

01694



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**ELABORACIÓN DE UN INMUNÓGENO
EXPERIMENTAL CONTRA LA
BORDETELOSIS DE LOS PERROS**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

FRANCISCO JAVIER BASURTO ALCÁNTARA

TUTOR PRINCIPAL

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO

COMITÉ TUTORAL

DR. GILBERTO CHÁVEZ GRIS
DRA. CLARA INÉS ESPITIA PINZÓN
DR. FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES
DR. ANTONIO VERDUGO RODRIGUEZ

MÉXICO , D.F., ENERO DE 2005

m.340298



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A mis padres Sr. Rodolfo Basurto Victoria y Sra. Guadalupe Teresa Alcántara Olalde por haberme dado la vida y educación

A mi esposa Ady Marucia Ángel Cárdenas por su amor y por darme a los dos seres que más quiero en esta vida. Te amo.

A mis hijas Ady Marucia y América Itzel Basurto Ángel, L Q M Y S U M M.
Deseo que siempre sean felices y que siempre se apoyen mutuamente.

A mis amigos y amigas por su cariño, apoyo y comprensión.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: FRANCISCO JAVIER
BASURTO ALCANTARA

FECHA: 25/01/05

FIRMA: 

"El ideal, no es una vida sin dificultades. La verdadera meta de la vida, por lo que vale la pena de vivir, es el don de uno mismo a los demás"

Louis Pasteur

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con los proyectos: IN213198 e IN205701.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de la beca para estudios de posgrado.

A los miembros del honorable jurado:

Presidente: Dr. Francisco Suárez Gñemes
Vocal: Dra. Clara Inés Espitia Pinzón
Vocal: Dr. Gilberto Chávez Gris
Vocal: Dr. Tamas Fehervari Bone
Secretario: Dr. Antonio Verdugo Rodríguez
Suplente: Dra. Gabriela Bárcenas Morales
Suplente: Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo

Un agradecimiento muy especial a mi amigo y tutor Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo por su amistad, confianza y apoyo.

A la MVZ Aurora Velázquez Echegaray por creer siempre en mí.

A las MVZ's Laura Patricia Noé Martínez e Hilda Castro Gámez por todo lo que aprendí de ellas durante este proceso.

A mis amigos y miembros del comité tutorial, Drs. Antonio Verdugo Rodríguez y Gilberto Chávez Gris por estar siempre pendientes de los avances de este trabajo.

Al Dr. Luis Alberto Zarco Quintero por todo el apoyo otorgado para la realización de estudios de posgrado así como por todo lo que aprendí en las sesiones del H. Consejo Técnico.

Al Dr. Javier Flores Covarrubias por su amabilidad y atención en la tramitología escolar del posgrado.

Al MVZ M en C Rigoberto Hernández Castro por su colaboración en el proceso de amplificación, clonación y expresión del gen *prn*.

A la MVZ Esp. María Cristina Rodríguez Sánchez por su asesoría y apoyo en la realización de las pruebas de identificación bacteriana así como en las pruebas de pureza de los inmunógenos e inóculos de desafío.

Al MVZ Daniel Martínez Gómez por su apoyo en la implementación de la prueba de ELISA.

A la MVZ M en C Estela Teresita Méndez Olvera por su apoyo en el proceso de cultivo de células HeLa.

A la PQFB María Eugenia Rosales por su colaboración en la realización de las pruebas de desafío.

Al MVZ Daniel Atilano López por su apoyo y estar siempre en disposición de ayuda.

Al todo el equipo de los "Leptospirines", Alex, Armando, Érika, Rodrigo, Jorge Alejandro, Olivia, José Manuel y Raquel por el apoyo y compañía brindados.

A los Sres. Mario Cruz Cruz, Raúl Hernández Aragón y Pablo Vera Sánchez. Por su apoyo en la preparación de reactivos y materiales.

A todo el personal de Holland de México SA de CV por todo el apoyo que me dieron durante mi formación.

A todos aquellos que participaron, directa o indirectamente, en la realización de este trabajo.

A todo aquel que se digne a leer este trabajo

"La verdadera amistad es la que sigue a tu lado incluso cuando no te queda nada por ofrecer, salvo tu compañía"
Anónimo

Índice de CUADROS Y FIGURAS

Cuadro	Título	Página
1	Propiedades de las especies de <i>Bordetella</i>	71
2	Cepas y vectores utilizados en este trabajo	72
3	Iniciadores para secuenciación del inserto en el pBH7	73
4	Distribución de los ratones en los lotes de experimentación con los diferentes inmunógenos elaborados en este trabajo.	74
5	Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la pertactina de <i>Bordetella bronchiseptica</i> P98 con las secuencias registradas en el <i>GenBank</i> .	75

Figura	Título	Página
1	Estructura y ensamble de las proteínas del sistema de secreción tipo III	77
2	Estructura y ensamble de las proteínas del sistema de secreción tipo IV	78
3	Composición química de la citotoxina traqueal	79
4	Estructura de la PERTACTINA de <i>Bordetella</i>	80
5	Ciclo de vida de la células dendríticas y su participación en los procesos de Inmunidad Innata y Adquirida.	81
6	Curva de la cinética de crecimiento de <i>B. bronchiseptica</i>	82
7	Fotografía del gel de agarosa con la amplificación del gen de la pertactina de <i>B. bronchiseptica</i> mediante la PCR.	83
8	Fotografía del gel de agarosa con la purificación del amplificado del gen <i>prn</i> de <i>B. bronchiseptica</i> que se obtuvo mediante la PCR	84
9	Mapa del pBH7.	85
10	Mapa del pBH7E9.	86
11	Mapa del pBH7D46	87
12	Mapa del pBH7E2 y 3	88
13	Simulación de migración electroforética del análisis de restricción con los plásmidos pBH7E2, pBH7E3 y