina y Guzman., 2000), pudiendo entonces optimizar la expresión del antígeno con una adecuada selección del promotor.

Se han expresado satisfactoriamente antígenos en *B. abortus* de *Trypanosoma cruzi* en el espacio periplásmico de la cepa vacunal *B. abortus* S19, obteniéndose una buena respuesta de anticuerpos en ratones (Comerci y col., 1998). También se ha demostrado la estimulación de respuesta celular con antígenos tales como  $\beta$ -galactosidasa, HSP65 y ESAT-6 de *M. bovis* (Vemulapalli y col., 2000c) y antígenos de *Neospora caninum* (Ramamoorthy y col., 2007 a y b) expresadas en *B. abortus* RB51. En nuestro laboratorio, se ha expresado el gen de la luciferasa bajo el control del promotor y en fase con el péptido señal de la proteína periplásmica BP26 en *B. abortus* S19 (Campos y col., 2002).

En base a estos antecedentes nos planteamos la **hipótesis** de que *B. abortus* S19 es un candidato atractivo para la utilización como vector de expresión de antígenos heterólogos con el fin de generar una respuesta inmune específica contra estos antígenos, sin verse afectadas las características de infección y protección de la cepa vacunal en el modelo murino.

Para probar esta hipótesis se seleccionaron antígenos inmunodominantes de otros patógenos que requieren para su control la intervención de una vía inmunológica equivalente a la que desencadena *Brucella* y que generan enfermedades de importancia para nuestro país. Se propuso trabajar con *M. bovis* como ejemplo de bacteria intracelular y *Babesia bovis* como protozoario. Además, se expresaron los antígenos elegidos en diversos contextos como en citoplasma, periplasma y asociado a membrana formando quimeras con una proteína lipidada. Se evaluó si las distintas localizaciones y la lipidación del antígeno podrían llegar a influir en la respuesta inmune generada y también en la estabilidad del antígeno.

En esta tesis se han expresado los antígenos MPB83 de *M. bovis* y RAP1 de *B. bovis* en *B. abortus* S19. La cepa S19 ha sido utilizada por más de 50 años en varios países de América Latina, y la respuesta inmune que genera se encuentra muy bien descrita tanto en ratones como en su hospedador natural, el bovino. El control y el diagnóstico de la brucelosis en los países donde la vacuna de elección es S19 se realiza por medio de ensayos serológicos clásicos que incluyen aglutinación y Rosa Bengala (Acha y Szyfres., 1986; Fiorentino y col., 2008). Esto está acompañado por un protocolo de vacunación apropiado que involucra la vacunación temprana de terneras. En este trabajo



se eligió trabajar con S19 dado que el LPS es un fuerte antígeno humoral y podría servir como un adyuvante natural.

Por otro lado, RB51 es una cepa rugosa utilizada en muchos países que permite la vacunación de animales adultos. Se ensayaron algunas construcciones en esta cepa para evaluar la viabilidad de desarrollar vacunas multivalentes para revacunación.

### **Construcción de vectores de expresión para *Brucella abortus***

El desarrollo de vectores para la transformación de *Brucella* derivados del pBBR1MCS-1, con resistencia a diferentes antibióticos (kanamicina, tetraciclina, ampicilina y gentamicina) (Kovach y col., 1994), permitió un gran avance en las estrategias de expresión de antígenos en esta bacteria. Todos estos plásmidos son estables *in vitro* e *in vivo* en *Brucella* spp. (Kovach y col., 1995). Cabe destacar que el pBBR1MCS-3 con resistencia a tetraciclina es útil para su utilización en una amplia variedad de Gram negativas, pero su uso se ve limitado en *Brucella* spp. debido a que este es uno de los antibióticos usados para el tratamiento con la brucelosis.

Como se detalló en el capítulo I, para llevar a cabo los clonados de los genes que expresan los diversos antígenos de interés veterinario seleccionados, se contaba con una variedad de plásmidos replicativos y no replicativos en *B. abortus* (Kovach y col., 1994 y 1995; Campos, 2003) y además en esta tesis se desarrolló un nuevo plásmido denominado pomp19, de manera de expresar las proteínas heterólogas bajo el control del promotor *omp19* y como fusión a los primeros aminoácidos de OMP19. La serie de vectores de expresión utilizados para esta tesis se eligieron con el fin de expresar los antígenos heterólogos seleccionados en diversos contextos de presentación antigénica, y así analizar cuál despertaría la mejor respuesta inmunológica. Para la expresión en el citoplasma bacteriano se utilizó el plásmido pBBR1MCS-2 (Kovach y col., 1995) de amplio rango de hospedador y replicativo en *B. abortus* para la expresión en fusión a  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* y bajo el control del promotor del gen que codifica para esta proteína.

Para la expresión en el periplasma, se eligió la secuencia señal del gen *bp26*. En trabajos anteriores de nuestro laboratorio se habían diseñado varios plásmidos no replicativos en *B. abortus* conteniendo el gen *bp26* de *B. abortus* delecionado en 555 pb en su región codificante. Todos los plásmidos construidos mantienen la región

codificante para su péptido señal e incluyen su región promotora. En este caso, la decisión de utilizar un plásmido no replicativo estuvo dada en base a experiencias previas de nuestro laboratorio con BP26, las cuales mostraron una posible toxicidad de esta proteína en caso de ser sobreexpresada en plásmidos de alto número de copias (Campos y col., 2002; Boschioli y col., 1997).

Para la expresión asociada a membrana, en este trabajo se desarrolló un nuevo plásmido replicativo denominado *pomp19*, derivado de *pBBR1MCS-2*. Este plásmido fue diseñado con el fin de expresar los antígenos heterólogos en fusión a los primeros aminoácidos de la lipoproteína OMP19 de *B. abortus*. OMP19 es una lipoproteína de membrana externa, que también ha sido descrita en *B. abortus* 544 (Tibor y col., 1996) y como Ba18 en *B. abortus* 2308 (Kovach y col., 1997). De esta manera, no sólo se presenta al antígeno en un contexto en el que se encuentra más accesible al sistema inmune comparándolo a las proteínas localizadas en citoplasma (Dieye y col., 2003), sino que además, al encontrarse potencialmente lipidada la quimera podría llegar a tener sus propiedades inmunogénicas aumentadas (Akins y col., 1993).

En este plásmido se pudieron clonar los genes *mpb83* y *rap1* y se expresaron las quimeras OMP19-MPB83 y OMP19-RAP en *B. abortus*. Los resultados de este trabajo demuestran que es posible expresar proteínas lipidadas a partir de este vector, como es el caso de OMP19-MPB83. En el caso de OMP19-RAP, no hay resultados suficientes que avalen que se encuentra asociada a un residuo lipídico.

Actualmente, además de los vectores descritos en esta tesis (especialmente *pomp19*, que permite expresar los antígenos heterólogos en membrana y a su vez tiene la potencialidad de expresar quimeras lipidadas) (Sabio y García y col., 2008 y 2010) existe una gran variedad de vectores replicativos que podrían usarse para la expresión de antígenos heterólogos. Entre ellos, *pBBSODpro* y *pBBgroE* (Vemulapalli y col., 2000c), que contienen las secuencias promotoras de *sodC* y *groE* de *B. abortus*, respectivamente y *pNSGroE* (Seleem y col., 2004) que además de contener el promotor con parte de la secuencia codificante de *groE* y disponer únicamente de los genes esenciales para la replicación en *B. abortus* (lo cual hace que sea sustancialmente más pequeño) cuenta con un *tag* de histidina para la detección de la proteína heteróloga. A este último vector posteriormente se le agregó un *stem-loop* de RNA que mejora la iniciación de la traducción, generando *pNSGroE2His* (Seleem y col., 2007), aumentando los niveles de expresión y permitiendo la expresión de otros genes que previamente no podían

expresarse. El mecanismo sería a través de la supresión de una interacción prolongada entre el dominio de inicio de la traducción y las secuencias de ARNm gen específicas, lo que permite la formación de estructuras de iniciación de la traducción accesibles (Paulus y col., 2004).

Todos estos plásmidos contienen promotores nativos de *Brucella* spp., a excepción de pBBR1MCS que contiene un promotor de *E. coli*. En un estudio reciente, se comparó la actividad de algunos promotores nativos y sintéticos en *Brucella*. Se clonaron los promotores de los genes *clpB*, *dnaK*, *htrA*, *lon* y *virB* de *B. suis* usando como base los plásmidos pNSGroE (Seleem y col., 2008). Al mismo tiempo se estudió la actividad de otros promotores de genes de resistencia a antibióticos, de bacteriófagos y sintéticos (*kan*, *Ch*, *Amp*, *T5*, *trc*) clonados previamente en pNS (Seleem y col., 2006 y 2007). Los promotores sintéticos *trc* que tienen una región rica en A hacia el 5' resultaron tener mayor actividad *in vitro* e *in vivo* en *B. suis*. Sería interesante poder comparar los vectores desarrollados en esta tesis con los vectores derivados de pNSGroE en la expresión de los antígenos seleccionados en este trabajo. A su vez podría considerarse que el vector *pomp19* podría mejorarse agregándole el *stem-loop* de ARN. Esto podría servir para aumentar los niveles de expresión de los antígenos, especialmente en RB51; aunque hay que tener en cuenta que tal vez niveles mayores de expresión podrían ser tóxicos, sobre todo al expresar los antígenos en membrana o en periplasma.

### **Expresión de Rap1 de *Babesia bovis* en *Brucella abortus* S19**

El medio más conveniente y práctico para controlar la babesiosis bovina es la vacunación. El uso potencial de bacterias recombinantes vivas como una plataforma para el desarrollo de las vacunas es altamente atractivo. Esta estrategia ha sido eficaz en inducir una respuesta inmune robusta contra antígenos de distintos parásitos en distintos vectores de expresión heteróloga (para una revisión ver Detmer y Glenting, 2006). Por ejemplo, se expresó un epítipo de la proteína LACK de *Leishmania major* en una cepa atenuada de *Listeria monocytogenes* (Soussi y col., 2002) y el antígeno MSA2 de *Plasmodium falciparum* en BCG (Zheng y col., 2002). En el caso particular de *B. abortus*, se expresaron varios antígenos protectivos de *N. caninum* en la cepa vacunal RB51 (Ramamoorthy y col., 2007 a y b) y en S19 se expresó un antígeno de *T. cruzi* (Comerci y col., 1998) detectándose, en este último caso, una fuerte respuesta de

anticuerpos.

En este trabajo, el gen *rap1* fue amplificado con su secuencia completa y clonado en pBBR1MCS-2 como fusión a los primeros aminoácidos de  $\beta$ -galactosidasa. Para la fusión a BP26 y OMP19 se amplificó el gen sin la secuencia correspondiente al péptido señal. Este producto de amplificación fue clonado en el plásmido replicativo pom19. No se pudo lograr el clonado del gen bajo el promotor de *bp26*, encontrándose en todos los casos el gen en la orientación inversa. Se intentó clonar el gen *rap1* bajo el promotor *lacZ*, con la secuencia Shine Delgarno (SD) del gen *bp26* y la secuencia codificante al péptido señal de BP26, pero todos los clones resultantes tenían *rap1* en la orientación inversa. Esto nos hace suponer que, o bien la fusión BP26-RAP1 es tóxica para *E. coli* o la secuencia SD incluida es la responsable de la toxicidad. Se transformaron bacterias de la cepa S19 de *B. abortus* con los otros dos vectores diseñados y se observó expresión de RAP1 demostrándose que la expresión de este antígeno heterólogo no es tóxica en la cepa S19 de *B. abortus* en estos contextos. Con respecto a la localización subcelular, es interesante destacar que, contrario a lo que se esperaba, RAP1 se localiza asociada a la fracción de membrana, independientemente del vector utilizado. Al ser expresada como fusión a OMP19, la localización de la proteína heteróloga fue en la membrana de S19, como era esperado, dada la secuencia señal de la proteína OMP 19 (Tibor y col., 1999). Sin embargo, al ser expresada como fusión a  $\beta$ -galactosidasa se esperaba que la quimera se encontrara en la fracción del citosol. Recientemente, se han reportado resultados similares en BCG (Santangelo y col., 2007). Teniendo en cuenta que RAP1 está asociada con la membrana del parásito (Goff y col., 2010) y que posee regiones hidrofóbicas en su secuencia es posible que la molécula recombinante de RAP1 tenga una afinidad intrínseca por la membrana celular. Estos resultados podrían ser una evidencia de que la proteína se estaría plegando en su forma nativa en este contexto. Así, los vectores pBBRMCS-2 y pom19 permitirían una expresión de RAP1 con un posible plegamiento correcto en su forma nativa. Este aspecto se vuelve más relevante, dado que recientemente se ha demostrado que la inmunización con la proteína recombinante RAP1 usando adyuvantes que inducen una respuesta inmune fuerte tipo Th1 y con producción de anticuerpos IgG no son suficientes para proveer protección en el ganado bovino contra un desafío con la cepa virulenta de *B. bovis* (Norimine y col., 2003). Los autores sugieren que a pesar de que se indujo una respuesta con producción de anticuerpos IgG ante el desafío, las diferencias estructurales entre la proteína

recombinante y la nativa podrían generar una respuesta inmune contra la proteína recombinante incapaz de neutralizar la infectividad del parásito. Aún deben realizarse estudios para determinar si RAP1 se expresa en una conformación adecuada en S19.

Un prerequisite para cualquier vacuna recombinante viva es su estabilidad en el hospedador vacunado. A pesar de que no hubieron diferencias significativas entre las UFCs de las cepas recombinantes de S19 (rS19) recuperadas de los bazos de los ratones en medio sólido con el antibiótico selectivo adicionado o no, se encontró que el plásmido que codificaba para RAP1 fusionada al N-terminal de  $\beta$ -galactosidasa se perdía de S19 más rápidamente que el plásmido vacío o el plásmido con el gen *rap1* fusionado a la secuencia señal de *omp19*. Este resultado sugeriría que la fusión a OMP19 de alguna manera conlleva a una mayor estabilidad del plásmido. Es importante destacar que las colonias recuperadas del ambiente intracelular mantuvieron su capacidad de expresar el antígeno en todos los casos. Como perspectivas futuras, se podrían diseñar plásmidos integrativos que expresen RAP1 como fusión a OMP19 para evitar una potencial pérdida del vector recombinante.

El desarrollo de vacunas alternativas para el control de la infección de ganado bovino con *B. bovis* se ha visto limitado por la ausencia de un modelo experimental adecuado que reproduzca la infección producida por *Babesia* en el ganado. A pesar de este inconveniente, decidimos estudiar en ratones BALB/c las cepas recombinantes diseñadas como un primer paso de análisis de potencial vacuna. Con el fin de evaluar la capacidad de S19 y RB51 para expresar el antígeno heterólogo y la potencialidad de generar una respuesta inmune específica contra este antígeno, se inmunizaron ratones BALB/c con las distintas cepas rS19 y rRB51. Por el análisis por Western blot de los sueros de los ratones inoculados con SpRAP o Spomp19-RAP, se demostró que ambas cepas recombinantes fueron capaces de generar una respuesta de anticuerpos específica contra rRAP. Además de inducir anticuerpos anti-RAP1, ambas construcciones fueron capaces de estimular la secreción de IFN- $\gamma$  por parte de los esplenocitos de los ratones inmunizados con las rS19s al ser estimulados con 5  $\mu$ g de la proteína recombinante. Con concentraciones menores del antígeno (1 $\mu$ g), sólo los esplenocitos de los ratones inoculados con S19pomp19-RAP1 (Spomp19-RAP) fueron capaces de estimular la secreción de IFN- $\gamma$  (P<0,01). Esto podría deberse a una mayor estabilidad del antígeno RAP1 cuando es expresado en fusión OMP19, a la falta del péptido señal de RAP1 o a la posible asociación de RAP a un residuo lipídico dado que OMP19 es una lipoproteína

(Tibor y col., 1999), aunque no pudo verificarse la lipidación de la quimera OMP19-RAP. Los resultados preliminares con los esplenocitos de ratones inoculados con RpRAP sugieren que se produce liberación de IFN- $\gamma$  al enfrentarse a rRAP pero los niveles de producción no fueron significativos.

Con respecto a la respuesta de anticuerpos, los sueros de ratones inoculados con RB51pRAP (RpRAP) no reconocieron el antígeno rRAP ni los extractos de *B. bovis* por Western blot, lo que sugeriría que no genera una respuesta de anticuerpos detectable, o al menos, no se puede detectar por esta metodología.

La presencia de anticuerpos específicos contra RAP1 del isotipo IgG2a, y menores niveles de IgG1, en el suero de los ratones inoculados con las recombinantes sugieren el desarrollo de una respuesta inmune tipo Th1. Estos datos sugieren que luego de la inmunización con ambas cepas, SpRAP y Spomp19-RAP colonizarían al hospedador murino y serían capaces de expresar RAP1 *in vivo*, induciendo una respuesta inmune dirigida hacia un perfil de tipo Th1.

S19 promueve una buena respuesta celular y humoral debida a los LPS en la superficie. La respuesta de anticuerpos contra los LPS hace que no sea adecuada para una re-vacunación de adultos bovinos, ya que el título de los anticuerpos inducidos interfiere con la prueba serológica usada para la detección de ganado infectado. En el caso de la babesiosis, tal vez sea necesaria la vacunación o re-vacunación del ganado adulto. En este caso, sería más apropiado el uso de RB51 como sistema de expresión heteróloga. Sin embargo, los resultados de este trabajo sugieren que con el uso de esta cepa para la expresión de RAP no se obtienen resultados adecuados de respuesta inmune celular y humoral específica contra RAP.

En otros trabajos se ha reportado la expresión de antígenos protozoarios como es el caso de un antígeno de *T. cruzi* (Comerci y col., 1998) y los antígenos MIC1, MIC3, GRA2, GRA6 y SRS2 de *N. caninum* (Ramamoorthy y col., 2007 a y b). El primero expresado en S19 y todo el resto en RB51. En el caso del trabajo en S19 se analizó la respuesta humoral y se observó que la recombinante generaba una fuerte respuesta de anticuerpos específica contra el antígeno de *T. cruzi*. Los antígenos de *N. caninum* generaron tanto una respuesta de anticuerpos como celular. Contrariamente, en nuestros estudios, la respuesta a RAP expresada en RB51 fue baja. Los ratones inmunizados con la cepa Spomp19-RAP mostraron una mayor respuesta celular contra RAP, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas respecto de SpRAP. A su vez, los

resultados de protección contra la cepa virulenta *B. abortus* 2308, muestran que la expresión de RAP1 en fusión a OMP19 no afecta la capacidad protectora de S19. Queda por analizar si esa tendencia a una mayor respuesta celular al usar pomp19-RAP en S19, es extrapolable al bovino, que es el hospedador natural.

### **Expresión de MPB83 de *Mycobacterium bovis* en *Brucella abortus* S19**

BCG es la vacuna más ampliamente utilizada, aunque en la actualidad no se usa para la tuberculosis bovina (TBb). Esto se debe en parte a que la vacunación con BCG no induce protección contra la infección natural en la mayor parte de los experimentos a campo (revisión en Hope y Villarreal-Ramos, 2008). A su vez, uno de los principales obstáculos para la introducción de BCG como vacuna para el control de la TBb en el ganado bovino es que sensibiliza a los animales y dan positivo a la prueba de tuberculina, no pudiéndose entonces distinguir entre éstos y los verdaderamente infectados. Por lo tanto, el potencial uso de bacterias recombinantes vivas que expresen antígenos de micobacteria como una plataforma del desarrollo de vacunas es altamente atractivo.

MPB83 es una lipoproteína glicosilada procesada por la peptidasa señal II y se localiza en la superficie de las micobacterias (Hewinson y col., 1996). En este trabajo se clonó el gen *mpb83* en tres plásmidos diferentes con el objetivo de generar cepas de *Brucella* recombinantes que expresen las proteínas quiméricas en localizaciones subcelulares diversas. El antígeno MPB83 fue expresado exitosamente como una fusión a  $\beta$ -galactosidasa, localizándose en la fracción citoplasmática, y como una fusión a los primeros aminoácidos de la lipoproteína de *B. abortus* OMP19, asociándose a la fracción de membrana. Con respecto a la proteína quimérica BP26-MPB83, esta fue detectada en la fracción soluble. Estos resultados sugieren que los primeros 28 aminoácidos de la región aminoterminal de BP26 son clivados como se esperaba, y el polipéptido resultante no estaría asociado a la membrana. Sin embargo, no fue posible la purificación de la fracción periplásmica de *Brucella*, no pudiéndose confirmar la localización de esta quimera.

Es sabido que las lipoproteínas son antígenos clave en la inmunidad para muchas enfermedades bacterianas (Gerlach, y col., 1993; Keenan y col., 2000). También se ha encontrado que antígenos no lipoproteicos del parásito *Leishmania major* en fusión a



lipoproteínas bacterianas pueden aumentar la inmunidad (Cote-Sierra y col., 2002). Las lipoproteínas son sintetizadas con un péptido señal hidrofóbico en la región N-terminal, el cual es clivado del polipéptido maduro por la LSP (*lipoprotein signal peptidase*: peptidasa señal de lipoproteínas) antes de producirse el enlace covalente de un ácido graso (Cote-Sierra y col., 2002). La presencia del medio lipídico permitiría que la proteína tome la correcta topología de membrana (Hayashi y Wu, 1990) y le conferiría propiedades inmunoestimuladoras (Radolf y col., 1995; Akins y col., 1993). El análisis molecular de patógenos bacterianos filogenéticamente diversos ha demostrado divergencia del sitio de reconocimiento de LSP. La secuencia de reconocimiento micobacterial parecería haber sufrido un distanciamiento genético (Lysnyansky y col., 1999). La expresión heteróloga de lipoproteínas en *E. coli* con secuencias de reconocimiento de LSP divergentes a menudo dan como resultado la expresión de proteínas recombinantes con modificaciones lipídicas incompletas o completamente inexistentes (Hansson y col., 1995; Madurawe y col., 2000; Shang y col., 1996). Específicamente, MPB83 no se encuentra lipidada cuando es expresada en *E. coli* (Cullen y col., 2003), lo cual correlaciona con nuestros resultados en *B. abortus*, donde también la lipidación de este antígeno micobacteriano está ausente. Este inconveniente puede ser superado incluyendo una secuencia de reconocimiento de LSP que sea procesado eficientemente por las bacterias Gram negativas al expresar antígenos micobacterianos (Cullen y col., 2003; Legrain y col., 1995). Se expresó MPB83 como una fusión a la lipoproteína OMP19, de tal manera de conferir una señal válida de lipidación que sería reconocida por *Brucella*. Esto tendría dos potenciales efectos, permitiría que las lipoproteínas heterólogas (en este caso MPB83) tomen su correcta topología de membrana y podría otorgarle propiedades inmunoestimuladoras mayores (Akins y col., 1993), y en el caso de los antígenos que no sean naturalmente lipoproteicos, con la lipidación podría llegar a verse aumentada su capacidad antigénica (Cote-Sierra y col., 2002). Cuando la cepa Spomp19-83 fue tratada con globomicina, un inhibidor específico de la peptidasa de reconocimiento de la señal lipoproteica que induce la acumulación del precursor lipoproteico (Sabio y García y col., 2010; Harrington y col., 2000), se detectó por Western blot una banda correspondiente al precursor no procesado, lo que sugiere que esta proteína quimérica sería lipidada (Sabio y García y col., 2010 y capítulo III de este trabajo de tesis). Estos resultados sugieren



que el plásmido *pomp19* al menos en algunos casos permitiría la correcta lipidación de las quimeras que expresa.

Se evaluó la estabilidad de los plásmidos y la capacidad de generar inmunidad de las cepas recombinantes de *B. abortus* (rS19) en ratones BALB/c. No se observaron diferencias entre el número de UFCs de las rS19 recuperadas de los bazos de los ratones en medio sólido en presencia o ausencia de los antibióticos de selección. Esto indica que las bacterias no perdieron los plásmidos que portaban. Además, las colonias de rS19 recuperadas del ambiente intracelular mantuvieron su capacidad de expresar MPB83 en todos los casos. En este trabajo también se describe que cuando RAP1 de *B. bovis* fue expresada como una fusión de OMP19, el plásmido recombinante mostraría una tendencia a ser más estable que las otras construcciones en estudio (Sabio y García y col., 2008 y este trabajo). Datos similares se obtuvieron con MSP1 expresada en fusión a OMP19 en S19 (datos no publicados). En el caso de MPB83, por otro lado, estas diferencias no se observan y todas las construcciones muestran niveles similares de estabilidad. Entonces, la estabilidad de los plásmidos que codifican para los antígenos recombinantes podría estar altamente influenciada por la naturaleza del antígeno que está siendo expresado.

Con el fin de evaluar la inmunogenicidad de la proteína heteróloga expresada en *Brucella*, se inmunizaron grupos de ratones BALB/c con Sp83, Sp26-83 o Spomp19-83. Se evaluó la capacidad de secretar IFN- $\gamma$  por parte de los esplenocitos obtenidos de los ratones de los distintos grupos en respuesta a la estimulación con rMPB83. Cuando fueron estimulados con 5  $\mu$ g de rMPB83, los esplenocitos de los ratones de los grupos inmunizados con las cepas recombinantes, que expresan las tres diferentes proteínas de fusión, mostraron mayores niveles de secreción de IFN- $\gamma$  con respecto al grupo control. Sin embargo, hubo una estimulación menor estadísticamente significativa con los esplenocitos del grupo inmunizado con Sp26-83. Esto podría explicarse debido al hecho de que la construcción se llevó a cabo en un plásmido integrativo, dando como resultado una única copia en el cromosoma bacteriano. En coincidencia con estos resultados, con menores concentraciones del antígeno estimulante rMPB83, sólo los esplenocitos de los ratones inmunizados con Sp83 y Spomp19-83 fueron capaces de estimular la secreción de IFN- $\gamma$ . Es sabido que una de las principales desventajas de los vectores integrativos es la reducción de los niveles de expresión heteróloga (Mederle y col., 2002), lo que contrabalancea su mayor estabilidad. Para la expresión de MPB83 en los vectores

estudiados, dado que los vectores replicativos resultaron estables, no se obtuvo esta ventaja al usar el vector integrativo, mientras que, como se menciona arriba, sí se observó una importante disminución de la capacidad inmunogénica, sugiriendo que el uso de vectores replicativos sería más apropiado en futuros estudios con este antígeno.

Aunque se sabe que el antígeno MPB83 induce una respuesta humoral y celular en infecciones experimentales en varios modelos animales y en infecciones naturales en humanos (Harboe y col., 1995; Wiker y col., 1996), no fue posible detectar respuesta de anticuerpos con la metodología utilizada en este trabajo al ser expresado en *B. abortus* en ninguna de sus formas (OMP19-83, BPP26-83 y  $\beta$ gal-83). La pérdida de esta función inmunológica podría deberse a que MPB83 no esté siendo expuesta en membrana cuando es expresada en *Brucella* tal como sucede en las micobacterias. Cuando la proteína es expresada a partir de los plásmidos p26-83 y p83, donde se espera que se localice en citoplasma y periplasma, la falta de inducción de respuesta humoral es esperable. Sin embargo, al encontrarse fusionado a OMP19, a pesar de su localización en membrana, MPB83 podría no encontrarse accesible en la superficie de membrana de *Brucella* lo que impediría que se desarrolle la respuesta de anticuerpos esperada. Otra alternativa sería que los aminoácidos de OMP19 presentes en la zona aminoterminal interfieran con el reconocimiento de epítopes inmunogénicos de MPB83. La posibilidad de que la ausencia de glicosilación (MPB83 se encuentra glicosilada en las micobacterias) en las quimeras disminuya la respuesta humoral la descartamos debido a que se observó que MPB83 no glicosilada en *M. bovis* también genera una respuesta humoral (Chambers y col., 2010).

Cuando los patrones moleculares de patógenos se unen a los receptores tipo Toll (TLRs) de mamíferos estimulan una respuesta inmune innata de forma tal que se pueda generar una respuesta inmune adaptativa. El LPS de *B. abortus* y las lipoproteínas micobacterianas, tanto como las de *Brucella abortus* (Zwerdling y col., 2008), son ejemplos muy bien estudiados de activación inmune celular a través de la interacción con TLR4 y TLR2, respectivamente (Campos y col., 2004; 2006; Arko-Mensah y col., 2007). En particular, se ha demostrado el rol de MPB83 en la estimulación de la producción de IL-12 y TNF- $\alpha$  por medio de la unión a TLR2 en células dendríticas de bovinos (Hope y col., 2003). En este sentido, la expresión de MPB83 como una lipoproteína en una bacteria Gram negativa, tal como *B. abortus*, es prometedora para el diseño de nuevas vacunas. Sin embargo, no se observaron diferencias en la producción

específica de INF- $\gamma$  en los ratones inmunizados con las brucellas que expresan MPB83 como lipoproteína de aquellos que fueron inmunizados con la cepa que expresa la proteína sin lipidar, lo que sugiere que la asociación al medio lipídico no daría como resultado una ventaja significativa en términos de inmunogenicidad para este antígeno, al menos en las condiciones estudiadas en este trabajo. A pesar de que MPB83 es un antígeno candidato válido como modelo, la vacunación del ganado con *Brucella* que exprese MPB83 podría comprometer la especificidad del ensayo de tuberculina, ya que la PPD contiene a este antígeno. Entonces, el uso de una vacuna candidata que exprese MPB83 para el control de la tuberculosis bovina en el ganado debería de estar acompañado de un diagnóstico basado en un PPD desprovisto de MPB83 o cualquier otro antígeno presente en la formulación de la vacuna.

Los resultados de protección contra la cepa virulenta *B. abortus* 2308, muestran que la expresión de MPB83 en fusión a  $\beta$ galactosidasa no afecta la capacidad protectora de S19.

### Otros antígenos

Paralelamente a los antígenos presentados en este trabajo, se estudiaron otros antígenos de interés veterinario, los cuales no se incluyeron en esta tesis debido a que los resultados son preliminares o a que se encontraron dificultades técnicas importantes en la detección de la expresión de las quimeras. Sin embargo, es interesante mencionar algunos de los resultados.

Uno de los antígenos seleccionados fue MSP1 de *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) agente causal de la anaplasmosis, otra de las enfermedades transmitidas por garrapatas que entra en el grupo de las enfermedades de Tristeza bovina. Las MSPs de *A. marginale* están involucradas en la interacción del parásito tanto con los huéspedes vertebrados como invertebrados (de la Fuente y col., 2004 y 2008). El ganado inmunizado con *A. marginale* derivado de eritrocitos desarrolla principalmente anticuerpos contra MSP1a (Kocan y col., 2001; de la Fuente y col., 2002). La inmunización del ganado con el complejo MSP1 induce inmunidad protectora parcial (García García y col., 2004).

En el caso de este antígeno, al igual que lo que sucedió con RAP1 de *B. bovis*, tampoco fue posible obtener la proteína quimérica BP26-MSP1. Tanto MSP1 como

RAP1 tienen un tamaño considerablemente mayor a MPB83, lo cual podría estar influyendo en la toxicidad al acumularse estas proteínas en el periplasma bacteriano. Este inconveniente podría resolverse clonando epítopes inmunogénicos tanto de RAP1 como de MSP1. Por ejemplo la región N-terminal de RAP1 es altamente conservada entre especies del género *Babesia* (Dalrymple, 1993; Dalrymple y col., 1993; Suárez y col., 1994), lo que sugiere que es funcionalmente importante y probablemente sea útil como blanco inmunogénico (Suárez y col., 1994).

Por otro lado, las quimeras  $\beta$ gal-MSP1st y OMP19-MSP1st se expresaron y se localizaron en las fracciones subcelulares esperadas, citoplasma y membrana, respectivamente. Además, MSP1 expresada como fusión a OMP19 fue más estable que expresada en fusión a  $\beta$ gal, lo que indicaría que el contexto provisto por OMP19 es ventajoso para la expresión de las proteínas heterólogas, no sólo en términos de inmunogenicidad sino también de estabilidad. Queda por demostrar si este contexto es o no favorable debido a la lipidación en la proteína heteróloga ya que al igual que para RAP-1 no fue posible demostrar la naturaleza lipoproteica de MSP-1 fusionada a OMP19 por la técnica de inhibición por globomicina.

Otros antígenos estudiados fueron ESAT6 y CFP10 de *M. bovis*. Los antígenos ESAT-6 (*Early Secreted Antigenic Target* 6-kDa: blanco antigénico secretado tempranamente) (Sorensen y col., 1995) y CFP-10 (*Culture Filtrate Protein* 10-kDa: proteína de filtrado de cultivo) (Berthet y col., 1998) se encuentran codificados por los genes *esxA* y *esxB*, respectivamente, presentes en la región RD1 (*Region of Difference*: Región de diferenciación 1) de *M. bovis*. Esta región se encuentra ausente en todas las cepas vacunales de BCG (Mahairas y col., 1996) y está presente en todos los aislamientos virulentos (Brosch y col., 2002). La elección de estos antígenos se basó en la probada capacidad protectora de ESAT6 (Kamath y col., 1999; Li y col., 1999, Maue y col., 2004 y 2007) y su ausencia en la vacuna BCG. A pesar de que se ha descrito en trabajos anteriores que ESAT6 resultó inmunogénica en ratones BALB/c al expresarse en RB51 utilizando el vector pBBSODpro (Vemulapalli y col., 2000c) (un derivado del vector pBBR1MCS que contiene el promotor y la secuencia que codifica para el péptido señal de SOD de *B. bovis*), en nuestros estudios no fue posible detectarse expresión de esta proteína en S19. Lo mismo ocurrió con CFP10. Sin embargo, sí se detectaron transcritos de *esta6* en S19 por medio de la técnica de RT-PCR a partir de la construcción pESAT6 lo que indicaría que la expresión no está afectada a nivel

transcripcional. Es probable que el uso de nuevos plásmidos tales como pNSGroE (Seleem y col., 2004) mejore la expresión de estos antígenos en S19.

La eficacia en la inducción de una respuesta inmune adecuada, además de las ventajas que presenta *Brucella*, tales como alta estabilidad, bajo costo de producción, y las herramientas para la expresión de los antígenos en distintos contextos y con distintas topologías del antígeno, hacen de esta bacteria un candidato interesante para el uso como vector de expresión heteróloga. Tiene la desventaja ya mencionada de la imposibilidad de vacunación de ganado adulto y de la re-vacunación por la interferencia en las pruebas diagnósticas de la infección. Este problema podría resolverse con el desarrollo de RB51 recombinantes para aquellos antígenos de enfermedades que requieren vacunación o re-vacunación de ganado adulto, aunque deberán desarrollarse estrategias para mejorar la inmunogenicidad de los antígenos heterólogos en esta cepa.

En el caso de RAP1, se observó la inducción tanto de una respuesta de anticuerpos como celular específica; en cambio, para MPB83 sólo fue posible detectar una respuesta celular. Estos resultados, junto con los datos de la localización subcelular de las distintas quimeras, indicaría que RAP1 se encuentra en membrana y accesible en la superficie de la *Brucella*, posiblemente por características intrínsecas de su topología, lo que permitiría el acceso a anticuerpos con la consiguiente generación de una respuesta de anticuerpos. En cambio, MPB83 aún cuando se asocia a membrana posiblemente no se encuentra expuesta y por esta razón no se generara la respuesta de anticuerpos. Los resultados no son conclusivos con respecto a cuál sería la mejor presentación de los antígenos. Aunque se esperaba que el plásmido *pomp19* fuera más eficiente en la generación de una respuesta inmunogénica, al expresar quimeras que presentan el antígeno en un contexto de membrana y además de forma lipídada, los resultados fueron variables. Por un lado, los resultados de la expresión de las quimeras de MPB83 indican que se encuentra lipídada al encontrarse fusionada a OMP19, pero esta forma de presentación no muestra diferencias en la generación de una respuesta inmunogénica (celular o humoral) con respecto a la quimera  $\beta$ gal-MPB83 (citoplasmática). Por otro lado, con la estrategia experimental aquí empleada no fue posible demostrar que OMP19-RAP se encuentre lipídada, pero a diferencia de lo que ocurrió con MPB83, la respuesta inmune contra RAP1 en el contexto de OPM19 fue potenciada, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Este incremento en la respuesta no

parece deberse a la localización celular de la quimera, ya que tanto OMP19-RAP como  $\beta$ gal-RAP se expresan en la membrana de S19. Por lo tanto, la lipidación de RAP-1 no detectada aquí por las metodologías empleadas o algún otro factor por ahora desconocido sería responsable de este leve aumento en la respuesta cuando el antígeno es expresado en el contexto de OPM19.

Otro punto interesante a destacar es que ninguna de las recombinantes estudiadas en los análisis de protección perdió su capacidad protectora contra la cepa virulenta *B. abortus* 2308. Estos resultados indicarían que la capacidad protectora de S19 no se ve afectada por la expresión de OMP19-RAP1 y  $\beta$ gal-MPB83. Las otras cepas recombinantes no fueron analizadas en su capacidad protectora. Los resultados presentados sugieren que *B. abortus* S19 sería un vector de expresión adecuado para expresar antígenos de *B. bovis* y *M. bovis* y podría ser una base para la generación de futuras vacunas heterólogas para la brucelosis, tuberculosis y babesiosis bovina.

Las futuras vacunas contra la tuberculosis probablemente se basen en estrategias de inducción y refuerzo (*prime-boost strategies*) (Hanekom y col., 2010). La inducción tendería a ser con una cepa de BCG modificada, más inmunogénica y más segura u otra cepa atenuada de *Mycobacterium* (Martin y col., 2006; Dao y col., 2008), seguido de un refuerzo (*boost*) que amplifique los componentes críticos de la respuesta inmune generados por las vacunas de inducción. Estas vacunas de refuerzo son en general basadas en vectores virales no infectivos (o no replicativos) que expresan proteínas importantes en la protección de la tuberculosis. Otra estrategia alternativa es emplear como vector vacunal de refuerzo una vacuna viva atenuada contra otra enfermedad. Como debe cumplirse para cualquier vacuna bivalente, el perfil de respuesta inmune que se induce deber ser común a ambas enfermedades y la presencia de antígenos (inmunógenos contra) de un patógeno no debe disminuir la capacidad de inducir inmunidad protectora hacia el otro patógeno. En este trabajo de tesis hemos demostrado que ambas condiciones se cumplen para las cepas aquí desarrolladas y por lo tanto las proponemos como potenciales refuerzos para el control de la tuberculosis animal. Debido a que la cepa RB51 es la más adecuada para vacunar ganado adulto contra la brucelosis, sería necesario adaptar los sistemas desarrollados a esta cepa vacunal. Habría que tener en consideración como perspectiva futura incluir en esta estrategia vacunal al antígeno Ag85 que es, junto con ESAT6, uno de los principales candidatos como posible antígeno protectoro (Delogu y Fadda, 2009).

En resumen, este trabajo demuestra que es posible inducir simultáneamente una respuesta inmune contra *B. abortus* y contra antígenos específicos de patógenos heterólogos basándose en la expresión de estos antígenos en la cepa vacunal S19 de *B. abortus*. Hasta el momento, la mayoría de los estudios de expresión heteróloga en *Brucella* con fines vacunales fueron realizados en la cepa RB51 y un único estudio fue realizado en S19. Así, los resultados de este trabajo de tesis contribuyen a la obtención de una vacuna polivalente, basándose en la vacuna para la brucelosis y haciendo hincapié en dos enfermedades (tuberculosis y babesiosis) de sumo interés en la ganadería argentina, debido a las pérdidas económicas que resultan de la mortandad y morbilidad del ganado bovino causadas por las mismas. Aprovechando la utilización de la cepa vacunal S19 de uso obligatorio en nuestro país, se podría generar una respuesta inmunológica específica contra antígenos claves de los patógenos causantes de estas enfermedades. Este trabajo es una base para el estudio y el desarrollo de vacunas multivalentes que deberán presentar una diversidad de antígenos, o epítopes de antígenos de los patógenos heterólogos, ya que es muy difícil que un único antígeno permita producir un efecto protector, más allá del efecto adyuvante que pueda producir la *Brucella*.

Los vectores aquí desarrollados podrán ser empleados no sólo para expresar antígenos heterólogos *in vivo* sino también para potenciar el nivel de expresión de proteínas antigénicas endógenas.

# Conclusiones



- Todos los plásmidos replicativos desarrollados son estables y funcionales durante el crecimiento de *Brucella* en el ratón, independientemente del antígeno que expresen.
- El plásmido pomp19, desarrollado en esta tesis, permite la expresión de proteínas heterólogas en la membrana de *Brucella* que pueden o no ser lipidadas, dependiendo de las características de la proteína heteróloga. Esta modificación postraduccional se da por la presencia de la secuencia de lipidación presente en OMP19 de *B. abortus*.
- Este es el primer trabajo con una cepa vacunal de *Brucella* como sistema de expresión heteróloga en el que se utiliza un contexto asociado a un residuo lipídico como presentación del antígeno heterólogo.
- La integración del plásmido p26-83 en el genoma de S19 es estable y permite la expresión de la proteína recombinante durante la replicación de *Brucella* en el ratón, indicando que la estrategia empleada fue útil para la expresión de genes bajo promotor fuerte e integrado en única copia al cromosoma bacteriano. Sin embargo, el empleo de este plásmido está restringido a algunas proteínas, como pudo evidenciarse por la imposibilidad de expresar RAP1 como fusión a BP26.
- Este es el primer trabajo en el que se utiliza un plásmido integrativo en *Brucella* en estudios de sistemas de expresión heteróloga.
- Rap1 de *B. bovis* y MBP83 de *M. bovis* pueden ser expresadas en *B. abortus* S19. Rap1 se localiza en la fracción de membrana, independientemente de la secuencia señal utilizada. MBP83 se localiza en membrana al ser asociada a OMP19 y en la fracción soluble al estar como fusión a los primeros aminoácidos de  $\beta$ -galactosidasa o de BP26.

- La expresión de estas proteínas heterólogas en los contextos estudiados no alteran las características de infección de *B. abortus* S19 en el modelo murino de infección estudiado.
- Las cepas recombinantes de *Brucella* obtenidas que expresan ambas proteínas heterólogas son capaces de inducir una respuesta celular específica contra el antígeno heterólogo que expresan, a través de su replicación en el ratón.
- Las inmunizaciones con SpRAP y Spomp19-RAP disparan la producción de anticuerpos predominantemente IgG2a, isotipo característico de respuestas de perfil Th1.
- La falta de respuesta humoral específica detectable contra MPB83 frente a las inmunizaciones con las cepas de *Brucella* que la expresan podría deberse a que MBP83 no queda expuesta en la cara externa de la bacteria.
- Las cepas recombinantes de *Brucella* que expresan MBP83 o RAP1 inducen un perfil de respuesta inmune compatible con protección, indicando que las cepas desarrolladas son potenciales inmunógenos que podrán ser considerados en el desarrollo de estrategias de vacunación para el control de la tuberculosis y la babesiosis.

Lic. Julia Verónica Sabio y García  
Doctorando

Dra. Fabiana Bigi  
Directora

Dra. Eleonora Campos  
Directora asistente

# Bibliografía

**Abadie V, Badell E, Douillard P, Ensergueix D, Leenen PJ, Tanguy M, Fiette L, Saeland S, Gicquel B, Winter N.** (2005). Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after *Mycobacterium bovis* BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. *Blood*, vol. 106(5):1843–1850.

**Abdallah AI, Commander NJ, Woodward MJ, Spencer S, Hart CA, Winstanley C.** (2003). Type III secretion homologs are present in *Brucella melitensis*, *B. ovis*, and *B. suis* biovars 1, 2, and 3. *Curr Microbiol.* 46(4):241-245.

**Acha P y Szyfres B.** (1986). Brucelosis. *En Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales.* Organización Panamericana de la Salud. pp; 14-46.

**Aderem A, Underhill DM.** (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol.* 17:593-623.

**Akins DR, Purcell BK, Mitra MM, Norgard MV, Radolf JD.** (1993). Lipid modification of the 17-kilodalton membrane immunogen of *Treponema pallidum* determines macrophage activation as well as amphiphilicity. *Infect Immun.* 61(4):1202-10.

**Allen AR, Minozzi G, Glass EJ, Skuce RA, McDowell SW, Woolliams JA, Bishop SC.** (2010). Bovine tuberculosis: the genetic basis of host susceptibility. *Proc Biol Sci.* 277(1695):2737-45. Epub 2010 Jun 2. Review.

**Allen CA, Adams LG, Ficht TA.** (1998). Transposon-derived *Brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival. *Infect Immun.* 66(3):1008-1016.

**Allred DR, Al-Khedery B.** (2006). Antigenic variation as an exploitable weakness of babesial parasites. *Vet Parasitol.* 138(1-2):50-60. Epub 2006 Mar 3. Review.

**Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM.** (1988). Techniques for the brucellosis laboratory. INRA, Paris.

**Andersen P.** (1997). Host responses and antigens involved in protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol.* 45(2):115-31. Review.

**Araya LN, Winter AJ.** (1990). Comparative protection of mice against virulent and attenuated strains of *Brucella abortus* by passive transfer of immune T cells or serum. *Infect Immun.* 58(1):254-256.

**Araya LN, Elzer PH, Rowe GE, Enright FM, Winter AJ.** (1989). Temporal development of protective cell-mediated and humoral immunity in BALB/c mice infected with *Brucella abortus*. *J Immunol.* 143(10):3330-3337.

**Arenas-Gamboa AM, Ficht TA, Kahl-McDonagh MM, Gomez G, Rice-Ficht AC.** (2009). The *Brucella abortus* S19 DeltavjbR live vaccine candidate is safer than S19 and confers protection against wild-type challenge in BALB/c mice when delivered in a sustained-release vehicle. *Infect Immun.* 77(2):877-884. Epub 2008 Dec 1.

**Arese AI, Cravero SL, Boschioli ML, Campos E, Samartino L, Rossetti OL.** (1999). Use of a recombinant protein from *Brucella abortus* for the diagnosis of brucellosis in different animal species. *Rev. Argent. Microbiol.* 31:36-39.

- Arko-Mensah J, Julián E, Singh M, Fernández C.** (2007). TLR2 but not TLR4 signalling is critically involved in the inhibition of IFN-gamma-induced killing of mycobacteria by murine macrophages. *Scand J Immunol.* 65(2):148-157.
- Bae JE, Schurig GG, Toth TE.** (2002). Mice immune responses to *Brucella abortus* heat shock proteins. Use of baculovirus recombinant-expressing whole insect cells, purified *Brucella abortus* recombinant proteins, and a vaccinia virus recombinant as immunogens. *Vet Microbiol.* 88(2):189-202.
- Baldwin CL, Goenka R.** (2006). Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? *Crit Rev Immunol.* 26(5):407-442.
- Baldwin CL.** (2002). Immune response overview. *Vet Microbiol.* 90(1-4):365-366.
- Baldwin C, Roop II RM.** (1999). *Brucella* Infections and Immunity. *En L. J. Paradise* (ed.), Opportunistic intracellular bacteria and immunity. Plenum Press, N.Y. pp. 266-271.
- Baloglu S, Boyle SM, Vemulapalli R, Sriranganathan N, Schurig GG, Toth TE.** (2005). Immune responses of mice to vaccinia virus recombinants expressing either *Listeria monocytogenes* partial listeriolysin or *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 protein. *Vet Microbiol.* 109(1-2):11-17.
- Banai, M.** (2002). Control of small ruminant brucellosis by use of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine: laboratory aspects and field observations. *Vet Microbiol.* 90:497-519.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K.** (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18:767-811.
- Bang B.** (1906). Infectious abortion in cattle. *J. Comp. Pathol.* 19:191-202.
- Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, Andersen P, Gicquel B.** (1998). A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10), *Microbiology* (Reading, England). 144(11):3195-3203.
- Betts M, Beining P, Brunswick M, Inman J, Angus RD, Hoffman T, Golding B.** (1993). Lipopolysaccharide from *Brucella abortus* behaves as a T-cell-independent type 1 carrier in murine antigen-specific antibody responses. *Infect Immun.* 61(5):1722-1729.
- Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP.** (1999). Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol.* 17:189-220.
- Blanco FC, Schierloh P, Bianco MV, Caimi K, Meikle V, Alito AE, Cataldi AA, Sasiain Mdel C, Bigi F.** (2009). Study of the immunological profile towards *Mycobacterium bovis* antigens in naturally infected cattle. *Microbiol Immunol.* 53(8):460-467.
- Blasco JM.** (1997). A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev Vet Med.* 31(3-4):275-283.

- Blasco JM, Díaz R.** (1993). *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine as a cause of human brucellosis. *Lancet*. 342:805.
- Bock R, Jackson L, de Vos A, Jorgensen W.** (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*. 129 Suppl:247-269. Review.
- Bona CA, Casares S, Brumeanu TD.** (1998). Towards development of T-cell vaccines. *Immunol Today*. 19(3):126-133. Review.
- Boschioli ML, Ouahrani-Bettache S, Foulongne V., Michaux-Charachon S, Bourg G, Allardet-Servent A, Cazevielle C, Liautard JP, Ramuz M, O'Callaghan D.** (2002). The *Brucella suis virB* operon is induced intracellularly in macrophages. *PNAS*. 99:1544-1549.
- Boschioli ML, Cravero SL, Arese AI, Campos E, Rossetti OL.** (1997). Protection against infection in mice vaccinated with a *Brucella abortus* mutant. *Infect. Immun.* 65:798-800.
- Boschioli ML, Cravero SL, Arese AI, Rossetti OL.** (1995). Construcción y caracterización de una mutante de *Brucella abortus* por inactivación de un gen que codifica una proteína de 26 kDa. *Arch. Med. Vet.* 26:103-111.
- Bråve A, Ljungberg K, Boberg A, Rollman E, Isagulians M, Lundgren B, Blomberg P, Hinkula J, Wahren B.** (2005). Multigene/multisubtype HIV-1 vaccine induces potent cellular and humoral immune responses by needle-free intradermal delivery. *Mol Ther.* 12(6):1197-1205. Epub 2005 Aug 22.
- Brewer TF.** (2000). Preventing tuberculosis with bacillus Calmette-Guérin vaccine: a meta-analysis of the literature. *Clin Infect Dis.* 31(3):64-67.
- Bricker BJ, Ewalt DR, Mac Millan AP, Foster G, Brew S.** (2000). Molecular characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *J Clin Microbiol* 38:1258-1262.
- Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ, Modlin RL.** (1999). Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*. 285(5428):732-736.
- Briones G, Iñón de Iannino N, Roset M, Vigliocco A, Silva Paulo P, Ugalde RA.** (2001). *Brucella abortus* cyclic  $\beta$  1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells. *Infect. Immun.* 69:4528-4535.
- Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST.** (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:3684-3689.
- Brown WC, Norimine J, Knowles DP, Goff WL.** (2006a). Immune control of *Babesia bovis* infection. *Vet Parasitol.* 138(1-2):75-87. Epub 2006 Feb 28. Review.

- Brown WC, Norimine J, Goff WL, Suarez CE, McElwain TF.** (2006b). Prospects for recombinant vaccines against *Babesia bovis* and related parasites. *Parasite Immunol.* 28(7):315-327. Review.
- Bruce, D.** (1887). Note on the discovery of a microorganism in Malta Fever. *The Practitioner.* 39:161-170.
- Buck, JM.** (1930). Studies of vaccination during calfhooood to prevent bovine infectious abortion.. *J of Agric. Reasearch.* 41:667-689.
- Buddle BM, Wedlock DN, Denis M, Vordermeier HM, Hewinson RG.** (2011). Update on vaccination of cattle and wildlife populations against tuberculosis. *Vet Microbiol.* 2011 Feb 24. [Epub ahead of print]
- Buddle BM.** (2010). Tuberculosis vaccines for cattle: the way forward. *Expert Rev Vaccines.* 9(10):1121-1124.
- Buddle BM, McCarthy AR, Ryan TJ, Pollock JM, Vordermeier HM, Hewinson RG, Andersen P, de Lisle GW.** (2003). Use of mycobacterial peptides and recombinant proteins for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-positive cattle. *Vet Rec.* 153(20):615-620.
- Cai H, Tian X, Hu XD, Zhuang YH, Zhu YX.** (2004). Combined DNA vaccines formulated in DDA enhance protective immunity against tuberculosis. *DNA Cell Biol.* 23(7):450-456.
- Campbell GA, Adams LG, Sowa BA.** (1994). Mechanisms of binding of *Brucella abortus* to mononuclear phagocytes from cows naturally resistant or susceptible to brucellosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 41(3-4):295-306.
- Campos MA, Rosinha GM, Almeida IC, Salgueiro XS, Jarvis BW, Splitter GA, Qureshi N, Bruna-Romero O, Gazzinelli RT, Oliveira SC.** (2004). Role of Toll-like receptor 4 in induction of cell-mediated immunity and resistance to *Brucella abortus* infection in mice. *Infect Immun.* 72(1):176-186.
- Campos E.** (2003). Obtención de mutantes de *Brucella abortus* genéticamente definidas: su caracterización molecular y evaluación de su uso como vacunas para la brucelosis bovina. Director: Dr. Osvaldo L. Rossetti. Buenos Aires, 2003.
- Campos E, Cravero SL, Delgui L, Mora I, Kahn N, Arese AI, Rossetti OL.** (2002). *Brucella abortus* INTA2, a novel strain 19 ( $\Delta$ )*bp26::luc* ( $\Delta$ )*bmp18* double mutant lacking drug resistance markers. *Vet Microbiol.* 87:1-13.
- Capasso L.** (2002). Bacteria in two-millennia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. *J Infect.* 45(2):122-127.
- Cassataro J, Pasquevich KA, Estein SM, Laplagne DA, Velikovskiy CA, de la Barrera S, Bowden R, Fossati CA, Giambartolomei GH, Goldbaum FA.** (2007a). A recombinant subunit vaccine based on the insertion of 27 amino acids from Omp31 to the N-terminus of BLS induced a similar degree of protection against *B. ovis* than Rev.1 vaccination. *Vaccine.* 25(22):4437-4446. Epub 2007 Apr 2.

- Cassataro J, Pasquevich KA, Estein SM, Laplagne DA, Zwerdling A, de la Barrera S, Bowden R, Fossati CA, Giambartolomei GH, Goldbaum FA.** (2007b). A DNA vaccine coding for the chimera BLSOmp31 induced a better degree of protection against *B. ovis* and a similar degree of protection against *B. melitensis* than Rev.1 vaccination. *Vaccine*. 25(32):5958-5967. Epub 2007 Jun 12.
- Castro HA, González SR, Prat MI.** (2005). Brucellosis una revisión práctica. *Acta Bioquím Clin. Latinoamericana*. 39:203-216.
- Celli, J., Gorvel, J. P.** (2004). Organelle robbery: *Brucella* interactions with the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Microbiol*. 7(1):93-97.
- Chain PS, Comerci DJ, Tolmasky ME, Larimer FW, Malfatti SA, Vergez LM, Aguero F, Land ML, Ugalde RA, Garcia E.** (2005). Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic *Brucellae*. *Infect Immun*. 73(12):8353-8361.
- Chambers MA, Whelan AO, Spallek R, Singh M, Coddeville B, Guerardel Y, Ellass E.** (2010). Non-acylated *Mycobacterium bovis* glycoprotein MPB83 binds to TLR1/2 and stimulates production of matrix metalloproteinase 9. *Biochem Biophys Res Commun*. 400(3):403-408. Epub 2010 Aug 26.
- Chambers MA.** (2009). Review of the diagnosis and study of tuberculosis in non-bovine wildlife species using immunological methods. *Transbound Emerg Dis*. 56(6-7):215-27. Epub 2009 May 26. Review.
- Clavareau C, Wellemans V, Walravens K, Tryland M, Verger JM, Grayon M, Cloeckaert A, Letesson JJ, Godfroid J.** (1998). Phenotypic and Molecular characterization of a *Brucella* strain isolated from a mink whale (*Balaenoptera acutorostrata*). *Microbiology*. 144:3267-3273.
- Cloeckaert A, Jacques I, Grilló MJ, Marín CM, Grayon M, Blasco JM, Verger JM.** (2004). Development and evaluation as vaccines in mice of *Brucella melitensis* Rev.1 single and double deletion mutants of the *bp26* and *omp31* genes coding for antigens of diagnostic significance in ovine brucellosis. *Vaccine*. 22(21-22):2827-2835.
- Cloeckaert A, Baucheron S, Vizcaino N, Zygmunt MS.** (2001). Use of recombinant BP26 protein in serological diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. *Clin Diagn Lab Immunol*. 8(4):772-775.
- Cloeckaert A, Debbarh HS, Vizcaino N, Saman E, Dubray G, Zygmunt MS.** (1996a). Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis* *bp26* gene coding for a protein immunogenic in infected sheep. *FEMS Microbiol. Lett*. 140:139-144.
- Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Vizcaíno N.** (1996b). Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. *FEMS Microbiol Lett*. 145(1):1-8. Review.



**Comerci DJ, Pollevick GD, Vigliocco AM, Frasch AC, Ugalde RA.** (1998). Vector development for the expression of foreign proteins in the vaccine strain *Brucella abortus* S19. *Infect Immun.* 66(8):3862-3866.

**Corbel M.J.** (1997). Recent advances in Brucellosis. *The Pathological Society of Great Britain and Ireland* pp. 101-103.

**Cote-Sierra J, Bredan A, Toldos CM, Stijlemans B, Brys L, Cornelis P, Segovia M, de Baetselier P, Revets H.** (2002). Bacterial lipoprotein-based vaccines induce tumor necrosis factor-dependent type 1 protective immunity against *Leishmania major*. *Infect Immun.* 70(1):240-248.

**Crasta OR, Folkerts O, Fei Z, Mane SP, Evans C, Martino-Catt S, Bricker B, Yu G, Du L, Sobral BW.** (2008). Genome Sequence of *Brucella abortus* Vaccine Strain S19 Compared to Virulent Strains Yields Candidate Virulence Genes. *PLoS One.* 3(5):e2193.

**Cravero S, Boschioli L, Rossetti O.** (1993). Inactivation and growth behavior in mice of a *Brucella abortus bmp18* insertion mutant. 46th Annual Brucellosis Research Conference. Chicago, USA.

**Cullen PA, Lo M, Bulach DM, Cordwell SJ, Adler B.** (2003). Construction and evaluation of a plasmid vector for the expression of recombinant lipoproteins in *Escherichia coli*. *Plasmid.* 49(1):18-29.

**Dalrymple BP.** (1993). Molecular variation and diversity in candidate vaccine antigens from *Babesia*. *Acta Trop.* 53(3-4):227-238.

**Dalrymple BP, Peters JM, Goodger BV, Bushell GR, Waltisbuhl DJ, Wright IG.** (1993). Cloning and characterisation of cDNA clones encoding two *Babesia bovis* proteins with homologous amino- and carboxy-terminal domains. *Mol Biochem Parasitol.* 59(2):181-189.

**Dao DN, Sweeney K, Hsu T, Gurcha SS, Nascimento IP, Roshevsky D, Besra GS, Chan J, Porcelli SA, Jacobs WR.** (2008). Mycolic acid modification by the *mmaA4* gene of *M. tuberculosis* modulates IL-12 production. *PLoS Pathogens*, 4(6), e1000081.

**Davis DS.** (1990). Brucellosis in the wildlife. *En: Animal Brucellosis.* K. Nielsen y J.R. Duncan, ed. CRC Press. pp. 283-300.

**de la Fuente J, Blouin EF, Manzano-Roman R, Naranjo V, Almazán C, Pérez de la Lastra JM, Zivkovic Z, Massung RF, Jongejan F, Kocan KM.** (2008). Differential expression of the tick protective antigen subolesin in *Anaplasma marginale*- and *A. phagocytophilum*-infected host cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1149:27-35.

**de la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Barbet AF, Blouin EF, Kocan KM.** (2004). Adhesion of outer membrane proteins containing tandem repeats of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species (Rickettsiales: Anaplasmataceae) to tick cells. *Vet Microbiol.* 98(3-4):313-322.

**de la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, Saliki JT, Kocan KM.** (2002). Infection of tick cells and bovine erythrocytes with one genotype of the intracellular ehrlichia *Anaplasma marginale* excludes infection with other genotypes. Clin Diagn Lab Immunol. 9(3):658-68.

**Delogu G, Fadda G.** (2009). The quest for a new vaccine against tuberculosis. J Infect Dev Ctries. 3(1):5-15. Review.

**DelVecchio VG, Wagner MA, Eschenbrenner M, Horn T, Kraycer JA, Estock F, Elzer P, Mujer CH.** (2002a). *Brucella* proteomes- a review. Vet. Microbiol. 90:593-603.

**DelVecchio VG, Kapatral V, Redkar RJ, Patra G, Mujer C, Los T, Ivanova N, Anderson I, Bhattacharyya A, Lykidis A., Reznik G., Jablonski L, Larsen N, D'Souza M, Bernal A, Mazur M, Goltsman E, Selkov E, Elzer PH, Hagius S, O'Callaghan D, Letteson JJ, Haselkorn R, Kyrpidis N, Overbeek R.** (2002.b). The Genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. PNAS. 99:443-448.

**Detmer A, Glenting J.** (2006). Live bacterial vaccines--a review and identification of potential hazards. Microb Cell Fact. 5:23-35.

**de Vos AJ; Bock RE.** (2002). Vaccination against bovine babesiosis. Ann. NY. Acad. Sci. 916:540-545.

**Dietrich J, Andersen C, Rappuoli R, Doherty TM, Jensen CG, Andersen P. J Immunol.** (2006). Mucosal administration of Ag85B-ESAT-6 protects against infection with *Mycobacterium tuberculosis* and boosts prior bacillus Calmette-Guerin immunity. 177(9):6353-6360.

**Dieye Y, Hoekman AJ, Clier F, Juillard V, Boot HJ, Piard JC.** (2003). Ability of *Lactococcus lactis* to export viral capsid antigens: a crucial step for development of live vaccines. Appl Environ Microbiol. 69(12):7281-7288.

**Donson AM, Foreman NK.** (1998). Adenovirus mediated gene therapy in a glioblastoma vaccine model; specific antitumor immunity and abrogation of immunosuppression. J Neurooncol. 40(3):205-214.

**Drabner B, Guzmán CA.** (2001). Elicitation of predictable immune responses by using live bacterial vectors. Biomolecular Engineering. 17:75-82.

**Dubarry J.** (2005). Tuberculosis bovina: valoración de la Inmunohistoquímica como método de diagnóstico complementario. Ciencia Veterinaria. 7(1):82-86.

**Edmonds MD, Cloeckert A, Elzer PH.** (2002). *Brucella* species lacking the major outer membrane protein Omp25 are attenuated in mice and protect against *Brucella melitensis* and *Brucella ovis*. Vet Microbiol. 88(3):205-221.

**Eisenhut M, Paranjothy S, Abubakar I, Bracebridge S, Lilley M, Mulla R, Lack K, Chalkley D, McEvoy M.** (2009). BCG vaccination reduces risk of infection with *Mycobacterium tuberculosis* as detected by gamma interferon release assay. Vaccine. 27(44):6116-6120. Epub 2009 Aug 26.

- Eisenschenk FC, Houle JJ, Hoffmann EM.** (1999). Mechanism of serum resistance among *Brucella abortus* isolates. *Vet Microbiol.* 68(3-4):235-244.
- Evans AC.** (1949). Comments on the early history of human brucellosis. *En Brucellosis, a symposium.* AAAS, Waverly Press, Inc. Baltimore, Maryland. pp.:1-8.
- Ewalt DR, Payeur JB, Martin BM, Cummins DR, Miller WG.** (1994). Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Vet Diagn Invest.* 6(4):448-452.
- Ficht TA, Kahl-McDonagh MM, Arenas-Gamboa AM, Rice-Ficht AC.** (2009). Brucellosis: the case for live, attenuated vaccines. *Vaccine.* 27(4):40-43.
- Fiorentino MA, Campos E, Cravero S, Arese A, Paolicchi F, Campero C, Rossetti O.** (2008). Protection levels in vaccinated heifers with experimental vaccines *Brucella abortus* M1-luc and INTA 2. *Vet Microbiol.* 132(3-4):302-311. Epub 2008 May 9.
- Fretin D, Fauconnier A, Kohler S, Halling S, Leonard S, Nijskens C, Ferooz J, Lestrade P, Delrue RM, Danese I, Vandenhoute J, Tibor A, DeBolle X, Letesson JJ.** (2005). The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. *Cell Microbiol.* 7(5):687-698.
- Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jacques I, Cloeckaert A.** (2007). *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57(11):2688-2693.
- Gamazo C, Winter AJ, Moriyón I, Riezu-Boj JI, Blasco JM, Díaz R.** (1989). Comparative analyses of proteins extracted by hot saline or released spontaneously into outer membrane blebs from field strains of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*. *Infect Immun.* 57(5):1419-1426.
- García-Carrillo C.** (1990). Laboratory animal models for brucellosis studies. *En: Animal Brucellosis.* K. Nielsen y J.R. Duncan, ed. CRC Press. pp. 423-442.
- García- Carrillo C.** (1980). Comparison of *B. melitensis* Rev.1 and *B. abortus* strain 19 as a vaccine against brucellosis in cattle. *Zbl Vet Med* 27:131-138.
- Garcia-Garcia JC, de la Fuente J, Kocan KM, Blouin EF, Halbur T, Onet VC, Saliki JT.** (2004). Mapping of B-cell epitopes in the N-terminal repeated peptides of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a and characterization of the humoral immune response of cattle immunized with recombinant and whole organism antigens. *Vet Immunol Immunopathol.* 98(3-4):137-151.
- Gerlach GF, Anderson C, Klashinsky S, Rossi-Campos A, Potter AA, Willson PJ.** (1993). Molecular characterization of a protective outer membrane lipoprotein (OmlA) from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Infect Immun.* 61(2):565-572.
- Godfroid, J., Cloeckaert, A., Liautard, J. P., Kohler, S., Fretin, D., Walravens, K., Garin-Bastuji, B. Letesson, J. J.** (2005). From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet Res.* 36(3):313-326.

- Godfroid F, Taminiau B, Danese I, Denoel P, Tibor A, Weynants V, Cloeckaert A, Godfroid J, Letesson JJ.** (1998). Identification of the perosamine synthetase gene of *Brucella melitensis* 16M and involvement of lipopolysaccharide O side chain in *Brucella* survival in mice and in macrophages. *Infect Immun.* 66(11):5485-5493.
- Goff WL, Bastos RG, Brown WC, Johnson WC, Schneider DA.** (2010). The bovine spleen: interactions among splenic cell populations in the innate immunologic control of hemoparasitic infections. *Vet Immunol Immunopathol.* 138(1-2):1-14. Epub 2010 Jul 16.
- Golding B, Scott DE, Scharf O, Huang LY, Zaitseva M, Lapham C, Eller N, Golding H.** (2001). Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes Infect.* 3:43-48.
- Golding B, Inman J, Highet P, Blackburn R, Manischewitz J, Blyveis N, Angus RD, Golding H.** (1995). *Brucella abortus* conjugated with a gp120 or V3 loop peptide derived from human immunodeficiency virus (HIV) type 1 induces neutralizing anti-HIV antibodies, and the V3-*B. abortus* conjugate is effective even after CD4+ T-cell depletion. *J Virol.* 69(6):3299-3307.
- Griffiths RA, Boyne JR, Whitehouse A.** (2006). Herpesvirus saimiri-based gene delivery vectors. *Curr Gene Ther.* 6(1):1-15. Review.
- Halling SM.** (1998). On the presence and organization of open reading frames of the nonmotile pathogen *Brucella abortus* similar to class II, III, and IV flagellar genes and to LcrD virulence superfamily. *Microb Comp Genomics.* 3:21-29.
- Hanekom WA, Lawn SD, Dheda K.** (2010). Tuberculosis research update. Whitelaw A. *Trop Med Int Health.* 15(8):981-9. Epub 2010 Jun 15.
- Hansson L, Noppa L, Nilsson AK, Strömqvist M, Bergström S.** (1995). Expression of truncated and full-length forms of the Lyme disease *Borrelia* outer surface protein A in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 6(1):15-24.
- Harboe M, Wiker HG, Ulvund G, Lund-Pedersen B, Andersen AB, Hewinson RG, Nagai S.** (1998). MPB70 and MPB83 as indicators of protein localization in mycobacterial cells. *Infect Immun.* 66(1):289-296.
- Harboe M, Nagai S, Wiker HG, Sletten K, Haga S.** (1995). Homology between the MPB70 and MPB83 proteins of *Mycobacterium bovis* BCG. *Scand J Immunol.* 42(1):46-51.
- Harrington DJ, Greated JS, Chanter N, Sutcliffe IC.** (2000). Identification of lipoprotein homologues of pneumococcal PsaA in the equine pathogens *Streptococcus equi* and *Streptococcus zooepidemicus*. *Infect Immun.* 68(10):6048-6051.
- Hayashi S, Wu HC.** (1990). Lipoproteins in bacteria. *J Bioenerg Biomembr.* 22(3):451-471. Review.
- Hertz CJ, Kiertscher SM, Godowski PJ, Bouis DA, Norgard MV, Roth MD, Modlin RL.** (2001). Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. *J Immunol.* 166(4):2444-2450.

- Hess J, Gentschev I, Miko D, Welzel M, Ladel C, Goebel W, Kaufmann SH.** (1996). Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(4):1458-1463.
- Hewinson RG, Michell SL, Russell WP, McAdam RA, Jacobs WR Jr.** (1996). Molecular characterization of MPT83: a seroreactive antigen of *Mycobacterium tuberculosis* with homology to MPT70. *Scand J Immunol.* 43(5):490-499.
- Hope JC, Villarreal-Ramos B.** (2008). Bovine TB and the development of new vaccines. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 31(2-3):77-100. Epub 2007 Aug 30.
- Hope JC, Whelan AO, Hewinson RG, Vordermeier M, Howard CJ.** (2003). Maturation of bovine dendritic cells by lipopeptides. *Vet Immunol Immunopathol.* 95(1-2):21-31.
- Hunfeld KP, Hildebrandt A, Gray JS.** (2008). Babesiosis: recent insights into an ancient disease. *Int J Parasitol.* 38(11):1219-1237. Epub 2008 Mar 20.
- Inukai M, Nakajima M, Osawa M, Haneishi T, Arai M.** (1978). Globomycin, a new peptide antibiotic with spheroplast-forming activity. II. Isolation and physico-chemical and biological characterization. *J Antibiot (Tokyo).* 31(5):421-425.
- Islam MA, Khatun MM, Baek BK, Lee SI.** (2009). Efficacy of strain RB51 vaccine in protecting infection and vertical transmission against *Brucella abortus* in Sprague-Dawley rats. *J Vet Sci.* 10(3):211-218.
- Jacques I, Verger JM, Laroucau K, Grayon M, Vizcaino N, Peix A, Cortade F, Carreras F, Guilloteau LA.** (2007). Immunological responses and protective efficacy against *Brucella melitensis* induced by *bp26* and *omp31* *B. melitensis* Rev.1 deletion mutants in sheep. *Vaccine.* 25(5):794-805. Epub 2006 Sep 27.
- Jahans, K. L., Foster, G., Broughton, E. S.** (1997). The characterisation of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *Vet Microbiol.* 57(4):373-382.
- Jonsson NN, Bock RE, Jorgensen WK.** (2008). Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. *Vet Parasitol.* 155(1-2):1-9. Epub 2008 Apr 7. Review.
- Jumas-Bilak E, Michaux-Charachon S, Bourg G, Ramuz M, Allardet-Servent A.** (1998). Unconventional genomic organization in the alpha subgroup of the Proteobacteria. *J Bacteriol.* 180:2749-2755.
- Kamath AT, Feng CG, Macdonald M, Briscoe H, Britton WJ.** (1999). Differential protective efficacy of DNA vaccines expressing secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis*, *Infection and immunity* 67:1702-1707.
- Keenan J, Oliaro J, Domigan N, Potter H, Aitken G, Allardyce R, Roake J.** (2000). Immune response to an 18-kilodalton outer membrane antigen identifies lipoprotein 20 as a *Helicobacter pylori* vaccine candidate. *Infect Immun.* 68(6):3337-3343.



**Ko J, Splitter G.** (2003). Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 16:65- 78.

**Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Coetzee JF, Ewing SA.** (2010). The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet Parasitol.* 167(2-4):95-107. Epub 2009 Sep 19. Review.

**Kocan KM, Halbur T, Blouin EF, Onet V, de la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Saliki JT.** (2001). Immunization of cattle with *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture. *Vet Parasitol.* 102(1-2):151-161.

**Köhler S, Michaux-Charachon S, Porte F, Ramuz M, Liautard JP.** (2003). What is the nature of the replicative niche of a stealthy bug named *Brucella*? *Trends Microbiol.* 11:215-219.

**Köhler S, Foulongne V, Ouahrani-Bettache S, Bourg G, Teyssier J, Ramuz M, Liautard JP.** (2002). The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. *Proc Natl Acad Sci.* 99:1571-1576.

**Kovach M.E., Elzer P.H., Robertson G.T., Chirhart-Gilleland R.L., Christensen M.A., Peterson K.M., Roop R.M. 2nd.** (1997). Cloning and nucleotide sequence analysis of a *Brucella abortus* gene encoding an 18 kDa immunoreactive protein. *Microb Pathog.* 22:241-246.

**Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM 2nd, Peterson KM.** (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene.* 166(1):175-176.

**Kovach ME, Philips RW, Elzer PH, Roop II RM, Peterson KM.** (1994). pBBR1MCS: a broad host range cloning vector. *BioTechniques.* 16:800-802.

**Kurar E, Splitter GA.** (1997). Nucleic acid vaccination of *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 gene elicits immune response. *Vaccine.* 15(17-18):1851-1857.

**Lange C, Pai M, Drobniewski F, Migliori GB.** (2009). Interferon-gamma release assays for the diagnosis of active tuberculosis: sensible or silly? *Eur Respir J.* 33(6):1250-1253.

**Lapham C, Golding B, Inman J, Blackburn R, Manischewitz J, Hight P, Golding H.** (1996). *Brucella abortus* conjugated with a peptide derived from the V3 loop of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 induces HIV-specific cytotoxic T-cell responses in normal and in CD4+ cell-depleted BALB/c mice. *J Virol.* 70(5):3084-3092.

**Legrain M, Speck D, Jacobs E.** (1995). Production of lipidated meningococcal transferrin binding protein 2 in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 6(5):570-578.

**Leonard BA, Lopez-Goni I, Baldwin CL.** (1997). *Brucella abortus* siderophore 2,3-dihydroxybenzoic acid protects brucellae from killing by macrophages. *Vet Res.* 28(1):87-92.

- Lestrade P, Dricot A, Delrue RM, Lambert C, Martinelli V, De Bolle X, Letesson JJ, Tibor A.** (2003). Attenuated signature-tagged mutagenesis mutants of *Brucella melitensis* identified during the acute phase of infection in mice. *Infect Immun.* 71(12):7053-7060.
- Letesson JJ, Lestrade P, Delrue RM, Danese I, Bellefontaine F, Fretin D, Taminiou B, Tibor A, Dricot A, Deschamps C, Haine V, Leonard S, Laurent T, Mertens P, Vandenhoute J, De Bolle X.** (2002). Fun stories about *Brucella*: the "furtive nasty bug". *Vet. Microbiol.* 90:317-328.
- Letesson JJ, Tibor A, Van Eynde G, Wansard V, Weynants V, Denoel P, Saman E.** (1997). Humoral immune responses of *Brucella*-infected cattle, sheep, and goats to eight purified recombinant *Brucella* proteins in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol.* 4:556-564.
- LeVier K, Phillips RW, Grippe VK, Roop RM 2nd, Walker GC.** (2000). Similar requirements of a plant symbiont and a mammalian pathogen for prolonged intracellular survival. *Science.* 287(5462):2492-2493.
- Li Z, Howard A, Kelley C, Delogu G, Collins F, Morris S.** (1999). Immunogenicity of DNA vaccines expressing tuberculosis proteins fused to tissue. *Infect Immun.* 67(9):4780-4786.
- Liautard JP, Gross A, Dornand J, Köhler S.** (1996). Interactions between professional phagocytes and *Brucella* spp. *Microbiologia.* 12(2):197-206.
- Linder LE, Hadfield TL, Tall BD, Snellings NJ, Rubin FA, Van De Verg LL, Hoover D, Warren RL.** (1996). Cloning of a *Brucella melitensis* group 3 antigen gene encoding Omp28, a protein recognized by the humoral immune response during human brucellosis. *Infect. Immun.* 64:2490-2499.
- Liu L, Wang S, Shan B, Sang M, Liu S, Wang G.** (2010). Advances in viral-vector systemic cytokine gene therapy against cancer. *Vaccine.* 28(23):3883-3887. Epub 2010 Apr 4. Review.
- López, G, Peña, S, Genero, E, Lucero, N E.** (2010). Brucelosis ovina en Argentina. *Veterinaria Argentina.* 27(269).
- Lysnyansky I, Sachse K, Rosenbusch R, Levisohn S, Yogev D.** (1999). The *vsp* locus of *Mycoplasma bovis*: gene organization and structural features. *J Bacteriol.* 181(18):5734-41.
- Madurawe RD, Chase TE, Tsao EI, Bentley WE.** (2000). A recombinant lipoprotein antigen against Lyme disease expressed in *E. coli*: fermentor operating strategies for improved yield. *Biotechnol Prog.* 16(4):571-576.
- Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK.** (1996). Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*, *Journal of bacteriology.* 178:1274-1282.

- Mangold AJ, Vanzini VR, Echaide IE, de Echaide ST, Volpogni MM, Guglielmo AA.** (1996). Viability after thawing and dilution of simultaneously cryopreserved vaccinal *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* strains cultured in vitro. *Vet Parasitol.* 61(3-4):345-348.
- Martin C, Williams A, Hernandez-Pando R., Cardona PJ, Gormley E, Bordat Y, Soto CY, Clark SO, Hatch GJ, Aguilar D, Ausina V, Gicquel B.** (2006). The live *Mycobacterium tuberculosis* phoP mutant strain is more attenuated than BCG and confers protective immunity against tuberculosis in mice and guinea pigs. *Vaccine.* 24:3408–3419.
- Martinez de Tejada G, Pizarro-Cerda J, Moreno E, Moriyon I.** (1995). The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infect Immun.* 63:3054-3061.
- Maue AC, Waters WR, Palmer MV, Nonnecke BJ, Minion FC, Brown WC, Norimine J, Foote MR, Scherer CF, Estes DM.** (2007). An ESAT-6:CFP10 DNA vaccine administered in conjunction with *Mycobacterium bovis* BCG confers protection to cattle challenged with virulent *M. bovis*. *Vaccine.* 25(24):4735-4746. Epub 2007 Apr 24.
- Maue AC, Waters WR, Palmer MV, Nonnecke BJ, Minion FC, Brown WC, Norimine J, Foote MR, Scherer CF, Estes DM.** (2007). An ESAT-6:CFP10 DNA vaccine administered in conjunction with *Mycobacterium bovis* BCG confers protection to cattle challenged with virulent *M. bovis*. *Vaccine* 25:4735-4746.
- McElwain TF, Perryman LE, Musoke AJ, McGuire TC.** (1991). Molecular characterization and immunogenicity of neutralization-sensitive *Babesia bigemina* merozoite surface proteins. *Mol Biochem Parasitol.* 47(2):213-222.
- McNair Welsh MD, Pollock JM.** (2007). The immunology of bovine tuberculosis and progression toward improved disease control strategies. *Vaccine.* 25(30):5504-5511. Epub 2007 Feb 26. Review.
- Médérle I, Bourguin I, Ensergueix D, Badell E, Moniz-Peireira J, Gicquel B, Winter N.** (2002). Plasmidic versus insertional cloning of heterologous genes in *Mycobacterium bovis* BCG: impact on in vivo antigen persistence and immune responses. *Infect Immun.* 70(1):303-314.
- Medina E, Guzmán CA.** (2000). Modulation of immune responses following antigen administration by mucosal route. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 27:305–311.
- Medzhitov R, Janeway CA Jr.** (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell.* 91(3):295-298.
- Metzger DW, Buchanan JM, Collins JT, Lester TL, Murray KS, Van Cleave VH, Vogel LA, Dunnick WA.** (1996). Enhancement of humoral immunity by interleukin-12. *Ann N Y Acad Sci.* 795:100-115.
- Michaux-Charachon S, Bourg G, Jumas-Bilak E, Guigue-Talet P, Allardet-Servent A, O'Callaghan D, Ramuz M.** (1997) Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. *J Bacteriol.* 179(10):3244-3249.



**Michell SL, Whelan AO, Wheeler PR, Panico M, Easton RL, Etienne AT, Haslam SM, Dell A, Morris HR, Reason AJ, Herrmann JL, Young DB, Hewinson RG.** (2003). The MPB83 antigen from *Mycobacterium bovis* contains O-linked mannose and (1-->3)-mannobiose moieties. *J Biol Chem.* 278(18):16423-16432. Epub 2003 Jan 6.

**Montaraz JA, Winter AJ, Hunter DM, Sowa BA, Wu AM, Adams LG.** (1986). Protection against *Brucella abortus* in mice with O-polysaccharide-specific monoclonal antibodies. *Infect Immun.* 51(3):961-963.

**Moreno E, Cloeckert A, Moriyon I.** (2002). *Brucella* evolution and Taxonomy. *Veterinary Microbiology.* 90:209-227.

**Moriyón I, Grilló MJ, Monreal D, González D, Marín C, López-Goñi I, Mainar-Jaime RC, Moreno E, Blasco JM.** (2004). Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. *Vet Res.* 35(1):1-38.

**Moriyón I, López-Goñi I.** (1998). Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Int Microbiol.* 1(1):19-26.

**Moriyón I, Berman DT.** (1982). Effects of nonionic, ionic, and dipolar ionic detergents and EDTA on the *Brucella* cell envelope. *J Bacteriol.* 152(2):822-828.

**Mosmann TR.** (1991). Role of a new cytokine, interleukin-10, in the cross-regulation of T helper cells. *Ann N Y Acad Sci.* 628:337-344.

**Mosqueda J, McElwain TF, Stiller D, Palmer GH.** (2002). *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 and rhoptry-associated protein 1 are expressed in sporozoites, and specific antibodies inhibit sporozoite attachment to erythrocytes. *Infect Immun.* 70(3):1599-1603.

**Naroeni A, Porte F.** (2002). Role of cholesterol and the ganglioside GM(1) in entry and short-term survival of *Brucella suis* in murine macrophages. *Infect Immun.* 70(3):1640-1644.

**Nicoletti P.** (1990). Vaccination against *Brucella*. *Adv Biotechnol Processes.* 13:147-168.

**Norimine J, Mosqueda J, Suarez C, Palmer GH, McElwain TF, Mbassa G, Brown WC.** (2003). Stimulation of T-helper cell gamma interferon and immunoglobulin G responses specific for *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 (RAP-1) or a RAP-1 protein lacking the carboxy-terminal repeat region is insufficient to provide protective immunity against virulent *B. bovis* challenge. *Infect Immun.* 71(9):5021-5032.

**Norimine J, Suarez CE, McElwain TF, Florin-Christensen M, Brown WC.** (2002). Immunodominant epitopes in *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 that elicit memory CD4(+)-T-lymphocyte responses in *B. bovis*-immune individuals are located in the amino-terminal domain. *Infect Immun.* 70(4):2039-2048.

**O'Callaghan D., Cazevieuille C., Allardet-Servent A., Boschioli M.L., Bourg G., Foulongne V., Frutos P., Kulakov Y., Ramuz M.** (1999). A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol Microbiol* 33:1210-1220.

- Oliveira S, Soeurt N, Splitter G.** (2002). Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* antigens and host immune responses. *Vet. Microbiol.* 90:417-424.
- Oliveira S., Splitter GG.** (1996). Immunization of mice with recombinant L7/L12 ribosomal protein confers protection against *Brucella abortus* infection. *Vaccine.* 14:959-962.
- Oñate AA, Donoso G, Moraga-Cid G, Folch H, Céspedes S, Andrews E.** (2005). An RNA vaccine based on recombinant Semliki Forest virus particles expressing the Cu,Zn superoxide dismutase protein of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infect Immun.* 73(6):3294-3300.
- Oñate AA, Céspedes S, Cabrera A, Rivers R, González A, Muñoz C, Folch H, Andrews E.** (2003). A DNA vaccine encoding Cu,Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infect Immun.* 71(9):4857-4861.
- Orange JS, Biron CA.** (1996). An absolute and restricted requirement for IL-12 in natural killer cell IFN-gamma production and antiviral defense. Studies of natural killer and T cell responses in contrasting viral infections. *J Immunol.* 156(3):1138-1142.
- Osterman B, Moriyón I.** (2006). International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*. Minutes of the meeting, 17 September 2003, Pamplona, Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 56:1173-1175.
- Pantaleo G, Esteban M, Jacobs B, Tartaglia J.** (2010). Poxvirus vector-based HIV vaccines. *Curr Opin HIV AIDS.* 5(5):391-396. Review.
- Paulsen IT, Seshadri R, Nelson KE, Eisen JA, Heidelberg JF, Read TD, Dodson RJ, Umayam L, Brinkac LM, Beanan MJ, Daugherty SC, Deboy RT, Durkin AS, Kolonay JF, Madupu R, Nelson WC, Ayodeji B, Kraul M, Shetty J, Malek J, Van Aken SE, Riedmuller S, Tettelin H, Gill SR, White O, Salzberg SL, Hoover DL, Lindler LE, Halling SM, Boyle SM, Fraser CM.** (2002). The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *PNAS.* 99:13148-13153.
- Pappas G, Papadimitriou P, Christou L, Akritidis N.** (2006). Future trends in human brucellosis treatment. *Expert Opin Investig Drugs.* 15(10):1141-1149.
- Parida SK, Kaufmann SH.** (2010). Novel tuberculosis vaccines on the horizon. *Curr Opin Immunol.* 22(3):374-384. Epub 2010 May 12. Review.
- Pasquali P, Adone R, Gasbarre LC, Pistoia C, Ciuchini F.** (2002). Effect of exogenous interleukin-18 (IL-18) and IL-12 in the course of *Brucella abortus* 2308 infection in mice. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9(2):491-492.
- Pasquali P, Adone R, Gasbarre LC, Pistoia C, Ciuchini F.** (2001). Mouse cytokine profiles associated with *Brucella abortus* RB51 vaccination or *B. abortus* 2308 infection. *Infect Immun.* 69(10):6541-6544.

**Pasquevich KA, Ibañez AE, Coria LM, García Samartino C, Estein SM, Zwerdling A, Barrionuevo P, Oliveira FS, Seither C, Warzecha H, Oliveira SC, Giambartolomei GH, Cassataro J.** (2011). An oral vaccine based on U-Omp19 induces protection against *B. abortus* mucosal challenge by inducing an adaptive IL-17 immune response in mice. *PLoS One*. 6(1):e16203.

**Pasquevich KA, García Samartino C, Coria LM, Estein SM, Zwerdling A, Ibañez AE, Barrionuevo P, Oliveira FS, Carvalho NB, Borkowski J, Oliveira SC, Warzecha H, Giambartolomei GH, Cassataro J.** (2010). The protein moiety of *Brucella abortus* outer membrane protein 16 is a new bacterial pathogen-associated molecular pattern that activates dendritic cells in vivo, induces a Th1 immune response, and is a promising self-adjuvanting vaccine against systemic and oral acquired brucellosis. *J Immunol*. 184(9):5200-5212. Epub 2010 Mar 29.

**Pasquevich KA, Estein SM, García Samartino C, Zwerdling A, Coria LM, Barrionuevo P, Fossati CA, Giambartolomei GH, Cassataro J.** (2009). Immunization with recombinant *Brucella* species outer membrane protein Omp16 or Omp19 in adjuvant induces specific CD4+ and CD8+ T cells as well as systemic and oral protection against *Brucella abortus* infection. *Infect Immun*. 77(1):436-445.

**Pastoret PP, Vanderplasschen A.** (2003). Poxviruses as vaccine vectors. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 26(5-6):343-355. Review.

**Paulus M, Haslbeck M, Watzele M.** (2004). RNA stem-loop enhanced expression of previously non-expressible genes. *Nucleic Acids Res*. 32(9):e78.

**Pérez de León AA, Strickman DA, Knowles DP, Fish D, Thacker E, de la Fuente J, Krause PJ, Wikel SK, Miller RS, Wagner GG, Almazán C, Hillman R, Messenger MT, Ugstad PO, Duhaime RA, Teel PD, Ortega-Santos A, Hewitt DG, Bowers EJ, Bent SJ, Cochran MH, McElwain TF, Scoles GA, Suarez CE, Davey R, Howell Freeman JM, Lohmeyer K, Li AY, Guerrero FD, Kammlah DM, Phillips P, Pound JM; the Group for Emerging Babesioses and One Health Research and Development in the U.S.** (2010). One Health approach to identify research needs in bovine and human babesioses: workshop report. *Parasit Vectors*. 3(1):36.

**Pizarro-Cerdá J, Moreno E, Sanguedolce V, Mege JL, Gorvel JP.** (1998). Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. *Infect. Immun*. 66:2387-2392.

**Radolf JD, Arndt LL, Akins DR, Curetty LL, Levi ME, Shen Y, Davis LS, Norgard MV.** (1995). *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins and synthetic lipopeptides activate monocytes/macrophages. *J Immunol*. 154(6):2866-2877.

**Ramamoorthy S, Sanakkayala N, Vemulapalli R, Duncan RB, Lindsay DS, Schurig GS, Boyle SM, Kasimanickam R, Sriranganathan N.** (2007a). Prevention of lethal experimental infection of C57BL/6 mice by vaccination with *Brucella abortus* strain RB51 expressing *Neospora caninum* antigens. *Int J Parasitol*. 37(13):1521-1529. Epub 2007 May 13.

**Ramamoorthy S, Sanakkayala N, Vemulapalli R, Jain N, Lindsay DS, Schurig GS, Boyle SM, Sriranganathan N.** (2007b). Prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in C57BL/6 mice vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51 expressing *N. caninum* protective antigens. *Int J Parasitol.* 37(13):1531-1538. Epub 2007 May 13.

**Riezu-Boj JI, Moriyón I, Blasco JM, Marín CM, Díaz R.** (1986). Comparison of lipopolysaccharide and outer membrane protein-lipopolysaccharide extracts in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection. *J Clin Microbiol.* 23(5):938-942.

**Ristic M, Carson CA.** (1977). Methods of immunoprophylaxis against bovine anaplasmosis with emphasis on use of the attenuated *Anaplasma marginale* vaccine. *Adv Exp Med Biol.* 93:151-188.

**Roop RM 2nd, Fletcher TW, Sriranganathan NM, Boyle SM, Schurig GG.** (1994). Identification of an immunoreactive *Brucella abortus* HtrA stress response protein homolog. *Infect Immun.* 62(3):1000-1007.

**Rosinha GM, Freitas DA, Miyoshi A, Azevedo V, Campos E, Cravero SL, Rossetti O, Splitter G, Oliveira SC.** (2002). Identification and characterization of a *Brucella abortus* ATP-binding cassette transporter homolog to *Rhizobium meliloti* ExsA and its role in virulence and protection in mice. *Infect Immun.* 70(9):5036-5044.

**Rossetti OL, Boschioli ML, Arese AI, Cravero SL.** (1996). Cloning of *Brucella abortus* gene and characterization of expressed 26-kilodalton periplasmic protein: potential use for diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 34:165-169.

**Rossetti OL, Rossi SG, Oszlak PA, Rosenblit N, Cravero SL.** (1991). Cloning of *Brucella abortus* genes coding for proteins immunologically active in cows. *En Networking in brucellosis research.* J. F. Frank ed. UNU. pp: 191:204.

**Sabio y García JV, Bigi F, Rossetti O, Campos E.** (2010). Expression of MPB83 from *Mycobacterium bovis* in *Brucella abortus* S19 induces specific cellular immune response against the recombinant antigen in BALB/c mice. *Microbes Infect.* 12(14-15):1236-1243. Epub 2010 Oct 1.

**Sabio y Garcia JV, Farber M, Carrica M, Cravero S, Macedo GC, Bigi F, Oliveira SC, Rossetti O, Campos E.** (2008). Expression of *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 (RAP1) in *Brucella abortus* S19. *Microbes and infection / Institut Pasteur.* 10:635-641

**Sáez D, Guzmán I, Andrews E, Cabrera A, Oñate A.** (2008). Evaluation of *Brucella abortus* DNA and RNA vaccines expressing Cu-Zn superoxide dismutase (SOD) gene in cattle. *Vet Microbiol.* 129(3-4):396-403. Epub 2007 Nov 22.

**Samartino LE.** (2007). Estrategias Internacionales para el Control de la Brucelosis. Instituto de estudios de Ciencia de la Salud de Castilla y Leon. 20-21 Junio2007. <http://www.iecscyl.com/aulas/modules/icontent/inPages/brucelosis/textos/3.%20Samartino.pdf>

- Samartino LE.** (2002). Brucellosis in Argentina. *Vet Microbiol.* 90(1-4):71-80.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sangari FJ., Grilló MJ, Jiménez de Bagüés MP, González-Carreró MI, García Lobo JM, Blasco JM, Agüero J.** (1998). The defect in the metabolism of the *Brucella abortus* B19 vaccine strain is unrelated with its attenuated virulence in mice. *Vaccine.* 16:1640-1645.
- Sangari FJ, García Lobo JM, Blasco JM, Agüero J.** (1994). The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. *FEMS Microbiol. Letters* 121:337-342.
- Santangelo MP, McIntosh D, Bigi F, Armoa GR, Campos AS, Ruybal P, Dellagostin OA, McFadden J, Mendum T, Gicquel B, Winter N, Farber M, Cataldi A.** (2007). *Mycobacterium bovis* BCG as a delivery system for the RAP-1 antigen from *Babesia bovis*. *Vaccine* 25 1104-1113.
- Scholz HC, Hubalek Z, Sedlacek I, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Melzer F, Kampfer P, Neubauer H, Cloeckaert A.,Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Falsen E, Bahn P, Gollner C, Pfeffer M, Huber B, Busse HJ, Nockler K.** (2008). *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 58(2):375-382.
- Schurig GG, Sriranganathan N, Corbel MJ.** (2002). Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Microbiol.* 90:479-496.
- Schurig GG, Roop RM, Bagchi T, Boyle S, Sriranganathan N.** (1991). Biological properties of RB51: a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.* 28:171-188.
- Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N.** (2010). Brucellosis: a re-emerging zoonosis. *Vet Microbiol.* 140(3-4):392-398. Epub 2009 Jun 21.
- Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N.** (2008). *Brucella*: a pathogen without classic virulence genes. *Vet Microbiol.* 129(1-2):1-14. Epub 2007 Nov 29.
- Seleem M, Ali M, Al-Azeem MW, Boyle SM, Sriranganathan N.** (2007). Enhanced expression, detection and purification of recombinant proteins using RNA stem loop and tandem fusion tags. *Appl Microbiol Biotechnol.* 75 (6):1385-1392. Epub 2007 Jun 12.
- Seleem MN, Ali M, Boyle SM, Mukhopadhyay B, Witonsky SG, Schurig GG, Sriranganathan N.** (2006). Establishment of a gene expression system in *Ochrobactrum anthropi*. *Appl Environ Microbiol.* 72(10):6833-6836.
- Seleem MN, Vemulapalli R, Boyle SM, Schurig GG, Sriranganathan N.** (2004). Improved expression vector for *Brucella* species. *Biotechniques.* 37(5):740, 742, 744.
- SENASA.** (2010). Análisis comparativo de las existencias ganaderas Marzo 2010 - Marzo 2008. Informe N°13.



- SENASA.** (2000). Plan Nacional de control y erradicación de la brucelosis y tuberculosis bovina. SAGyP.
- Shang ES, Summers TA, Haake DA.** (1996). Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. *Infect Immun.* 64(6):2322-2330.
- Shkap V, de Vos AJ, Zweygarth E, Jongejan F.** (2007). Attenuated vaccines for tropical theileriosis, babesiosis and heartwater: the continuing necessity. *Trends Parasitol.* 23(9):420-426. Epub 2007 Jul 25. Review.
- Sizemore DR, Branstrom AA, Sadoff JC.** (1997). Attenuated bacteria as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Vaccine.* 15(8):804-807.
- Skinner MA, Buddle BM, Wedlock DN, Keen D, de Lisle GW, Tascon RE, Ferraz JC, Lowrie DB, Cockle PJ, Vordermeier HM, Hewinson RG.** (2003). A DNA prime-*Mycobacterium bovis* BCG boost vaccination strategy for cattle induces protection against bovine tuberculosis. *Infect Immun.* 71(9):4901-4907.
- Smith LD, Ficht TA.** (1990). Pathogenesis of *Brucella*. *Critical Reviews in Microbiology.* 17(3):209-230.
- Smith RD, Molinar E, Larios F, Monroy J, Trigo F, Ristic M.** (1980). Bovine babesiosis: pathogenicity and heterologous species immunity of tick-borne *Babesia bovis* and *B bigemina* infections. *Am J Vet Res.* 41(12):1957-1965.
- Sorensen AL, Nagai S, Houen G, Andersen P, Andersen AB.** (1995). Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and immunity* 63:1710-1717.
- Soussi N, Saklani-Jusforgues H, Colle JH, Milon G, Glaichenhaus N, Goossens PL.** (2002). Effect of intragastric and intraperitoneal immunisation with attenuated and wild-type LACK-expressing *Listeria monocytogenes* on control of murine *Leishmania major* infection. *Vaccine.* 20(21-22):2702-2712.
- Späth EJA, Guglielmone AA; Signorini AR, Mangold AJ.** (1994). Estimación de las pérdidas económicas directas producidas por la garrapata *Boophilus microplus* y las enfermedades asociadas en la Argentina. *Terrizo.* Vol.23.Nº 116 – Agosto
- Sperry JF, Robertson DC.** (1975). Erythritol catabolism by *Brucella abortus*. *J Bacteriol* 121(2):619-630.
- Splitter G, Oliveira S, Carey M, Miller C, Ko J, Covert J.** (1996). T lymphocyte mediated protection against facultative intracellular bacteria. *Vet Immunol Immunopathol.* 54(1-4):309-319.
- Suarez CE, Palmer GH, Hötzel I, McElwain TF.** (1998). Structure, sequence, and transcriptional analysis of the *Babesia bovis* rap-1 multigene locus. *Mol Biochem Parasitol.* 93(2):215-224.
- Suarez CE, McElwain TF, Echaide I, Torioni de Echaide S, Palmer GH.** (1994). Interstrain conservation of Babesial RAP-1 surface-exposed B-cell epitopes despite rap-1 genomic polymorphism, *Infection and immunity.* 62:3576-3579.

**Thacker TC, Palmer MV, Waters WR.** (2007). Associations between cytokine gene expression and pathology in *Mycobacterium bovis* infected cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 119(3-4):204-213. Epub 2007 Jun 2.

**Tibor A, Wansard V, Bielartz V, Delrue RM, Danese I, Michel P, Walravens K, Godfroid J, Letesson JJ.** (2002). Effect of *omp10* or *omp19* deletion on *Brucella abortus* outer membrane properties and virulence in mice. *Infect Immun.* 70(10):5540-5546.

**Tibor A, Decelle B, Letesson JJ.** (1999). Outer membrane proteins Omp10, Omp16, and Omp19 of *Brucella* spp. are lipoproteins. *Infect Immun.* 67(9):4960-4962.

**Tibor A., Saman E., de Wergifosse P., Cloeckert A., Limet J.N., Letesson J.J.** (1996). Molecular characterization, occurrence, and immunogenicity in infected sheep and cattle of two minor outer membrane proteins of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 64:100-107.

**Timms P, Stewart NP, De Vos AJ.** (1990). Study of virulence and vector transmission of *Babesia bovis* by use of cloned parasite lines. *Infect Immun.* 58(7):2171-2176.

**Torres PM.** (2009). Situación de la tuberculosis bovina en la República Argentina. *En* [http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File1013-situacion\\_tuberculosis\\_31\\_12\\_09.pdf](http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File1013-situacion_tuberculosis_31_12_09.pdf)

**Toth TE, Cobb JA, Boyle SM, Roop RM, Schurig GG.** (1995). Selective humoral immune response of Balb/C mice to *Brucella abortus* proteins expressed by vaccinia virus recombinants. *Vet Microbiol.* 45(2-3):171-183.

**Ugalde JE, Comerci DJ, Leguizamón MS, Ugalde RA.** (2003). Evaluation of *Brucella abortus* phosphoglucomutase (pgm) mutant as a new live rough-phenotype vaccine. *Infect Immun.* 71(11):6264-6269.

**Ugalde J.E., Czibener C., Feldman M.F., Ugalde R.A.** (2000). Identification and characterization of the *Brucella abortus* phosphoglucomutase gene: role of lipopolysaccharide in virulence and intracellular multiplication. *Infect Immun.* 68:5716-5723.

**Velikovskiy CA, Cassataro J, Giambartolomei GH, Goldbaum FA, Estein S, Bowden RA, Bruno L, Fossati CA, Spitz M.** (2002). A DNA vaccine encoding lumazine synthase from *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infect Immun.* 70(5):2507-2511.

**Vemulapalli R, Sanakkayala N, Gulani J, Schurig GG, Boyle SM, Lindsay DS, Sriranganathan N.** (2007). Reduced cerebral infection of *Neospora caninum* in BALB/c mice vaccinated with recombinant *Brucella abortus* RB51 strains expressing *N. caninum* SRS2 and GRA7 proteins. *Vet Parasitol.* 148(3-4):219-230. Epub 2007 Jul 24.

**Vemulapalli R, Cravero S, Calvert CL, Toth TE, Sriranganathan N, Boyle SM, Rossetti OL, Schurig GG.** (2000a). Characterization of specific immune responses of mice inoculated with recombinant vaccinia virus expressing an 18-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7:114-118.

**Vemulapalli R, He Y, Buccolo LS, Boyle SM, Sriranganathan N, Schurig GG.** (2000b). Complementation of *Brucella abortus* RB51 with a functional *wboA* gene results in O-antigen synthesis and enhanced vaccine efficacy but no change in rough phenotype and attenuation. *Infect Immun.* 68(7):3927-3932.

**Vemulapalli R, He Y, Boyle SM, Sriranganathan N, Schurig GG.** (2000c). *Brucella abortus* strain RB51 as a vector for heterologous protein expression and induction of specific Th1 type immune responses. *Infect Immun.* 68(6):3290-3296.

**Vergier JM, Grimont F, Grimont PA, Grayon M.** (1985). *Brucella*: a monoespecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int J Syst Bacteriol* 35:292-295.

**Villarreal-Ramos B, Reed S, McAulay M, Prentice H, Coffey T, Charleston BC, Howard CJ.** (2006). Influence of the nature of the antigen on the boosting of responses to mycobacteria in *M. bovis*-BCG vaccinated cattle. *Vaccine.* 24(47-48):6850-6858. Epub 2006 Jul 5.

**Vordermeier HM, Villarreal-Ramos B, Cockle PJ, McAulay M, Rhodes SG, Thacker T, Gilbert SC, McShane H, Hill AV, Xing Z, Hewinson RG.** (2009). Viral booster vaccines improve *Mycobacterium bovis* BCG-induced protection against bovine tuberculosis. *Infect Immun.* 77(8):3364-3373. Epub 2009 Jun 1.

**Watarai M, Kim S, Erdenebaatar J, Makino S, Horiuchi M, Shirahata T, Sakaguchi S, Katamine S.** (2003). Cellular prion protein promotes *Brucella* infection into macrophages. *J Exp Med.* 198(1):5-17.

**Wedlock DN, Denis M, Painter GF, Ainge GD, Vordermeier HM, Hewinson RG, Buddle BM.** (2008). Enhanced protection against bovine tuberculosis after coadministration of *Mycobacterium bovis* BCG with a Mycobacterial protein vaccine-adjuvant combination but not after coadministration of adjuvant alone. *Clin Vaccine Immunol.* 15(5):765-772. Epub 2008 Mar 12.

**Wedlock DN, Skinner MA, de Lisle GW, Vordermeier HM, Hewinson RG, Hecker R, van Drunen Littel-van den Hurk S, Babiuk LA, Buddle BM.** (2005). Vaccination of cattle with *Mycobacterium bovis* culture filtrate proteins and CpG oligodeoxynucleotides induces protection against bovine tuberculosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 106(1-2):53-63.

**Wiker HG.** (2009). MPB70 and MPB83--major antigens of *Mycobacterium bovis*. *Scand J Immunol.* 69(6):492-499. Review.

**Wiker HG, Nagai S, Hewinson RG, Russell WP, Harboe M.** (1996). Heterogenous expression of the related MPB70 and MPB83 proteins distinguish various substrains of *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Scand J Immunol.* 43(4):374-380.

**World Health Organization (WHO).** (1997). Report of the WHO Working Group meeting on Brucellosis control and research: The development of new/improved Brucellosis vaccines. *En* <http://www.who.int/emc>.



**Wright IG, Casu R, Commins MA, Dalrymple BP, Gale KR, Goodger BV, Riddles PW, Waltisbuhl DJ, Abetz I, Berrie DA.** (1992). The development of a recombinant *Babesia* vaccine. *Vet Parasitol.* 44(1-2):3-13. Review.

**Wu C, Ferrante J, Gatley MK, Magram J.** (1997). Characterization of IL-12 receptor beta1 chain (IL-12Rbeta1)-deficient mice: IL-12Rbeta1 is an essential component of the functional mouse IL-12 receptor. *J Immunol.* 159(4):1658-1665.

**Wykoff III J.** (2002). Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.* 90:395-415.

**Xiang SD, Selomulya C, Ho J, Apostolopoulos V, Plebanski M.** (2010). Delivery of DNA vaccines: an overview on the use of biodegradable polymeric and magnetic nanoparticles. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2(3):205-218. Review.

**Yang X, Thornburg T, Walters N, Pascual DW.** (2010). DeltaznuADeltapurE *Brucella abortus* 2308 mutant as a live vaccine candidate. *Vaccine.* 28(4):1069-1074. Epub 2009 Nov 13.

**Yang X, Becker T, Walters N, Pascual DW.** (2006). Deletion of *znuA* virulence factor attenuates *Brucella abortus* and confers protection against wild-type challenge. *Infect Immun.* 74(7):3874-3879.

**Zaitseva M, Golding H, Manischewitz J, Webb D, Golding B.** (1996). *Brucella abortus* as a potential vaccine candidate: induction of interleukin-12 secretion and enhanced B7.1 and B7.2 and intercellular adhesion molecule 1 surface expression in elutriated human monocytes stimulated by heat-inactivated *B. abortus*. *Infect Immun.* 64(8):3109-3117.

**Zanotto C, Pozzi E, Pacchioni S, Volonté L, De Giuli Morghen C, Radaelli A.** (2010). Canarypox and fowlpox viruses as recombinant vaccine vectors: a biological and immunological comparison. *Antiviral Res.* 88(1):53-63. Epub 2010 Jul 17.

**Zhan Y, Kelso A, Cheers C.** (1995). Differential activation of *Brucella*-reactive CD4+ T cells by *Brucella* infection or immunization with antigenic extracts. *Infect Immun.* 63(3):969-975.

**Zhan Y, Cheers C.** (1993). Endogenous gamma interferon mediates resistance to *Brucella abortus* infection. *Infect Immun.* 61(11):4899-4901.

**Zheng C, Xie P, Chen Y.** (2002). Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG producing the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* FCC-1/HN strain induces strong immune responses in BALB/c mice. *Parasitol Int.* 51(1):1-7.

**Zwerdling A, Delpino MV, Pasquevich KA, Barrionuevo P, Cassataro J, García Samartino C, Giambartolomei GH.** (2009). *Brucella abortus* activates human neutrophils. *Microbes Infect.* 11(6-7):689-697. Epub 2009 Apr 17.

**Zwerdling A, Delpino MV, Barrionuevo P, Cassataro J, Pasquevich KA, García Samartino C, Fossati CA, Giambartolomei GH.** (2008). *Brucella* lipoproteins mimic dendritic cell maturation induced by *Brucella abortus*. *Microbes Infect.* 10(12-13):1346-1354.

# Anexo I

## 1. Secuencias de genes y proteínas de *B. abortus*:

### 1.1. Secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de los genes *omp19* y *bp26* y de las proteínas OMP19 y BP26:

Las secuencias de los genes *omp19* y *bp26* se encuentran depositadas en el banco de datos GenBank del sitio NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), con los números de acceso Z54148 para *bp26* y BAU29211 para *omp19*. A continuación se transcriben las secuencias nucleotídicas para simplificar el análisis de los resultados. En rojo se señalan las secuencias correspondientes a los péptidos señal, en azul el resto de la secuencia codificante y en negro las regiones adyacentes secuenciadas a partir de los insertos de los fagos recombinantes de la biblioteca genómica de *B. abortus* S19. Además, en la secuencia del gen *bp26* se señala en naranja la región del gen que se encuentra deletada en el plásmido pK26L. Se encuentran señalados, por subrayado, los sitios de restricción que luego serán utilizados para la obtención de las cepas recombinantes y, por subrayado doble, los sitios de pegado de los oligonucleótidos.

En la secuencia de *omp19*, se resalta en negrita la secuencia codificante correspondiente al consenso de precursores de lipoproteínas bacterianas.

Las secuencias aminoacídicas están indicadas con los mismos patrones de color: rojo corresponde al péptido señal. Subrayado en rojo se indica el tetrapéptido que muestra una gran similitud con estas secuencias consenso de lipidación. Se recuadra la cisteína (C) que corresponde al sitio de acilación. La secuencia aminoacídica subrayada en azul corresponde a los primeros aminoácidos para la fusión con MPB83 y RAP1.

#### 1.1.1. Secuencia de *omp 19* :

```
1 gatctgggtt ccgagcccgt tcatcctggc gaaggtctgcc tttgtggcca taactaacgt
61 ggttccattc ttcctgcggc tttggctatc aagcctgaca atgagggctc atatggcggg
      pomp19f
121 aaagcccgca aattgccagt acccgcgcgc gattgcaaaa cttgcagtgc agtcatgcmc
181 ccagaacaaa cgccaatatc ggggaaactg tggccttgct gtgccagttt cagaattatc
241 aggtgggttc aagcattctt gaagggcttt ggaggcagaa atgaaagggtg ctgggtgttc
301 ttttttaacc atatagccat tttatcggtc caatAtatca tattgcatgg cttcggcatg
      M
361 ggaatttcaa aagcaagtct gtcagcctc gcggcggctg gcattgtcct ggccgggtgc
      G I S K A S L L S L A A A G I V L A G C
421 cgagactccc ggcttggtaa tctcgataat gtttcgctc cgccgcgcgc tgcaccggtc
      Q S S R L G N L D N V S P P P P P A P V
481 aatgctgttc cggcaggcac ggtgcagaaa ggcaatcttg attctcccac caattcccca
      pomp19r
      N A V P A G T V Q K G N L D S P T Q F P
541 atgcgcctc cacggatatg agcgcgcaat ccggcacaca ggtcgcaagc ctgccgcctg
      N A P S T D M S A Q S G T Q V A S L P P
601 catccgcacc ggacctgacg cccggcgccg tggctggcgt ctggaacgcc tcgcttggtg
      A S A P D L T P G A V A G V W N A S L G
661 gtcagagctg caagatcgcg acgccgcaga ccaaatatgg ccagggctat cgcgaggcc
      G Q S C K I A T P Q T K Y G Q G Y R A G
721 cgctgcgctg ccccggtgaa ctggctaatc ttgcctcctg ggccgtcaat ggcaagcaac
      P L R C P G E L A N L A S W A V N G K Q
781 tcgtccttta cgatgcgaac ggcggtagcg ttgcctcgct ctattcttca ggacagggcc
      L V L Y D A N G G T V A S L Y S S G Q G
841 gcttcgatgg ccagaccacc ggcgggcagg ccgtgacgct gtcgcgctga cagggcgcct
901 tcgatggcca gaccaccgac gggcaggccg tgactgtcgc cgctgatctg acccggaaac
961 gatgaagagg gcggagcttc ttcgggcagc tccgccgaat ttaaggcgc accgcgaatg
1021 atttcggcag atgcgcatca gtccaaggtt tcaactggaac ctctcatgtc ttttgatggc
1081 aatctgaaag ccttccttc cgtccgcgaa cgttatgaag ccatgg
```

## 1.1.2. Secuencia de *bp26* (Z54148)

1 atctcaaatc aacaactcct tgcataaaaag gagacttaag aacacaatga tttcaagaca  
 61 aagcccctga cataaaccgc tttgtccaaa tttttcaact tttcctgtag gagattttat  
 121 gaacactcgt gctagcaatt ttctcgcagc ctcattttcc acaatcatgc tcgtcggcgc  
 N T R A S N F L A A S F S T I M L V G A  
 181 tttcagcctg cccgctttcg cacaggagaa tcagatgacg acgcagcccg cgcgcatcgc  
 BssHII  
 F S L P A F A Q E N Q M T T / Q P A // R I A  
 241 cgtcaccggg gaaggcatga tgacccccctc gcccgatatg gccattctca atctctcggg  
 V T G E G N N P T S P D M A I L N L S V  
 301 gctacgccag gcaaagaccg cgcgcggaagc catgaccgcg aataataatg aagccatgac  
 L R Q A K T A R E A M A T N N N E A M T  
 361 cgcaataaat gaagccatga gaaaagtgcg cgatgccatg aagaaggccc gcatcgaaga  
 A N N E A M R K V L D A M K K A G I E D  
 421 tcgcatctc cagacaggcg gcatcgatat ccagccgatt tatgtctatc ctgacgacaa  
 R D L Q T G G I D I Q P I Y V Y P D D K  
 481 gaacaacctg aaagagccta ccatcaccgg ctattctgta tccaccagtc tcacggttcg  
 N N L K E P T I T G Y S V S T S L T V R  
 541 cgtgcgcgaa ctggccaatg ttggaaaaat tttgcatgaa tccgtcacgc tcgggtgtaa  
 V R E L A N V G K I L D E S V T L G V N  
 601 tcagggcggt gatttcaacc tggatcaatga taatccctcc gccgtgatca cgaggggcaa  
 Q G Q D L N L V L N D N P S A V I T R G  
 661 gcgcgcagtg gccaatgcca ttgccaagcc gaagacgctt gccgacgctg caggcgtggg  
 K R A V A N A I A K P K T L A D A A G V  
 721 gcttggccgt gtggtggaaa tcagtgaact gagccgcccg cccatgccga tgccgatgcc  
 G L G R V V E I S E L S R P M P M P M P  
 781 aattgcgcg ggacagttca gaaccatgct agcagccgca cggacaatt cctgcccgat  
 BssHII  
 I A R G Q F R T M L A A A P D N S V P I  
 841 tgccgcaggc gaaaacagct ataacgtatc ggtcaatgct gtttttgaag tcaagtaaat  
 A A G E N S Y N V S V N V V F E I K  
 901 agagccgggg tatgacgccc tttgccacct gatacaaac gccggcctgg tttcacaggc  
 961 gtttttttga ttagaggcgt ttcgatctga ttgaatccga tcggcgtct aatcctttgt  
 1021 tttgacgcgc atcttttccg aaaaccgttt cacacttttc ggatgcggtc tagcggatga  
 1081 tcggaaaaccg cgcgcaaatg tcacgctcgt cggacgacat ggcggaacc acgcacggta

**1.2. Secuencias nucleotídicas y aminoacídicas del gen *rap1* (AAXT01000002 región: 1305362.1307059) y de la proteína RAP 1 de *Babesia bovis***

En rojo se señalan las secuencias (aminoacídicas y nucleotídicas) correspondientes al péptido señal, en azul el resto de las secuencias. Los sitios de pegado de los oligonucleótidos se encuentran señalados por subrayado doble.

1 atgagaatca ttagcggcgt tgtcggttgc cttttcttgg tgttttcaca ccatgtgtct  
prapf  
M R I I S G V V G C L F L V F S H H V S

61 gcttttcgcc acaatcagag agtaggaagt ctcgcctccag ctgaagtggg aggtgattta  
p26rapstf/ p19rapstf  
A F R H N Q R V G S L A P A E V V G D L

121 acctccacat tggaaacagc tgatactttg atgactctcc gtgaccacat gcacaacatt  
T S T L E T A D T L M T L R D H M H N I

181 actaaggata tgaaacatgt tttgagcaat ggccgtgagc agattgtaaa tgatgtttgc  
T K D M K H V L S N G R E Q I V N D V C

241 tctaatagctc ctgaggactc caactgtcgt gaggtagtta acaattatgc tgaccgtttg  
S N A P E D S N C R E V V N N Y A D R C

301 gaaatgtacg gatgctttac gattgacaat gtcaaatac cgttgtatca agagtaccaa  
E M Y G C F T I D N V K Y P L Y Q E Y Q

361 cctctatctc ttccaaaccc ttaccagttg gatgctgctg tcagattgtt caaagagagt  
P L S L P N P Y Q L D A A F R L F K E S

421 gcatccaatc ctgctaagaa cagcgtaaaa cgcgaatggg tgcgtttcag aaatggagcg  
A S N P A K N S V K R E W L R F R N G A

481 aaccatgggtg attaccacta cttcgtcact ggtctgttga acaacaatgt tgtgcacgag  
N H G D Y H Y F V T G L L N N N V V H G

541 gaaggaacta cggatgttga atatcctgtc aacaaggtac tctatatggc taccatgaac  
E G T T D V E Y L V N K V L Y M A T M N

601 tacaagactt atttgacagt aaacagtatg aacgccaagt ttttcaacag attcagcttc  
Y K T Y L T V N S M N A K F F N R F S F

661 actacaaaga tattcagccg tcgtattagg caaacattga gtgatatcat caggtggaat  
T T K I F S R R I R Q T L S D I I R W N

721 gttcctgaag attttgaaga aaggagcatc gaacgtatca ctcaacttac tagcagctac  
V P E D F E E R S I E R I T Q L T S S Y

781 gaagattaca tgttgacca gattccaact ctttccaagt ttgcacgtcg ttatgctgac  
E D Y M L T Q I P T L S K F A R R Y A D

841 atgggtgaaga aggttctgct cggtagcttg acctcgtacg ttgaagctcc ttggtacaaa  
M V K K V L L G S L T S Y V E A P W Y K

901 agatggataa agaaattcac agactttttc tctaaaacg ttaccaacc tacaagaag  
R W I K K F R D F F S K N V T Q P T K K

961 ttcacgaggg atactaacga agttacaaa aactatctga aagccaatgt tgctgagccc  
F I E D T N E V T K N Y L K A N V A E P

1021 actaaaaagt ttatgcagga cactcacgaa aaaaccaaag gctatctgaa agagaatgta  
T K K F M Q D T H E K T K G Y L K E N V

1081 gccgaaccta ctaagacttt tttcaaggag gctcctcaag tcaccaaca cttcttcgat  
A E P T K T F F K E A P Q V T K H F F D

1141 gagaacattg gccaacccac caaggagttt ttcagggag ctccccagc cactaacat  
E N I G Q P T K E F F R E A P Q A T K H

1201 ttcctagacg aaaacatcgg tcaaccaacc aaggagttct tcagggaggc tccccagtc  
F L D E N I G Q P T K E F F R E A P Q V

1261 actaagcact tcttagacga gaatattgct caacctacta aagaattttt cagggatgct  
T K H F L D E N I A Q P T K E F F R D V

1321 cctcaagtca ccaagaaggt tataactgag aacattgctc aaccaactaa ggaattcctt  
P Q V T K K V I T E N I A Q P T K E F L

1381 aaggaggttc ctcatactac catgaaagtc ttgaatgaaa acattgctca acctgccaag  
K E V P H T T M K V L N E N I A Q P A K

1441 gaaatcatac atgagtttgg tactggcgcc aagaatttca tttccgcagc ccatgaaggt  
E I I H E F G T G A K N F I S A A H E G

1501 actaagcagt tcttaaacga aactgttggc caacctacaa aggaattcct gaacggagct

T K Q F L N E T V G Q P T K E F L N G A  
1561 ctagaaacta ctaaagacgc attacacat ctgggtaaat catcagacga agccaacatt  
L E T T K D A L H H L G K S S E E A N I  
1621 tatgatgcct cggaaaatac cactcagtct aacgactcaa ctacttcaa cggatgaagac  
Y D A S E N T T Q S N D S T T S N G E D  
1681 accgcccggat acctctgatg agatgcgttt ataatggca  
prapr/p26rapstr/p19rapstr  
T A G Y L

### 1.3. Secuencias nucleotídicas (ENA|D64165|D64165) y aminoacídicas del gen *mpb83* de *Mycobacterium bovis* MPB83 (LIPOPROTEIN P23)

En rojo se señalan las secuencias (aminoacídicas y nucleotídicas) correspondientes al péptido señal, en azul el resto de las secuencias y en negro las secuencias nucleotídicas adyacentes al gen. Los sitios de pegado de los oligonucleótidos se encuentran señalados por subrayado doble. En la secuencia aminoacídica se indica en un recuadro el sitio de glicosilación putativo “TT” (Michell y col., 2003).

```

1  cgcggcacc cgcagccatgc gacttcggcc tggcgagcgc cactggatgg cctttcggca
61  gtttagcgtcc gatggtgatg cgaacggcaa cgacattgcg gacgcgcacc tggccgccta
121 cgcgctagag aacaacgcaa cctggttag cgccgaccgc ggctttgccc gtttccgctc
181 actgcgctgg cgatcatccgt tggacggtca gacccatcta taaccggccc cactccgaat
241 cactggtgtc caccaggag gacggcgttc aacgccgccc gcagaagcaa aggaatcgaa
301  gcgatgatca acgttcaggc caaacggccc gcagcagcga gcctcgcagc catcgcgatt
      p1983f/p2683
      M I N V Q A K P A A A A S L A A I A I
361  gcgttcttag cggggtggtc gagcaccaaa cccgtgtcgc aagacaccag cccgaaaccg
      A F L A G C S S T K P V S Q D T S P K P
421  gcgaccagcc cggcgggcgc cgttaccacg gcggaatgg ctgaccccgc agcggacctg
      A T S P A A P V T T A A M A D P A A D L
481  attggtcgtg ggtgcgcgca atacgcggcg caaaatccca ccggtcccgg atcgggtggc
      I G R G C A Q Y A A Q N P T G P G S V A
521  ggaatggcgc aagaccgggt cgctaccgcg gcttccaaca acccgatgct cagtaccctg
      G M A Q D P V A T A A S N N P M L S T L
601  acctcggtc tgctcgggcaa gctgaaccgg gatgtgaatc tggtcgacac cctcaacggc
      T S A L S G K L N P D V N L V D T L N G
661  ggcgagtaca ccgttttcgc cccaccaaac gccgcattcg acaagctgcc ggcggccact
      G E Y T V F A P T N A A F D K L P A A T
721  atcgatcaac tcaagactga cgccaaactg ctcagcagca tcctgaccta ccacgtgata
      I D Q L K T D A K L L S S I L T Y H V I
781  gccggccagg cgagtccgag caggatcgac ggcacccatc agaccctgca aggtgccgac
      A G Q A S P S R I D G T H Q T L Q G A D
821  ctgacgggtga taggcgcccg cgacgacctc atggtcaaca acgccggttt ggtatgtggc
      L T V I G A R D D L M V N N A G L V C G
901  ggagttcaca ccgccaacgc gacggtgtac atgatcgata cggtgctgat gccccggca
      G V H T A N A T V Y M I D T V L M P P A
961  cagtaacggtt cggcgcggtc aaggcgaggc agccc gtgta ggcggtttgc ctca
      Q p2683r/p1983r

```

# Anexo II





Original article

## Expression of *Babesia bovis* rho-try-associated protein 1 (RAP1) in *Brucella abortus* S19

Julia V. Sabio y García<sup>a</sup>, Marisa Farber<sup>a</sup>, Mariela Carrica<sup>a</sup>,  
Silvio Cravero<sup>a</sup>, Gilson C. Macedo<sup>b</sup>, Fabiana Bigi<sup>a</sup>, Sergio C. Oliveira<sup>b</sup>,  
Oswaldo Rossetti<sup>a</sup>, Eleonora Campos<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA-Castelar, Las Cabañas y Los Reseros s/n (B1712WAA) Castelar, Buenos Aires, Argentina

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Av. Antônio Carlos, 6627, Bloco K4-163, Pampulha, Cx. Postal 486, 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

Received 4 October 2007; accepted 14 February 2008

Available online 23 February 2008

### Abstract

*Brucella abortus* strain 19 (live vaccine) induces a strong humoral and cellular immune response and therefore, it is an attractive vector for the delivery of heterologous antigens. The objective of the present study was to express the rho-try-associated protein (RAP1) of *Babesia bovis* in *B. abortus* S19, as a model for heterologous expression of immunostimulatory antigens from veterinary pathogens. A plasmid for the expression of recombinant proteins fused to the aminoterminal of the outer membrane lipoprotein OMP19 was created, pursuing the objective of increasing the immunogenicity of the recombinant antigen being expressed by its association to a lipid moiety. Recombinant strains of *B. abortus* S19 expressing RAP1 as a fusion protein either with the first aminoacids of  $\beta$ -galactosidase (S19pBB-RAP1) or *B. abortus* OMP19 (S19pBB19-RAP1) were generated. Plasmid stability and the immunogenicity of the heterologous proteins were analyzed. Mice immunized with S19pBB-RAP1 or S19pBB19-RAP1 developed specific humoral immune response to RAP1, IgG2a being the predominant antibody isotype. Furthermore, a specific cellular immune response to recombinant RAP1 was elicited in vitro by lymphocytes from mice immunized with both strains. Therefore, we concluded that *B. abortus* S19 expressing RAP1 is immunostimulatory and may provide the basis for combined heterologous vaccines for babesiosis and brucellosis.

© 2008 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: *Brucella abortus* S19; *Babesia bovis*; RAP1

### 1. Introduction

*Babesia* species are intra-erythrocytic, tick-transmitted apicomplexan parasites that infect a wide variety of vertebrate hosts and cause severe diseases in wild and domestic animals. Bovine babesiosis is commonly caused by *Babesia bovis* or *Babesia bigemina*. Three-quarters of the world's cattle

population live in *Babesia* enzootic regions, subtropical and tropical areas, where the disease causes significant economic losses. Babesiosis is characterized by fever, hemolytic anemia and anorexia. Particularly, *B. bovis* causes the most severe cases of bovine babesiosis, and due to the sequestration of infected red blood cells in the microvasculature of the brain, neurological signs also result. The animals that survive the acute phase become persistently infected and are resistant to developing clinical disease upon reinfection with a homologous strain [1]. Among the few *B. bovis* antigens that have been characterized, the rho-try-associated protein, RAP1, is considered a good candidate for vaccine development. RAP1 of *B. bovis* is a 60-kDa protein localized to the apical surface and within the rho-tries of merozoites [2]. RAP1 has

\* Corresponding author. Tel.: +55 41 3316 3242; fax: +55 41 3316 3230.

E-mail addresses: ecampos@tepar.br, eleonoracampos@yahoo.com (E. Campos).

<sup>1</sup> Present address: Instituto de Biología Molecular do Paraná (IBMP), Rua Prof. Algaeyr Munhoz Maeder 3775 (Tecpar), CIC, 81350-010 Curitiba, PR, Brazil.



T-helper-lymphocyte epitopes in the aminoterminal region and B-cell epitopes in both the amino and carboxyterminal regions. Immunization of cattle with recombinant RAP1 was shown to significantly reduce parasitemia upon subsequent infection [3]. Recently, this antigen was expressed in the BCG strain of mycobacteria and the recombinant strain elicited both humoral and cellular responses against RAP1 in mice, demonstrating the promising aspect of this antigen [4]. Nevertheless, although BCG serves as a good model to study the immunogenicity of the antigen, this strain cannot be used to vaccinate bovines because the immune response it elicits interferes with diagnostic testing.

*Brucella abortus* is a facultative intracellular pathogen which causes brucellosis, a major zoonosis, in several countries. Brucellosis causes abortion and infertility in cattle and a clinical manifestation known as undulant fever in humans [5]. The vaccines used for control for bovine brucellosis are attenuated *B. abortus* S19 (smooth strain) and RB51 (rough strain) [6]. Both strains induce a strong Th1 response and generate cell-mediated immunity (CMI), while S19 also induces a strong humoral response against surface antigens, particularly O antigen [7]. S19 vaccine has been widely used for more than 50 years and the immune response it elicits, both in animal models as well as in the natural host, has been extensively studied.

Expression of antigens from diverse pathogens has been evaluated in *B. abortus* RB51 rough strain, with the aim of increasing its immunogenicity [8,9]. Also, a repetitive antigen of *Trypanosoma cruzi* was expressed in the periplasm of *B. abortus* S19 aiming to tag the vaccine strain and therefore provide an additional means to differentiate vaccinated animals from infected animals [10]. Taken together, these features form a strong basis for using *B. abortus* as a vaccine carrier to induce a Th1 biased immune response against specific antigens. The mechanism of protective immunity to *B. bovis* is thought to involve both CD4-T-helper1 lymphocytes and antibody responses [11]. Thus, *B. abortus* S19 could be an attractive alternative as a live carrier of *Babesia* immunoprotective antigens.

We developed a vector for expressing heterologous antigens in *B. abortus* associated to OMP19, an outer membrane lipoprotein [12,13], expecting the heterologous antigen to be associated to a lipid moiety in the *Brucella* membrane. In this way we generated recombinant *B. abortus* S19 strains expressing RAP1 antigen from *B. bovis*. This study highlights the use of *B. abortus* S19 as a vehicle for the expression and presentation of *B. bovis* antigens and supports further investigation on this strategy for the development of heterologous vaccines for the control of bovine babesiosis.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial culture conditions

*B. abortus* strain 19 was used from our strain collection. *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  and Top 10 were purchased from Invitrogen. *E. coli* was grown in either liquid or solid

Luria–Bertani (LB) medium containing appropriate antibiotics at the following concentrations: ampicillin (100  $\mu$ g/ml); kanamycin (50  $\mu$ g/ml). *Brucellae* were grown at 37 °C in trypticase soy broth (TSB) or tryptose agar (TA) (DIFCO), supplemented with antibiotics (kanamycin, 25  $\mu$ g/ml), when appropriate.

### 2.2. Plasmids

For the construction of pBB19, primers 5'gaattccattcttcctgcggcttt3' and 5'acgggtgcgaacattatcgagattacca3' were used to amplify a region corresponding to part of *omp19*, from the genomic DNA of *B. abortus* S19 (NC007618). Amplification conditions were 95 °C, 2 min, followed by 35 cycles of 95 °C, 1 min; 58 °C, 1 min and 72 °C. The amplified gene fragment was cloned into the pGEM-T Easy vector. Subsequently, the EcoRI insert was subcloned into pBBR1MCS2 [14] to obtain pBB19. In order to construct vectors for RAP1 expression in *B. abortus*, the *rap1* gene was amplified by PCR from the genomic DNA of *B. bovis* R1A extracted with a Puregene kit (Gentra, USA) from *B. bovis* R1A (AF030062), kindly provided by Dr. Ignacio Echaide (INTA-Rafaela, Argentina) [15]. Primers 5'aagcttagaatcattagcggc3' and 5'ctagagaggtatccggcgg3' were used, with HindIII restriction site incorporated into the forward primer and XbaI restriction site in the reverse primer to allow the directional cloning of the full length *rap1* into pBBR1MCS2. In order to subclone *rap1* without the sequence that encodes for its signal peptide into pBB19, primers: forward 5'ctgcaggcttcgccacaatcagagagt3' and reverse 5'ctgcagctctagagaggtatccggcgg3' were used. PstI sites (underlined) were incorporated into both primers. Amplification was performed at 95 °C, 2 min, followed by 35 cycles of 95 °C, 1 min; 58 °C, 1 min and 72 °C, 1.5 min. The amplified gene fragments were cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega) and then subcloned into HindIII-XbaI of pBBR1MCS2, or PstI of pBB19 to generate pBB-RAP1 or pBB19-RAP1, respectively. The recombinant plasmids were transformed into *E. coli* DH5 $\alpha$  cells and analyzed by sequencing to check for correct framing and orientation. Subsequently, the purified plasmids were used to electroporate *B. abortus* S19.

### 2.3. Transformation of *B. abortus* S19

Recombinant plasmids were electroporated into *B. abortus* S19 according to methods previously described [16]. Transformant colonies were confirmed by colony PCR using *rap1* specific oligonucleotides. Finally, total proteins from the kanamycin-resistant *B. abortus* S19 colonies (rS19) were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis followed by immunoblotting with monoclonal antibodies (Mab) specific for *B. bovis* RAP1 protein (Mab BABB75A4 kindly provided by Dr. Carlos Suarez, Animal Disease Research Unit, USDA Agricultural Research Service, Pullman, Washington). *B. abortus* S19 strains containing plasmids pBBR1MCS, pBB19, pBB-RAP1, pBB19-RAP1 were designated S19pBB, S19pBB19, S19pBB-RAP1, S19pBB19-RAP1, respectively.



**2.4. Subcellular fractioning of S19pBB-RAP1 and S19pBB19-RAP1**

Subcellular fractioning was performed as previously described [4]. The fractions were analyzed by Western blot using Mab BABB75A4.

**2.5. Mice immunization, obtaining of sera and splenocytes**

Female BALB/c mice of 12 weeks of age were used. They were raised in the animal house of the Instituto de Biotecnología (INTA), under appropriate conditions of temperature, water and feeding. Animals were inoculated intraperitoneally (i.p.) with  $1 \times 10^6$  colony forming units (CFUs) of the indicated strains or with purified recombinant RAP1 (rRAP1) (25 µg/ml in Freund's adjuvant, Sigma). Negative control mice were treated with saline alone (PBS). Mice were euthanized by cervical dislocation, bled by cardiac puncture (when requiring sera) and their spleens removed. For determining bacterial infection, spleens were weighed, homogenized in 5 ml of PBS and used for *Brucella* colony counting by serial dilution and plating on TA with or without the corresponding antibiotics. Colonies were examined after 3 days at 37 °C.

**2.6. Humoral immune response**

Antibody responses were monitored by ELISA and Western blot (WB). The presence of serum immunoglobulin G (IgG), IgG1, and IgG2a isotypes with specificity for RAP1 was determined by indirect ELISA as previously described [17]. Recombinant RAP1 (rRAP1) was obtained as detailed elsewhere [4] and used in a concentration of 5 µg/ml in carbonate buffer, pH 9.6, to coat the wells of polystyrene plates (100 µl/well; Nunc-Immuno plate, MaxiSorp surface). For Western blot (WB), membranes were probed with anti-RAP1 monoclonal antibody in a 1:200 dilution or mice sera in a 1:100 dilution. Alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse immunoglobulin G (Sigma) was used at a dilution of 1:2000. For detection, BCIP/NBT Color Development (Promega) was used.

**2.7. Cellular immune response**

Splenocytes were obtained by a previously described method [4]. The cells were incubated at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> in the presence of different antigens indicated in the text (1 or 5 µg of recombinant RAP1, 5 µg of *B. abortus* S19 crude extract, 0.5 µg of concanavalin A, or RPMI alone). After 72 h, the supernatant was collected and IFN-γ production was determined by ELISA using 0.1 µg of capture-purified anti-mouse IFN-γ (clone R4-6A2) (BD Pharmingen, San Diego, CA) and 0.05 µg of detection-biotinylated anti-mouse IFN-γ (BD Pharmingen) per well according to the manufacturer's instructions. The assays were performed in triplicate.

**2.8. Statistical analysis**

Spleen weight and counts of bacteria in the spleen were analyzed, due to the dispersion observed, by the non-parametric test of Kruskal–Wallis after which a multiple comparisons test was undertaken. The data for ELISA and IFN-γ production were subjected to analysis of variance, and the means were compared using Tukey's test.

**3. Results**

**3.1. RAP1 localizes in the membrane of B. abortus S19**

Expression vectors pBBRMCS2 [14] and pBB19 [this study] were used for expression of the *B. bovis rap1* gene in *B. abortus* S19 strain. Plasmid pBBRMCS2 (pBB) is a replicative vector that allowed cytoplasmic expression of the fusion protein to the aminoterminal portion of β-galactosidase. Based on pBB we developed plasmid pBB19 which is also a replicative vector containing both the promoter and the region that encodes for the aminoterminal portion of *B. abortus* OMP19, a membrane-associated lipoprotein. In this plasmid, a foreign gene can be cloned in frame with the signal peptide-coding nucleotide sequence of *omp19* to obtain a lipidated fusion protein that can be directed to the outer membrane. RAP1 was successfully expressed in S19 both as full length fusion to the first 36 aminoacids of β-galactosidase and as a truncated fusion, without its signal peptide, to the first 21 aminoacids of OMP19. Western blot analysis using anti-rRAP1 antibodies revealed reactive bands with apparent molecular masses of 66 kDa (β-galactosidase-RAP1) and 62.5 kDa (19-RAP1) in whole extracts of recombinant S19 strains (Fig. 1). In both cases, some degradation of RAP1 was observed. As a control, recombinant purified RAP1 (rRAP), expressed and purified from *E. coli*, was used. Although the expected molecular weight of rRAP is expected to be 66 kDa, it suffers extended degradation (Fig. 1, lane 4).

Subcellular fractioning of rS19 revealed that RAP1 was localized in association to the membrane fraction not only when expressed as a fusion protein to OMP19 (Fig. 2a) but

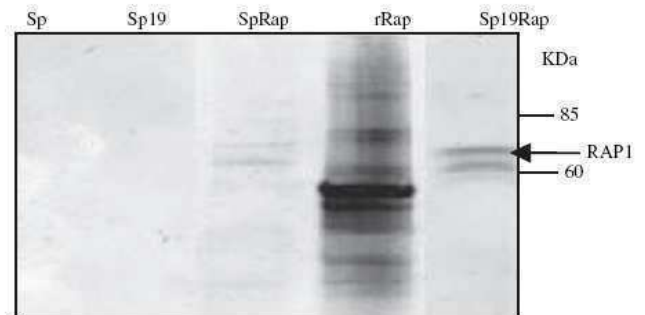


Fig. 1. Expression of RAP1 in *B. abortus* S19. Western blot of *B. abortus* S19 extracts using anti-RAP1 monoclonal antibody Mab BABB75A4 (dilution 1:200). Lanes: Sp: S19pBB, Sp19: S19pBB19, SpRAP: S19pBB-RAP1, rRAP: recombinant RAP expressed in *E. coli* and Sp19RAP: S19pBB19-RAP1. Molecular weight markers (in kDa) are shown on the right. RAP1 is indicated with an arrow. Note: rRAP (66 kDa) purified from *E. coli* presents a characteristic degradation pattern (lane 4).



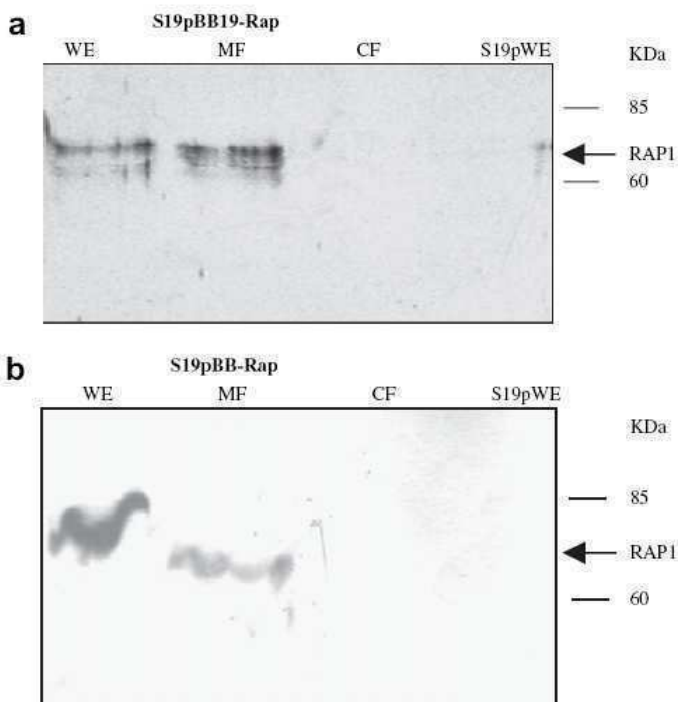


Fig. 2. Subcellular localization of rRAP1 expressed in S19. Subcellular fractions were separated by SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane. Western blotting was performed using Mab BAB75A4 at a dilution of 1:200. Panel (a): S19pBB19-RAP1. Panel (b): S19pBB-RAP1. References: WE: whole extract, MF: membrane fraction, ultracentrifugation pellet P150000, CF: cytoplasmic fraction, S150000 and S19pWE: S19pBB whole extract. Molecular weight markers (in kDa) are shown on the right. The expected bands are indicated with solid arrows.

also as a fusion protein to  $\beta$ -galactosidase (Fig. 2b), possibly due to RAP1 intrinsic properties and/or its own signal peptide. Similar results were recently reported for the expression of truncated RAP1 in *Mycobacterium bovis* [4], suggesting that RAP1 may have other signals that direct it to membrane localization. The purity of the membrane fractions was confirmed by the detection of OMP19 using anti-omp19 antisera and the absence of any bands using anti-L7/L12 antisera in additional Western blot assays (data not shown).

### 3.2. RAP1 does not affect infection characteristics of *B. abortus* S19 in the mice model

In order to evaluate the stability of the replicative vectors carrying *rap1* gene constructs, groups of five mice were infected with each strain and, at different time points, spleens were collected and bacteria recovered.

Vector stability was assessed by comparing the number of colony forming units (CFUs) recovered from mice spleen on solid media, supplemented or not supplemented with the selective antibiotic at 3 and 4 weeks post-infection (Fig. 3a). Although CFUs were lower in the presence of the antibiotic for the three strains, these differences were not statistically significant, indicating plasmid stability. Nevertheless it is noteworthy that we have found that pBB-RAP1 presented higher plasmid loss than pBB19-RAP, as indicated by fewer CFU counts of S19pBB-RAP1 on the solid medium supplemented with the

corresponding antibiotic (TAK) than without the antibiotic (TA). Whether this could be an indication that pBB19-RAP may be a more stable candidate under different assay conditions needs to be further investigated. When these strains were grown in liquid culture, no difference was observed (data not shown).

There were also no statistically significant differences in the CFUs of S19pBB, S19pBB-RAP1 or S19pBB19-RAP1 recovered from mice spleen when the three groups were compared to each other, indicating that the three strains retain equal colonization characteristics. Accordingly, no differences in the spleen weight of infected mice were observed in any group at each time point (Fig. 3b), suggesting that the expression of RAP1 in S19 did not alter the infection characteristics of S19 in the mouse model of infection.

Expression of RAP1 following passage *in vivo* was confirmed by PAGE followed by Western blot of whole protein extracts of rS19 colonies recovered from the spleen of immunized mice at all time points (data not shown).

### 3.3. *B. abortus* 19 strains expressing RAP1 induce a specific cellular and humoral immune response to RAP1 in BALB/c mice

The next question was whether the heterologous protein expressed by the transformed *B. abortus* was able to generate an immune response in the course of an experimental infection in the mouse model. Groups of five mice were intraperitoneally infected with S19pBB, S19pBB-RAP1 and S19pBB19-RAP1. As control, another group of mice was injected with saline solution (PBS). In order to study specific cellular immune response stimulation, IFN- $\gamma$  production was measured. Splenocytes were collected from animals at 3 weeks post-inoculation and were stimulated for 72 h with purified RAP1 pretreated with polymyxin B, to reduce potential LPS contamination (Fig. 4). Splenocytes from mice infected with S19pBB-RAP1 and S19pBB19-RAP1 produced significantly higher levels of IFN- $\gamma$  compared to splenocytes from mice infected with S19pBB when stimulated with 5  $\mu$ g of rRAP1 ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively). Although there is an apparent higher production of IFN- $\gamma$  by splenocytes stimulated with rRAP1 in the S19pBB19-RAP1 group compared to the S19pBB-RAP1, this difference is not statistically significant. With lower concentrations of rRAP1 as antigen (1  $\mu$ g), only splenocytes from mice infected with S19pBB19-RAP1 showed a statistically significant difference compared to the control ( $P < 0.01$ ). Similar results were obtained in another independent experiment (data not shown). The level of IFN- $\gamma$  produced by ConA or heat-killed S19 stimulated splenocytes was high in all cases. No rRAP1 specific cellular immune responses were detected in the animals inoculated with PBS (data not shown).

Humoral immune response was examined by Western blot (Fig. 5) and indirect ELISA (Fig. 6). Sera from mice inoculated either with S19pBB-RAP1 or with S19pBB19-RAP1 recognized RAP1 when either rRAP1 (Fig. 5a, b) or *B. bovis* extract (Fig. 5c) was used as an antigen (extensive degradation was observed for rRAP1). Neither S19 nor PBS immunized mice produced a detectable level of antibodies, at least by

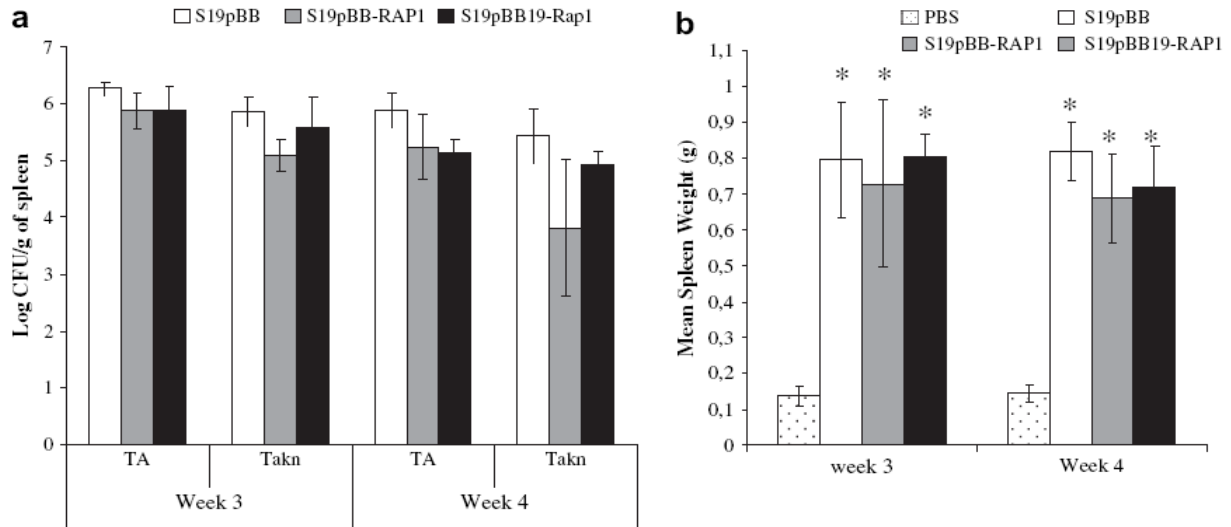


Fig. 3. Persistence of bacteria in spleen and spleen weights in inoculated mice. Numbers of bacteria in the spleen (a) and spleen weight (b) were measured at 3 and 4 weeks after vaccination. TA: tryptose agar, TaKn: tryptose agar supplemented with 25 µg/ml of kanamycin. Results are expressed as the means of five mice ± standard deviation (sd). In (b), groups with one asterisk were significantly different from the saline group ( $P < 0.001$ ).

Western blot analysis, against either source of RAP1. The subclass of antibodies that was being generated was determined by indirect ELISA, and showed a bias towards IgG2a (Fig. 6), suggesting the development of Th1 biased immune response. Altogether, these data confirm the induction of a specific humoral and cellular immune response against RAP1, using *B. abortus* S19 as a live carrier.

#### 4. Discussion

The most convenient and practical means to control bovine babesiosis is vaccination. The potential use of live recombinant bacteria as a platform for vaccine development is highly

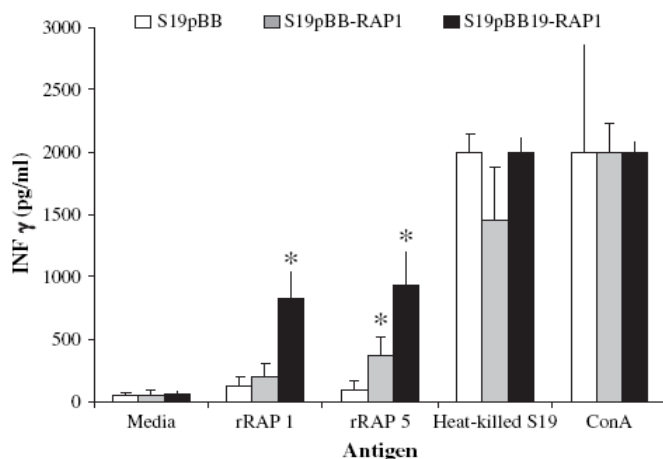


Fig. 4. Mice splenocytes IFN-γ production at 3 weeks post-infection. Bars represent groups of mice inoculated with: S19pBB (white bars), S19pBB-RAP1 (gray bars), S19pBB19-RAP1 (black bars). Antigens used: rRAP1 and rRAP5 stand for rRAP1 at a concentration of 1 and 5 µg/ml, respectively; Con A: concanavalin A; media: culture media; heat-killed S19: inactivated whole cell extract of *B. abortus* S19. Results are expressed as (pg/ml) and represent the means of five mice ± standard deviation (sd).

attractive. This strategy has been successful in inducing a robust immune response to antigens from different parasites [18,19]. In this work, we designed two different expression vectors carrying *B. bovis* antigen RAP1. We transformed strain S19 of *B. abortus* with these vectors and the RAP1 antigen was successfully expressed in both cases.

Regarding subcellular localization, RAP1 was localized associated to the membrane fraction, independently of the vector used. Taking into account that RAP1 is associated with the parasite membrane [20], it is possible that recombinant RAP1 molecule shows an intrinsic affinity for the cellular membrane. Having found RAP1 in the membrane fraction, even as a fusion to β-galactosidase without export signal, might constitute an evidence of protein native conformation, meaning that the intracellular expression driven by both vectors would allow proper folding of this protein. This aspect becomes more relevant since it has been recently demonstrated that immunization with recombinant RAP1 protein using adjuvants that induced strong IgG and Th1 responses in cattle was not sufficient to provide protection against challenge with a virulent strain of *B. bovis* [21]. The authors hypothesized that even though IgG responses were restimulated by challenge, structural differences in recombinant and native proteins may result in antibody responses against recombinant RAP1 incapable of neutralizing parasite infectivity. Whether RAP1 expressed in S19 presents adequate protein conformation remains to be further analyzed.

Stability of recombinant bacteria within the vaccinated host is a prerequisite for any potential live recombinant vaccine. There were no statistically significant differences between the CFUs of rS19 recovered from the spleen of mice on solid medium either with or without the selective antibiotic. However, we found that pBB-RAP, encoding RAP1 as a fusion to the aminoterminal of β-galactosidase, was lost more rapidly than pBB (base plasmid) or pBB19-RAP (plasmid encoding



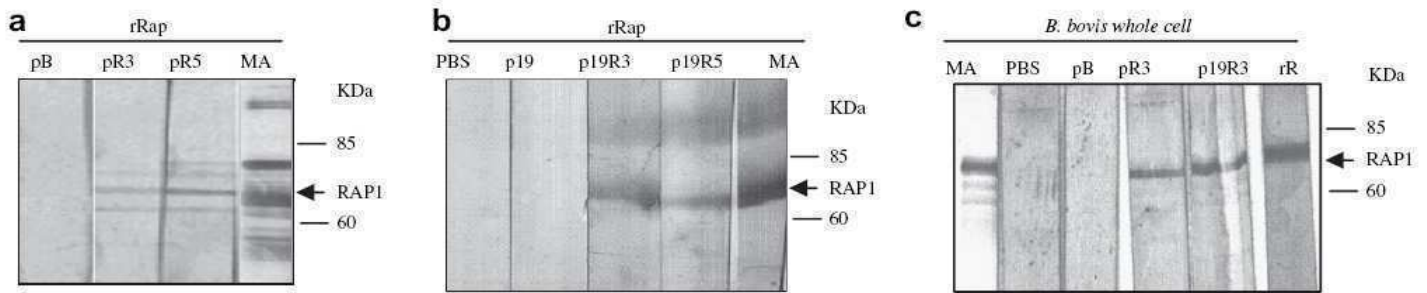


Fig. 5. Mice humoral immune response against rRAP1. Panel (a): detection of rRAP with sera from mice immunized with S19pBB-RAP1. Panel (b): detection of rRAP with sera from mice immunized with S19pBB19-RAP1. Panel (c): detection of RAP1 from *B. bovis* whole cell extract. References: pB: sera from mice immunized with S19pBB, PBS: sera from mice immunized with saline solution, pR3 and pR5: sera from mice immunized with S19pBB-RAP1, weeks 3 and 5 post-inoculation respectively, p19R3 and p19R5: sera from mice immunized with S19pBB19-RAP1, weeks 3 and 5 post-inoculation respectively, MA: anti-RAP1 monoclonal antibody MoBAB75A4 (antigen detection control), rR: sera from mice immunized with rRAP purified from *E. coli*. Molecular weight markers (in kDa) are shown on the right. The expected band is indicated with an arrow.

RAP1 as fusion to the aminoterminal of OMP19), suggesting that the fusion to OMP19 may result in a more stable plasmid. Importantly, rS19 colonies recovered from the intracellular environments were found to have maintained their ability to express RAP1 in all cases. We are now developing integrative plasmids expressing the fusion OMP19-RAP1 to avoid potential loss of recombinant vector in future in vivo assays.

The development of alternative vaccines for the control of bovine infections with *B. bovis* has been hampered by the absence of a convenient experimental animal model capable of reproducing *Babesia* infection in cattle. However, we decided to test our constructions in BALB/c mice as a first stage in rS19 based vaccine evaluation. In order to evaluate the ability of the recombinant bacteria to express the heterologous antigen and the immunogenicity of the heterologous protein expressed in *Brucellae*, immunization of BALB/c mice with S19pBB-RAP1 or S19pBB19-RAP1 was performed. Western

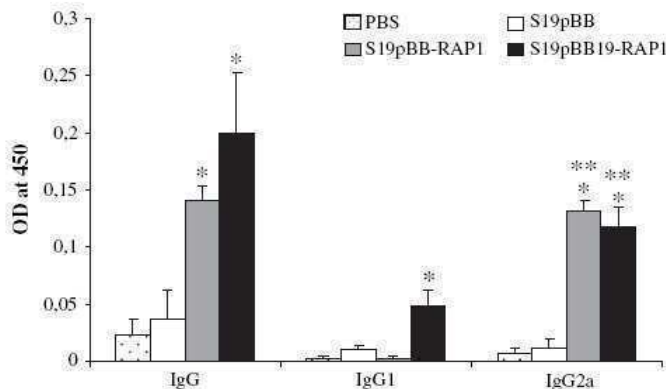


Fig. 6. ELISA detection of rRAP specific antibodies in mice serum and antibody subtype. Sera were collected from the mice of each group at 3 weeks post-inoculation (dilution 1:100). Each bar corresponds to the mean of absorbance at 450 nm of the color developed ( $n = 5$  mice); error bars indicate standard deviations. Groups: PBS (dotted), *B. abortus* S19pBB (white), *B. abortus* S19pBB-RAP (gray) or *B. abortus* S19pBB19-RAP (black). In all cases, the sera were tested against rRAP1. Groups with one asterisk were significantly different from the saline and S19pBB group ( $P < 0.05$ ). Groups with two asterisks were significantly different according to the subtype of IgG: IgG2a significantly higher than IgG1 ( $P < 0.01$ ).

blot analysis of sera demonstrated that both rS19 constructs were able to induce specific humoral immune responses towards rRAP1. In addition to inducing anti-RAP1 antibodies, both constructs expressing RAP1 were also able to stimulate mice splenocytes secretion of IFN- $\gamma$ , when stimulated with 5  $\mu\text{g}$  of recombinant protein. With a lower concentration of the antigen (1  $\mu\text{g}$ ), only splenocytes of mice inoculated with S19pBB19-RAP1 were able to stimulate the secretion of IFN- $\gamma$  ( $P < 0.01$ ). This may be due to the higher stability of RAP1 antigen when expressed as a fusion to OMP19, or to association to a lipid moiety, as OMP19 is a lipoprotein [12]. This issue still remains to be clarified.

The presence of IgG2a, but not IgG1, antibodies specific for RAP1 and *B. abortus* S19 antigens in the serum of inoculated mice suggests a preferential development of a Th1 biased immune response. However, it has been documented that immunization of calves with RAP1 and adjuvants that elicit strong Th1 cell and IgG responses was insufficient to protect calves against virulent *B. bovis* challenge [21]. On the other hand, it has been suggested that innate immune response may explain the age-related cattle resistance to *B. bovis* that prevents the pathological consequences of infection [22]. When pathogen-molecular patterns bind to mammalian Toll-like receptors (TLRs), they stimulate an innate immune response so that an adaptive immune response can arise. *B. abortus* LPS and its interaction with TLR4 are a well studied example of this kind of immune response activation [23,24]. It is therefore interesting to point out that both rS19 strains were able to colonize the murine host and to express recombinant RAP1 in vivo upon immunization. Whether this active colonization would lead to a difference respect of RAP1 subunit immunization in immune response or protection in calves, needs to be further investigated.

*B. abortus* S19 elicits both strong cellular and humoral immune responses, the LPS in its surface being the main antigen responsible for antibody secretion [25]. This antibody response against LPS makes it not suitable for re-vaccination of adult bovines as the titers of induced antibodies interfere with the serology tests used for the detection of infected cattle. In the case of babesiosis, it may be necessary to vaccinate or



re-vaccinate adult cattle. Therefore we have also expressed RAPI in *B. abortus* rough strain RB51, which may be used for adult cattle vaccination [26]. Preliminary experiments suggest similar results for this strain, but with a significant decrease in humoral antigenicity with respect to S19 recombinant strains. Mice inoculated with RB51 carrying pBB-RAPI developed specific cellular immune response to RAPI, indicated by the secretion of IFN- $\gamma$  by RAPI-stimulated splenocytes (unpublished data). Experiments comparing the immune response in mice towards RAPI expressed in S19 and RB51 are currently being undertaken in our laboratory.

In summary, this report described a strategy for inducing an immune response against *B. bovis*, based on the expression of RAPI in *B. abortus* S19. Both, humoral and cellular immune responsiveness specific to the recombinant antigen were demonstrated. These results indicate that *B. abortus* is an adequate vector to express and present antigens of *B. bovis*. More likely, to build a protective immune response against *Babesia*, multiple antigens or immunogenic epitopes of several proteins may be required [27]. Expressing such antigens in *Brucella* spp. seems therefore highly attractive and may provide the basis for future research in heterologous vaccines for bovine brucellosis and babesiosis.

#### Acknowledgements

This work was supported financially by a grant from the Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (BID1201 oc/ar PICT 08-09624) and an IFS research grant agreement (number B/3087-1). We thank Mrs. Haydee Gil for technical assistance and Mr. Jorge Lorenzo for excellent animal care and assistance. FB and MF are CONICET fellows; JVSyG is a PhD fellowship holder of CONICET.

#### References

- [1] R. Bock, L. Jackson, A. de Vos, W. Jorgensen, Babesiosis of cattle, *Parasitology* 129 (2004) S247–S269.
- [2] C.E. Suarez, G.H. Palmer, D.P. Jasmer, S.A. Hines, L.E. Perryman, T.F. McElwain, Characterization of the gene encoding a 60-kDa *Babesia bovis* merozoite protein with conserved and surface exposed epitopes, *Mol. Biochem. Parasitol.* 46 (1991) 45–52.
- [3] W.C. Brown, T.F. McElwain, B.J. Ruef, C.E. Suarez, V. Shkap, C.G. Chitko-McKown, et al., *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 is immunodominant for T helper cells of immune cattle and contains T-cell-epitopes conserved among geographically distant *B. bovis* strains, *Infect. Immun.* 64 (1996) 3341–3350.
- [4] M.P. Santangelo, D. McIntosh, F. Bigi, G.R. Armoa, A.S. Campos, P. Ruybal, et al., *Mycobacterium bovis* BCG as a delivery system for the RAP-1 antigen from *Babesia bovis*, *Vaccine* 25 (6) (2007) 1104–1113.
- [5] P. Acha, B. Szyfres, Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals, Pan American Organization, Washington DC, 1980, 28–45.
- [6] M.J. Corbel, Brucellosis: an overview, *Emerg. Infect. Dis.* 3 (1997) 213–221.
- [7] G. Dubray, Protective antigens in brucellosis, *Ann. Inst. Pasteur* 138 (1987) 84–87.
- [8] R. Vemulapalli, Y. He, S.M. Boyle, N. Sriranganathan, G.G. Schurig, *Brucella abortus* strain RB51 as a vector for heterologous protein expression and induction of specific Th1 type immune responses, *Infect. Immun.* 68 (6) (2000 Jun) 3290–3296.
- [9] R. Vemulapalli, Y. He, N. Sriranganathan, S.M. Boyle, G.G. Schurig, *Brucella abortus* RB51: enhancing vaccine efficacy and developing multivalent vaccines, *Vet. Microbiol.* 90 (1–4) (2002) 521–532.
- [10] D.J. Comerci, G.D. Pollevick, A.M. Vigliocco, A.C. Frasch, R.A. Ugalde, Vector development for the expression of foreign proteins in the vaccine strain *Brucella abortus* S19, *Infect. Immun.* 66 (1998) 3862–3866.
- [11] I.G. Wright, R. Casu, M.A. Commins, B.P. Dalrymple, K.R. Gale, B.V. Goodger, et al., The development of a recombinant *Babesia* vaccine, *Vet. Parasitol.* 44 (1992) 3–13.
- [12] A. Tibor, B. Decelle, J.J. Letesson, Outer membrane proteins Omp10, Omp16, and Omp19 of *Brucella* spp. are lipoproteins, *Infect. Immun.* 67 (1999) 4960–4962.
- [13] E. Campos, S.L. Cravero, L. Delgui, I. Mora, N. Kahn, A.I. Arese, et al., *Brucella abortus* INTA2, a novel strain 19  $\Delta$ bp26::luc  $\Delta$ bmp18 double mutant lacking drug resistance markers, *Vet. Microbiol.* 87 (2002) 1–13.
- [14] M.E. Kovach, R.W. Phillips, P.H. Elzer, R.M. Roop II, K.M. Peterson, pBBR1 MCS: a broad-host-range cloning vector, *BioTechniques* 16 (1994) 800–802.
- [15] O.S. Anziani, A.A. Guglielmo, A.A. Abdala, D.H. Aguirre, A.J. Mangold, Protección conferida por *Babesia bovis* vacunal en novillos Holando Argentino, *Rev. Med. Vet. (Buenos Aires)* 74 (1993) 47–49.
- [16] M.L. Boschioli, S.L. Cravero, A.I. Arese, E. Campos, O.L. Rossetti, Protection against infection in mice vaccinated with a *Brucella abortus* mutant, *Infect. Immun.* 65 (2) (1997) 798–800.
- [17] S. Leclercq, J.S. Harms, G.M. Rosinha, V. Azevedo, S.C. Oliveira, Induction of a Th1-type of immune response but not protective immunity by intramuscular DNA immunisation with *Brucella abortus* GroEL heat-shock gene, *J. Med. Microbiol.* 51 (1) (2002 Jan) 20–26.
- [18] I.P. Nascimento, W.O. Dias, R.P. Mazzantini, E.N. Miyaji, M. Gamberini, W. Quintilio, et al., Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing pertussis toxin subunit S1 induces protection against an intracerebral challenge with live *Bordetella pertussis* in mice, *Infect. Immun.* 68 (2000) 4877–4883.
- [19] S. Ramamoorthy, N. Sanakkayala, R. Vemulapalli, R.B. Duncan, D.S. Lindsay, G.S. Schurig, et al., Prevention of lethal experimental infection of C57BL/6 mice by vaccination with *Brucella abortus* strain RB51 expressing *Neospora caninum* antigens, *Int. J. Parasitol.* 37 (2007) 1521–1529.
- [20] N. Yokoyama, B. Suthisak, H. Hirata, T. Matsuo, N. Inoue, C. Sugimoto, et al., Cellular localization of *Babesia bovis* merozoite rhoptry-associated protein 1 and its erythrocyte-binding activity, *Infect. Immun.* 70 (2002) 5822–5826.
- [21] J. Norimine, J. Mosqueda, C. Suarez, G.H. Palmer, T.F. McElwain, G. Mbassa, et al., Stimulation of T-helper cell gamma interferon and immunoglobulin G responses specific for *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 (RAP-1) or a RAP-1 protein lacking the carboxy-terminal repeat region is insufficient to provide protective immunity against virulent *B. bovis* challenge, *Infect. Immun.* 71 (2003) 5021–5032.
- [22] W.L. Goff, W.C. Johnson, S.M. Parish, G.M. Barrington, W. Tuo, R.A. Valdez, The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen, *Parasite Immunol.* 23 (2001) 463–471.
- [23] M.A. Campos, G.M. Rosinha, I.C. Almeida, X.S. Salgueiro, B.W. Jarvis, G.A. Splitter, et al., Role of Toll-like receptor 4 in induction of cell-mediated immunity and resistance to *Brucella abortus* infection in mice, *Infect. Immun.* 72 (2004) 176–186.
- [24] P.G. Cardoso, G.C. Macedo, V. Azevedo, S.C. Oliveira, *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system, *Microb. Cell Fact.* 23 (2006) 5–13.
- [25] B. Golding, D.E. Scott, O. Scharf, L.Y. Huang, M. Zaitseva, C. Lapham, et al., Immunity and protection against *Brucella abortus*, *Microbes Infect.* 3 (2001) 43–48.
- [26] G.G. Schurig, N. Sriranganathan, M.J. Corbel, Brucellosis vaccines: past, present and future, *Vet. Microbiol.* 90 (2002) 479–496.
- [27] W.C. Brown, J. Norimine, W.L. Goff, C.E. Suarez, T.F. McElwain, Prospects for recombinant vaccines against *Babesia bovis* and related parasites, *Parasite Immunol.* 28 (2006) 315–327.



ELSEVIER



INSTITUT PASTEUR

Microbes and Infection 12 (2010) 1236–1243



www.elsevier.com/locate/micinf

Original article

# Expression of MPB83 from *Mycobacterium bovis* in *Brucella abortus* S19 induces specific cellular immune response against the recombinant antigen in BALB/c mice

Julia V. Sabio y García, Fabiana Bigi, Osvaldo Rossetti, Eleonora Campos\*

Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA-Castelar, N. Repetto y Los Reseros s/n (1686) Hurlingham, Buenos Aires, Argentina

Received 25 June 2010; accepted 14 September 2010

Available online 1 October 2010

## Abstract

Immunodominant MPB83 antigen from *Mycobacterium bovis* was expressed as a chimeric protein fused to either  $\beta$ -galactosidase, outer membrane lipoprotein OMP19 or periplasmic protein BP26 in gram-negative *Brucella abortus* S19, in all cases driven by each gene's own promoter. All fusion proteins were successfully expressed and localized in the expected subcellular fraction. Moreover, OMP19-MPB83 was processed as a lipoprotein when expressed in *B. abortus*. Splenocytes from BALB/c mice immunized with the recombinant S19 strains carrying the genes coding for the heterologous antigens in replicative plasmids, showed equally specific INF- $\gamma$  production in response to MPB83 stimulation. Association to the lipid moiety of OMP19 presented no advantage in terms of immunogenicity for MPB83. In contrast, fusion to BP26, which was encoded by an integrative plasmid, resulted in a weaker immune response. None of the constructions affected the survival rate or the infection pattern of *Brucella*. We concluded that *B. abortus* S19 is an appropriate candidate for the expression of *M. bovis* antigens both associated to the membrane or cytosolic fraction and may provide the basis for a future combined vaccine for bovine brucellosis and tuberculosis.

© 2010 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** *Brucella*; Heterologous expression; Mycobacteria

## 1. Introduction

Bovine tuberculosis (bTB) remains an important animal and zoonotic disease in many countries, causing both significant economic losses and acting as a public health hazard. *Mycobacterium bovis*, the causative agent of bTB, is closely related to *Mycobacterium tuberculosis*, the agent responsible for human tuberculosis [1]. While the main host of *M. bovis* is cattle, other animals, including humans, may also be infected [2]. The presence of bTB undermines the development of the dairy and meat industry and it is an impediment to international trade. At present there is no vaccine available for bovine tuberculosis that does not interfere with diagnosis. Therefore,

controlling and eventually eradicating this disease is essential. New vaccine candidates and novel immunization strategies are strongly needed to improve the control of the global tuberculosis epidemic.

Among the many *M. bovis* antigens that have been characterized, MPB83 has generated good T-cell and B-cell responses in mice and in cattle when used as nucleic acid based vaccine [3–5]. Even though in a later study vaccination of calves with MPB83 DNA vaccine did not induce protection against bovine tuberculosis [6], the combined DNA (Ag85B, MPT64, and MPT-83a)/BCG vaccine increased the protective efficacy by more than 10–100-fold in calves challenged with *M. bovis* compared to the combined DNA and BCG groups [7]. MPB83 is a glycosylated lipoprotein processed by signal peptidase II and located at the surface [8], possibly with the lipid tail coupled to the N-terminal cysteine embedded in the mycobacterial outer membrane [9]. In SDS-PAGE followed by

\* Corresponding author. Tel.: +54 11 4621 1447x174; fax: +54 11 4621 0199.

E-mail address: ecampos@cnia.inta.gov.ar (E. Campos).



Western blot of mycobacteria whole cell protein extracts, two bands of 25 and 23 kDa that react with monoclonal antibody MPB83 have been detected. It has been proposed that they correspond to different glycosylated forms of MPB83 [10]. These characteristics make MPB83 an attractive antigen to use as a model for heterologous expression.

On the other hand, *Brucella abortus* is a facultative intracellular pathogen which causes brucellosis, a major zoonosis, in several countries. Brucellosis causes abortion and infertility in cattle and a clinical manifestation known as undulant fever in humans [11]. The vaccines used for control of bovine brucellosis are attenuated *B. abortus* S19 (smooth strain) and RB51 (rough strain) [12]. Both strains induce a strong Th1 response and generate cell-mediated immunity (CMI), while S19 also induces a strong humoral response against surface antigens, particularly O antigen [13]. S19 vaccine has been widely used for more than 50 years and the immune response it elicits, both in animal models as well as in the natural host, has been extensively studied. Animal models for brucellosis are also well established and characterized.

For these reasons, *B. abortus* is an attractive vector for the expression of heterologous antigens of veterinary importance allowing expression from different promoters [14–18]. Furthermore, we have previously shown that *B. abortus* S19 can efficiently express RAPI from *Babesia bovis* and is immunostimulatory in the mouse model of infection [19]. Taken together, these features form a strong basis for using *B. abortus* as an antigen carrier to induce a Th1 biased immune response.

In this work, we have generated recombinant *B. abortus* S19 strains expressing MPB83 antigen from *M. bovis* in either the membrane or cytosolic fractions and analyzed their ability to elicit a specific immune response towards the recombinant antigen as well as the infection parameters of the recombinant strains in BALB/c mice.

This study provides a strong basis for expressing protective antigens of *M. bovis* in *B. abortus* S19 and supports further investigation on this strategy for the development of heterologous vaccines for the control of bovine tuberculosis.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial culture conditions

*B. abortus* strain 19 was obtained from our strain collection. *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  were purchased from Invitrogen. *E. coli* derived strains were grown in either liquid or solid Luria Bertani (LB) medium containing appropriate antibiotics at the following concentrations: ampicillin 100  $\mu$ g/ml; kanamycin 50  $\mu$ g/ml. *Brucella* cultures were grown at 37 °C in trypticase soy broth (TSB) or tryptose agar (TA) (DIFCO), supplemented with the appropriate antibiotics (kanamycin 25  $\mu$ g/ml, ampicillin 50  $\mu$ g/ml).

### 2.2. Plasmids

In order to construct vectors for MPB83 expression in *B. abortus*, the *mpb83* gene was amplified by PCR from the genomic DNA of reference strain *M. bovis* AN5, generously provided by Dr. Angel Cataldi. Primers 5'ctgcagcgatgatcaacgttcaggc3' and 5'ctgcagcgaggcaaaccgcctacac3' were used, with PstI restriction sites (underlined) incorporated into both primers to allow the subcloning of the full length *mpb83* gene into pBBomp19 [19]. In order to clone *mpb83* into pBBR1MCS2 [20] and pKS26 [21], primers: forward 5'gcgcgcatgatcaacgttcaggc3' and reverse 5'gcgcgcgaggcaaaccgcctactact3' were used. BssHII sites (underlined) were incorporated into both primers. Amplification was performed at 95 °C, 2 min, followed by 35 cycles of 95 °C, 1 min; 58 °C, 1 min and 72 °C, 1.5 min. The amplified gene fragments were cloned in pGEM-T vector (Promega) and then subcloned into PstI of pBBomp19 to generate pomp19-83, in BssHII site of pKS26 for p26-83 or into EcoRI of pBBR1MCS2 to make p83. Recombinant plasmids were transformed into *E. coli* DH5 $\alpha$  for cloning and amplification. Correct framing and orientation were analyzed by DNA sequencing.

### 2.3. Generation of recombinant *B. abortus* S19 expressing MPB83

Selected purified plasmids were used to electroporate *B. abortus* S19 according to methods previously described [22]. Recombinant colonies were confirmed by colony PCR using *mpb83* specific oligonucleotides. Finally, total proteins from the kanamycin or ampicillin-resistant *B. abortus* S19 colonies (rS19) were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) followed by Western blot (WB) with a specific monoclonal antibody (Mab) for MPB83. *B. abortus* S19 strains harbouring plasmids pBBR1MCS, pBBomp19, pKS26, p83, p26-83 pomp19-83 were designated Sp, Spomp19, Sp26, Sp83, Sp26-83 and Spomp19-83, respectively.

### 2.4. Subcellular localization of recombinant MPB83 in *B. abortus*

Subcellular fractioning of Sp83, Sp26-83 and Spomp19-83 was performed as previously described [23]. The fractions were analyzed by Western blot (WB) using monoclonal antibody anti-rMPB83 (kindly provided by Dr. H. Wiker).

### 2.5. Determination of lipid association of OMP19-MPB83

Liquid cultures of *B. abortus* and *E. coli* recombinant strains were treated with or without globomycin in order to assess inhibition of processing by signal peptidase II according to previously described methods [19]. Globomycin was kindly provided by M. Inukai (Sankyo Co. Tokyo, Japan). It was dissolved in ethanol and used at 100  $\mu$ g/ml (final ethanol concentration of 2%) in the exponential phase of growth of the bacterial cultures. As a negative control, a culture was treated



with ethanol 2%. After 12 h (for *Brucellae*) or 2 h (for *E. coli*) of incubation, bacteria were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and suspended in SDS-PAGE sample buffer. These lysates were analyzed by SDS-PAGE and Western Blot with the corresponding anti-MPB83 monoclonal antibodies to evaluate accumulation of lipoprotein precursors.

## 2.6. Mice assays

Female BALB/c mice of 12 weeks of age were used. They were raised in the animal house of the Instituto de Biotecnología (INTA), under appropriate conditions of temperature, water and feeding. Animals were inoculated intraperitoneally (i.p.) with  $1 \times 10^6$  colony forming units (CFUs) of the indicated strains or with purified recombinant MPB83 (rMPB83) (25 µg/ml in Freund's adjuvant, Sigma). Negative control mice were treated with saline alone (PBS). Mice were euthanized by CO<sub>2</sub> asphyxiation and serum and spleens were collected. For determining bacterial spleen colonization and plasmid stability, spleens were weighed, homogenized in 5 ml of PBS and used for colony forming unit (CFU) determination by serial dilution followed by plating on TA with or without the corresponding antibiotics. Colonies were examined after 3 days at 37 °C. Animal experiments were approved by the institute's bioethics committee.

## 2.7. IFN-γ production determination

For cellular immune response assessment, splenocytes were obtained by a previously described method [23]. Cells were incubated at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> in the presence of different antigens indicated in the text (1 or 5 µg of recombinant MPB83, 5 µg of *B. abortus* S19 crude heat inactivated extract, 0.5 µg of concanavalin A, or culture media RPMI 1640 alone). After 72 h, the supernatant was collected and IFN-γ production was determined by ELISA using 0.1 µg of capture-purified anti-mouse IFN-γ (clone R4-6A2) (BD Pharmingen, San Diego, CA) and 0.05 µg of detection-biotinylated anti-mouse IFN-γ (BD Pharmingen) per well according to the manufacturer's instructions. The assays were performed in triplicate.

## 2.8. Statistical analysis

Spleen weight and bacterial CFU in the spleen were analyzed, due to the dispersion observed, by the non-parametric test of Kruskal Wallis after which a multiple comparisons test was undertaken. The data for IFN-γ production were subjected to analysis of variance, and the means were compared using Tukey's test.

## 3. Results

### 3.1. Expression and cellular localization of MPB83 in *B. abortus* S19

MPB83 antigen from *M. bovis* was successfully expressed in *B. abortus* S19 as a full length fusion to the first 36 aminoacids of β-galactosidase (Fig. 1a), to the first 38 aminoacids

of *Brucella* lipoprotein OMP19 and to the first 39 aminoacids of *Brucella* periplasmic protein BP26 (Fig. 1b) using vectors pBBRMCS2 [20], pBBomp19 [19] and pKS26 [21], respectively. Western blot analysis using monoclonal anti-rMPB83 antibody revealed reactive bands with apparent molecular masses of 24 kDa for OMP19-MPB83 and BP26-MPB83 and of 27 kDa for β-galactosidase-MPB83 in whole extracts of recombinant S19 strains, as expected. As a control, supernatant of *M. bovis* AN5 was used (reviewed in [24]) (Fig. 1). Plasmids pBBRMCS2 and its derivative pBBomp19 are both replicative vectors while pKS26 is an integrative vector for *Brucella*. Based on our previous experience with BP26 which showed it may be toxic when over-expressed in high copy number plasmids [21,22], we decided to use an integrative vector for expression of MPB83 as a fusion to BP26.

Subcellular fractioning of the recombinant strains generated (rS19) revealed that MPB83 was localized in association to the membrane fraction when expressed as a fusion protein to OMP19 (Fig. 2b), while it was localized in the cytoplasm fraction when expressed as a fusion protein to β-galactosidase (Fig. 2a). Recombinant fusion protein BP26-MPB83 was detected in the soluble fraction supporting the idea that MPB83 as a fusion to BP26 is not anchored to membranes. The purity of the membrane fractions was confirmed by the detection of OMP19 using anti-OMP19 antiserum and the absence of any bands using anti-L7/L12 antiserum (data not shown).

### 3.2. OMP19-MPB83 is partially processed in presence of globomycin

Globomycin is a potent and specific inhibitor of lipoprotein signal peptidases. When cells are grown in its presence, there is an accumulation of pro-lipopeptides [25,26]. To evaluate whether OMP19-MPB83 is successfully expressed as a lipoprotein, both *E. coli* (data not shown) and *B. abortus* S19 expressing OMP19-MPB83 (Epomp19-83 and Spomp19-83, respectively) were grown with globomycin, and cell extracts were analyzed by WB (Fig. 3). The appearance of a band corresponding to the unprocessed precursor was detected in both cases, indicating the accumulation of a precursor when treated with globomycin. In untreated cells, only the mature chimeric protein was detected. Inhibition of the maturation by globomycin confirms the lipoprotein nature of this chimeric protein. As controls, Sp26-83 and Sp83 were also treated with globomycin, but no differences were detected when treated with the solvent (ethanol 2%) alone (data not shown).

### 3.3. Expression of MPB83 does not affect infection characteristics of *B. abortus* S19 in the mouse model of infection

In order to evaluate whether expression of MPB83 affects *B. abortus* pattern of infection as well as the stability of the replicative vectors carrying *mpb83* gene constructs, groups of five mice were infected with each strain and, at different time points, spleens were collected, disrupted and serial dilutions



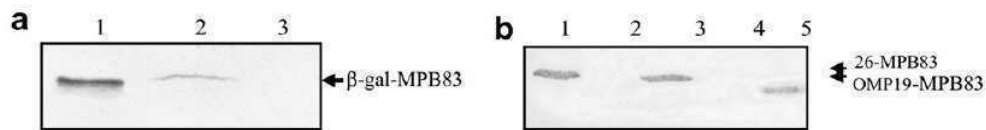


Fig. 1. Expression of MPB83 fusion proteins in *B. abortus* S19. Detection of chimeric proteins in *B. abortus* S19 whole cell extracts by Western blot using anti-MPB83 monoclonal antibody (dilution 1:200). Panel (a)  $\beta$ -gal-MPB83. Lanes: 1: supernatant of strain *M. bovis* AN5; 2: Sp83; 3: Sp (b) OMP 19-MPB83 and 26-MPB83. Lanes: 1: Sp26-83; 2: Sp26; 3: Somp19-83; 4: Somp19; 5: supernatant of strain *M. bovis* AN5.

were plated for bacterial counts. Vector stability was assessed by comparing the number of colony forming units (CFUs) from each strain recovered from mice spleen on solid media, supplemented or not, with the selective antibiotic at 3 and 4 weeks post-infection (Fig. 4a). Although there is a slightly lower count of CFU in selective antibiotics for strains bearing replicative plasmids (Sp, Sp83 and Spomp19-83), these differences were not statistically significant either at 3 or 4 weeks post-infection, indicating a high stability of recombinant plasmids in vivo. No difference in CFU was observed for Sp26-83 with or without selective antibiotic at any time point which was expected as pKS26 is an integrative vector for *Brucellae*. Furthermore, when these strains were grown in liquid culture with and without antibiotics, no differences in growth parameters were observed (data not shown).

Regarding infection pattern, S19 recombinant strains presented the same levels of spleen colonization as S19 carrying empty pBB (Sp) which also correlates with expected bacterial counts for this kind of experimental infection [21,22]. Accordingly, splenomegaly was observed in all mice groups respect of control uninfected group, and correlates with infection parameters expected for S19. No differences in the spleen weight among infected mice groups were observed at any time point (Fig. 4b). These results suggest that the expression of MPB83 in S19 does not alter the infection characteristics of S19 in the mouse model of infection. Expression of MPB83 following passage in vivo was confirmed by PAGE followed by WB of whole protein extracts of randomly picked rS19 colonies recovered from the spleen of immunized mice at all time points (data not shown).

### 3.4. *B. abortus* S19 strains expressing MPB83 induce a specific cellular immune response to MPB83 in BALB/c mice

The next question we addressed was whether the heterologous proteins expressed by the recombinant *B. abortus* strains were able to generate an immune response in the course of an

experimental infection in the mouse model. Groups of five mice were intraperitoneally infected with Sp, Sp83, Sp26-83 and Spomp19-83. As control, another group of mice was injected with saline solution (PBS). In order to study specific cellular immune response stimulation, splenocytes were collected from animals at 3 weeks post-inoculation and were stimulated for 72 h with purified recombinant MPB83 (rMPB83) pretreated with polymyxin B to reduce potential LPS contamination and INF- $\gamma$  production was measured (Fig. 5). Splenocytes from mice immunized with Sp83 and Spomp19-83 produced significantly higher levels of INF- $\gamma$  than splenocytes from mice infected with Sp, when stimulated with rMPB83 at a concentration of 5  $\mu$ g/ml. Although splenocytes from mice immunized with Sp26-83 also produced significantly higher levels of INF- $\gamma$  compared to splenocytes from mice infected with Sp, this was significantly lower than the response of the other groups. Coincidentally, at lower concentrations of stimulating antigen rMPB83 (1  $\mu$ g/ml) only splenocytes from Sp83 and Spomp19-83 immunized groups presented statistically significant higher levels of INF- $\gamma$  ( $p < 0.001$ ) than the control group, Sp. Similar results were obtained in another independent experiment (data not shown). The level of INF- $\gamma$  produced by ConA or heat-killed S19 stimulated splenocytes was high in all cases. No rMPB83 specific cellular immune responses were detected in the animals inoculated with PBS or rMPB83 (data not shown).

These data confirm the induction of a specific cellular immune response against MPB83, using *B. abortus* S19 as a live carrier.

## 4. Discussion

The most convenient and practical means to control bovine tuberculosis is vaccination. *M. bovis* BCG is the most well-known vaccine, though it is not currently used as a bTB vaccine. Moreover, BCG vaccination failed to induce protection in the majority of field experiments against natural infection (reviewed in [27]). One of the biggest obstacles to the introduction of BCG vaccination as a mechanism for bTB control in

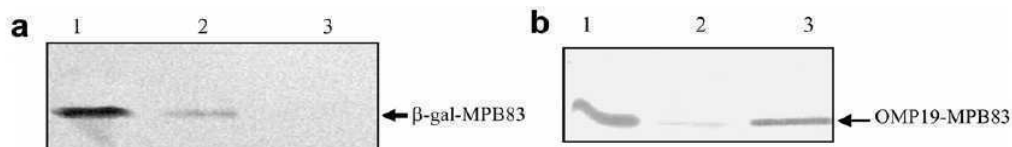


Fig. 2. Subcellular localization of MPB83 fusion proteins expressed in *B. abortus* S19. Detection of chimeric proteins in *B. abortus* S19 subcellular fractions by Western blot using anti-MPB83 monoclonal antibody (dilution 1:200). Panel (a) Sp83. 1: whole cell extract, 2: cytoplasmic fraction, S150000, 3: membrane fraction, ultracentrifugation pellet P150000. Panel (b) Spomp19-83. 1: whole cell extract, 2: cytoplasmic fraction, S150000, 3: membrane fraction, ultracentrifugation pellet P150000.



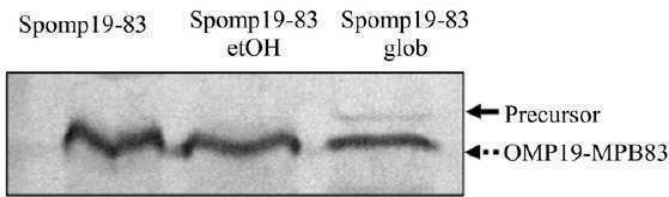


Fig. 3. Lipidation of OMP19-MPB83 fusion protein. Western blot of *B. abortus* S19 extracts using anti-MPB83 monoclonal antibody. *B. abortus* Spomp19-83 cells were treated with 100 ng/ml globomycin B in ethanol 2% for 12 h. They were also treated with ethanol 2% as a negative control. The solid arrow indicates the unprocessed precursor; the dashed arrow shows OMP19-MPB83. References: Spomp19-83: Spomp19-83 non-treated; Spomp19-83 etOH, treated with ethanol, Spomp19-83 glob, treated with globomycin diluted in ethanol.

cattle has been that BCG vaccination sensitises animals to the tuberculin skin test, such that vaccinated animals respond positively to the skin test. The potential use of live recombinant bacteria expressing selected mycobacterial antigens as a platform for vaccine development is therefore highly attractive. In this regard, *B. abortus* has proved to be a useful vector for the expression of heterologous antigens [14–19].

In order to test this hypothesis, we have expressed MPB83 antigen of *M. bovis* in *B. abortus* S19. S19 has been used as a vaccine for bovine brucellosis for more than 50 years now in many countries of Latin America, and the immune response it elicits is very well characterized both in mice and in its natural host, the bovine. This makes it a strong candidate for model studies of heterologous expression. Surveillance and diagnosis of brucellosis in countries where S19 is the vaccine of choice is done by classical serology tests that include agglutination and Bengal Rose [11,28]. This is accompanied with a proper vaccine protocol that involves early vaccination of heifers. On the other hand, RB51 is a rough strain also in use in many countries. We have chosen to work with S19 because LPS is a strong humoral antigen and may serve as a natural adjuvant.

MPB83 is a glycosylated lipoprotein processed by signal peptidase II and located at the surface in mycobacteria [8]. We have cloned *mpb83* full length gene in three different vectors with the objective of generating recombinant *Brucella* strains that would express the chimeric protein in different subcellular localizations. MPB83 antigen was successfully expressed as a fusion to  $\beta$ -galactosidase, localized in the cytoplasmic fraction, and as a fusion to the first aminoacids of *B. abortus* OMP19 lipoprotein, associated to the membrane fraction. As to the chimeric BP26-MPB83 protein, the band detected by Western Blot essays coincides with the predicted molecular weight of the processed polypeptide and was detected in the soluble fraction. This suggests that the first 28 aminoacids of the BP26 aminoterminal sequence were cleaved as expected and the resulting polypeptide is not associated to membranes. Nevertheless, purification of periplasmic *Brucella* fraction could not be achieved and periplasmic localization of recombinant protein was not confirmed.

It is well known that lipoproteins are key antigens in immunity to many bacterial diseases [29–32]. It also has been found that non-lipoprotein antigens from the parasite *Leishmania major* in fusion to bacterial lipoproteins can enhance immunity [33]. Lipoproteins are synthesised with an N-terminal hydrophobic signal peptide that is cleaved from the mature polypeptide by lipoprotein signal peptidase (LSP) prior to covalent linkage of a fatty acid [33]. The presence of the lipid moiety would allow the protein to take up the correct membrane topology [34] and would confer immunostimulatory properties [35,36]. Molecular analysis of phylogenetically diverse bacterial pathogens has demonstrated divergence of the LSP recognition site. Mycobacterial recognition sequences appear to have undergone genetic drift [37]. Heterologous expression of lipoproteins in *E. coli* with divergent LSP recognition sequences often results in expression of recombinant protein with lipid modification being incomplete or entirely absent [38–40]. Specifically, MPB83 is not lipidated

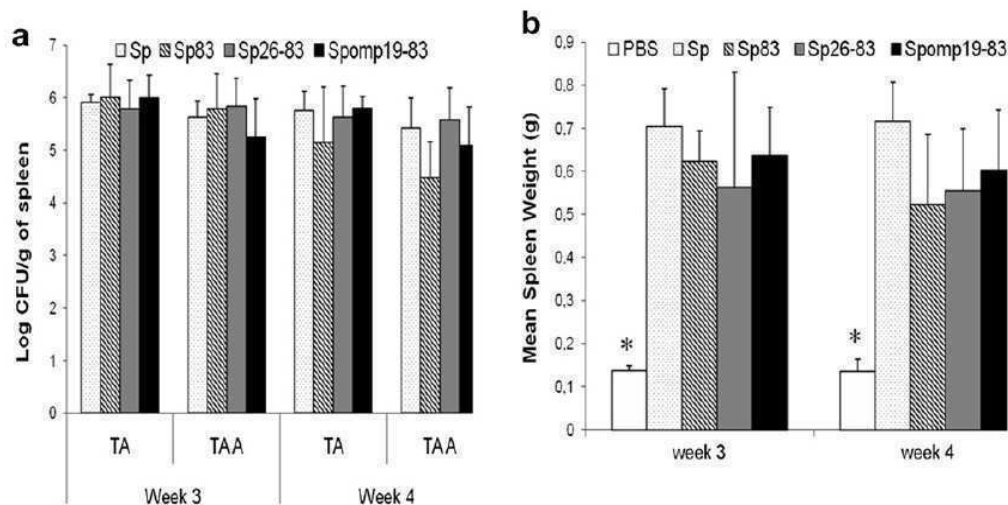


Fig. 4. Plasmid stability and spleen colonization of recombinant strains in immunized mice. BALB/c mice were inoculated intraperitoneally with each strain indicated. Spleens were disrupted and serial dilutions were plated with or without the corresponding antibiotic in order to determine plasmid stability. The data presented are means and standard deviations of the number of brucellae detected in the spleens (a) and spleen weight (b) of five mice infected with each strain at 3 and 4 weeks after immunization in a single experiment. \*, significantly different from the other groups ( $p < 0.05$ ). TA: tryptone agar, TAA: tryptone agar supplemented with antibiotics: kanamycin or ampicillin, according to the plasmid used.



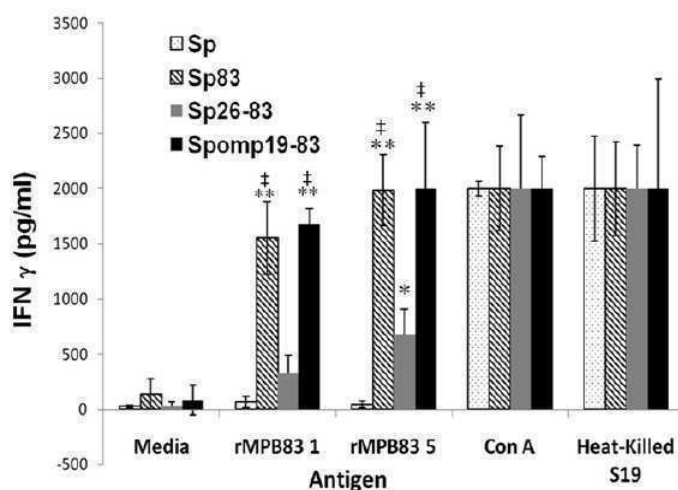


Fig. 5. Mice splenocytes IFN- $\gamma$  production at 3 weeks post-infection. Quantitative ELISA analysis of IFN- $\gamma$  secreted by lymphocytes upon stimulation with different antigens for 72 h. Spleen cells ( $4 \times 10^6$ /ml) from mice inoculated with Sp, Sp83, Sp26-83, Spomp19-83 or PBS (negative control) were stimulated with 1  $\mu$ g or 5  $\mu$ g of MPB83 (rMPB83.1 and rMPB83.5, respectively); concanavalin A (Con A); inactivated whole cell extract of *B. abortus* S19 (heat-killed S19) or RPMI 1640 culture media (media) as negative control. Each bar represents the geometric mean  $\pm$  standard deviation (error bars) of the responses in spleen cells from five individual mice (each by triplicate). \*\*, statistically significant differences compared to Sp group ( $p < 0.001$ ). \*, statistically significant difference compared to Sp group ( $p < 0.05$ ). † statistically significant differences compared to Sp26-83 ( $p < 0.05$ ).

or processed when expressed in *E. coli* [41], which correlates with our results that is not lipidated in *B. abortus* either. This inconvenience may be overcome including an LSP recognition sequence that is efficiently processed by Gram-negative bacteria when expressing mycobacterial antigens in Gram-negative bacteria [41–43]. In this work, we have expressed MPB83 as a fusion to OMP19 lipoprotein [44], therefore conferring a valid lipidation signal that would be recognized in *Brucella*. When Spomp19-83 were treated with globomycin, a potent and specific inhibitor of lipoprotein signal peptidases that induces accumulation of the lipoprotein precursors [19,26], a band corresponding to the unprocessed precursor was detected by Western blot, suggesting the lipidic nature of the chimeric protein.

We tested the immunizing capacity of the recombinant *B. abortus* (rS19) strains and the stability of the corresponding plasmids in BALB/c mice. Stability of recombinant bacteria within the vaccinated host is a prerequisite for any potential live recombinant vaccine. There were no statistically significant differences between the CFUs of any rS19 recovered from the spleen of mice on solid medium either with or without the selective antibiotic, indicating that even under no selective pressure, recombinant bacteria did not lose the plasmids they were carrying. Importantly, rS19 colonies recovered from the intracellular environments maintained their ability to express MPB83 in all cases. In previous studies, when RapI form *B. bovis* was expressed as a fusion to OMP19, the recombinant plasmid was more stable than the other constructions under study [19]. In this work, such difference is not observed as all constructions show similar levels of stability, probably due to

the small size of the chimeric protein expressed which may result in lower metabolic burden. Therefore, the stability of plasmids coding for recombinant antigens may be highly influenced by the nature of the antigen that is being expressed.

In order to evaluate the specific immunogenicity of the heterologous protein expressed in *Brucella*, groups of BALB/c mice were immunized with Sp83, Sp26-83 or Spomp19-83. Splenocytes from mice of the different groups were obtained and evaluated for their capacity to secrete IFN- $\gamma$  in response to MPB83 stimulation. When stimulated with 5  $\mu$ g of rMPB83, splenocytes from groups of mice immunized with the recombinant strains expressing the three different fusion proteins secreted higher levels of IFN- $\gamma$  than the control group. Nevertheless, significantly lower stimulation was achieved with splenocytes from Sp26-83 immunized mice. This may be explained by the fact that the heterologous *bp26-mpb83* gene construction was carried by an integrative plasmid, resulting in only one copy in the chromosome. Whether the gene copy number resulted in lower protein expression levels remains to be determined. Coincidentally, with lower concentration of the stimulating rMPB83 antigen, only splenocytes from mice immunized with Sp83 and Spomp19-83 were able to stimulate statistically significant secretion of IFN- $\gamma$ . It is well known that one major drawback of integrative vectors is the reduced level of heterologous expression [45], which counter balances their higher stability. For MPB83 expression in the vectors tested, the improvement in stability of the integrative vector was not significant whilst there was an important loss of immunizing capacity, suggesting that replicative vectors would be more suitable for further work with this antigen.

When pathogen-molecular patterns bind to mammalian Toll-like receptors (TLRs), they stimulate an innate immune response so that an adaptive immune response can arise. *B. abortus* LPS and mycobacterial lipoproteins are well studied examples of immune cells activation through interaction with TLR4 and TLR2, respectively [46–48]. In particular, the role of MPB83 in the stimulation of IL-12 and TNF $\alpha$  production through binding to TLR2 has been demonstrated in dendritic cell from cattle [49]. In this regard, the expression of MPB83 as lipoprotein in a Gram-negative bacterial species, as *B. abortus*, was highly promising towards designing a novel vaccine. However, no significant differences were observed in IFN- $\gamma$  production from splenocytes stimulated with rMPB83 from either Sp83 or Spomp19-83 immunized groups suggesting that association to the lipid moiety did not result in a significant advantage in terms of immunogenicity for this antigen, at least under the conditions assayed.

Although MPB83 is a valid model antigen candidate, vaccination of cattle with *Brucella* expressing MPB83 may compromise the specificity of the tuberculin skin test since PPD contains this antigen. When assayed in cattle, this issue should be addressed. MPB83 is considered an antigen that might be useful for differentiation of vaccinated and infected animals – DIVA diagnosis – in BCG vaccinated animals [50]. Therefore, the use of a candidate vaccine expressing MPB83 to control the bovine tuberculosis in cattle would most probably need to be accompanied with a diagnosis based on a PPD

devoid of MPB83 and any other antigen present in the vaccine formulations.

In summary, expression of mycobacterial antigen MPB83 in *B. abortus* S19 was achieved and cellular immune responsiveness specific to the recombinant antigen was demonstrated. These results indicate that *B. abortus* is an adequate vector to express and present antigens of *M. bovis*. Development of a *B. abortus* S19-based multivalent vaccine that could confer protection against brucellosis and tuberculosis would be highly beneficial for controlling these two important diseases in livestock and certain wild animals. Studies presented in this paper indicate that the development of such multivalent vaccine is certainly feasible.

### Acknowledgements

This work was supported financially by a grant from the Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (BID1201 oc/ar PICT 08-09624). We thank Mrs. Haydee Gil for technical assistance and Mr. Jorge Lorenzo and Silvio Díaz for excellent animal care and assistance. We thank Federico Blanco for his help with mice experiments. EC and FB are researchers from CONICET. JVSyG is a PhD student from UBA.

### References

- [1] T. Garnier, K. Eiglmeier, J.C. Camus, N. Medina, H. Mansoor, M. Pryor, S. Duthoy, S. Grondin, C. Lacroix, C. Monsempe, S. Simon, B. Harris, R. Atkin, J. Doggett, R. Mayes, L. Keating, P.R. Wheeler, J. Parkhill, B.G. Barrell, S.T. Cole, S.V. Gordon, R.G. Hewinson, The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2003) 7877–7882.
- [2] F. Biet, M.L. Boschioli, M.F. Thorel, L.A. Guilloteau, Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium*-intracellular complex (MAC), *Vet. Res.* 36 (2005) 411–436.
- [3] M.A. Chambers, H. Vordermeier, A. Whelan, N. Commander, R. Tascon, D. Lowrie, R.G. Hewinson, Vaccination of mice and cattle with plasmid DNA encoding the *Mycobacterium bovis* antigen MPB83, *Clin. Infect. Dis.* 30 (3) (2000) 283–287.
- [4] H.M. Vordermeier, P.J. Cockle, A.O. Whelan, S. Rhodes, M.A. Chambers, D. Clifford, K. Huygen, R. Tascon, D. Lowrie, M.J. Colston, R.G. Hewinson, Effective DNA vaccination of cattle with the mycobacterial antigens MPB83 and MPB70 does not compromise the specificity of the comparative intradermal tuberculin skin test, *Vaccine* 19 (2000) 1246–1255.
- [5] T. Xue, E. Stavropoulos, M. Yang, S. Ragno, M. Vordermeier, M. Chambers, G. Hewinson, D.B. Lowrie, M.J. Colston, R.E. Tascon, RNA encoding the MPT83 antigen induces protective immune responses against *Mycobacterium tuberculosis* infection, *Infect. Immun.* 72 (11) (2004) 6324–6329.
- [6] D.N. Wedlock, M.A. Skinner, N.A. Parlane, H.M. Vordermeier, R.G. Hewinson, G.W. de Lisle, B.M. Buddle, Vaccination with DNA vaccines encoding MPB70 or MPB83 or a MPB70 DNA prime-protein boost does not protect cattle against bovine tuberculosis, *Tuberculosis (Edinb)* 83 (6) (2003) 339–349.
- [7] H. Cai, D.H. Yu, X.D. Hu, S.X. Li, Y.X. Zhu, A combined DNA vaccine-prime, BCG-boost strategy results in better protection against *Mycobacterium bovis* challenge, *DNA Cell Biol.* 25 (2006) 438–447.
- [8] R.G. Hewinson, S.L. Michell, W.P. Russell, R.A. McAdam, W.R. Jacobs Jr., Molecular characterization of MPT83: a seroreactive antigen of *Mycobacterium tuberculosis* with homology to MPT70, *Scand. J. Immunol.* 43 (1996) 490–499.
- [9] H.G. Wiker, MPB70 and MPB83 major antigens of *Mycobacterium bovis*, *Scand. J. Immunol.* 69 (2009) 492–499.
- [10] H.G. Wiker, S. Nagai, R.G. Hewinson, W.P. Russell, M. Harboe, Heterogenous expression of the related MPB70 and MPB83 proteins distinguish various substrains of *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Scand. J. Immunol.* 43 (1996) 374–380.
- [11] P. Acha, B. Szyfres, Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals, vol. I, Sci. Publ. - Pan Am. Health Organ., Washington, D.C., 2001.
- [12] M.J. Corbel, Brucellosis: an overview, *Emerging Infect. Dis.* 3 (1997) 213–221.
- [13] G. Dubray, Protective antigens in brucellosis, *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 138 (1987) 84–87.
- [14] R. Vemulapalli, Y. He, S.M. Boyle, N. Sriranganathan, G.G. Schurig, *Brucella abortus* strain RB51 as a vector for heterologous protein expression and induction of specific Th1 type immune responses, *Infect. Immun.* 68 (2000) 3290–3296.
- [15] M.N. Seleem, N. Jain, H. Alqublan, R. Vemulapalli, S.M. Boyle, N. Sriranganathan, Activity of native vs. synthetic promoters in *Brucella*, *FEMS Microbiol. Lett.* 288 (2008) 211–215.
- [16] A.B. Bandara, S.A. Poff-Reichow, M. Nikolich, D.L. Hoover, N. Sriranganathan, G.G. Schurig, V. Dobrea, S.M. Boyle, Simultaneous expression of homologous and heterologous antigens in rough, attenuated *Brucella melitensis*, *Microbes Infect.* 11 (2009) 424–428.
- [17] S. Ramamoorthy, N. Sanakkayala, R. Vemulapalli, N. Jain, D.S. Lindsay, G.S. Schurig, S.M. Boyle, N. Sriranganathan, Prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in C57BL/6 mice vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51 expressing *N. caninum* protective antigens, *Int. J. Parasitol.* 37 (2007) 1531–1538.
- [18] D.J. Commerci, G.D. Pollevick, A.M. Vigliocco, A.C. Frasci, R.A. Ugalde, Vector development for the expression of foreign proteins in the vaccine strain *Brucella abortus* S19, *Infect. Immun.* 66 (1998) 3862–3866.
- [19] J.V. Sabio y Garcia, M. Farber, M. Carrica, S. Cravero, G.C. Macedo, F. Bigi, S.C. Oliveira, O. Rossetti, E. Campos, Expression of *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 (RAP1) in *Brucella abortus* S19, *Microbes Infect.* 10 (2008) 635–641.
- [20] M.E. Kovach, R.W. Phillips, P.H. Elzer, R.M. Roop 2nd, K.M. Peterson, pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector, *BioTechniques* 16 (1994) 800–802.
- [21] E. Campos, S.L. Cravero, L. Delgui, I. Mora, N. Kahn, A.I. Arese, O.L. Rossetti, *Brucella abortus* INTA2, a novel strain 19 (Delta)bp26::luc (Delta)bmp18 double mutant lacking drug resistance markers, *Vet. Microbiol.* 87 (2002) 1–13.
- [22] M.L. Boschioli, S.L. Cravero, A.I. Arese, E. Campos, O.L. Rossetti, Protection against infection in mice vaccinated with a *Brucella abortus* mutant, *Infect. Immun.* 65 (1997) 798–800.
- [23] M.P. Santangelo, D. McIntosh, F. Bigi, G.R. Armoa, A.S. Campos, P. Ruybal, O.A. Dellagostin, J. McFadden, T. Mendum, B. Gicquel, N. Winter, M. Farber, A. Cataldi, *Mycobacterium bovis* BCG as a delivery system for the RAP-1 antigen from *Babesia bovis*, *Vaccine* 25 (2007) 1104–1113.
- [24] R.G. Hewinson, H.M. Vordermeier, N.H. Smith, S.V. Gordon, Recent advances in our knowledge of *Mycobacterium bovis*: a feeling for the organism, *Vet. Microbiol.* 112 (2006) 127–139.
- [25] M. Inukai, M. Nakajima, M. Osawa, T. Haneishi, M. Arai, Globomycin, a new peptide antibiotic with spheroplast-forming activity. II. Isolation and physico-chemical and biological characterization, *J. Antibiot. (Tokyo)* 31 (1978) 421–425.
- [26] D.J. Harrington, J.S. Greated, N. Chanter, I.C. Sutcliffe, Identification of lipoprotein homologues of pneumococcal PsaA in the equine pathogens *Streptococcus equi* and *Streptococcus zooepidemicus*, *Infect. Immun.* 68 (2000) 6048–6051.
- [27] J.C. Hope, B. Villarreal-Ramos, Bovine TB and the development of new vaccines, comparative immunology, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 31 (2008) 77–100.
- [28] M.A. Fiorentino, E. Campos, S. Cravero, A. Arese, F. Paolicchi, C. Campero, O. Rossetti, Protection levels in vaccinated heifers with experimental vaccines *Brucella abortus* M1-luc and INTA 2, *Vet. Microbiol.* 132 (2008) 302–311.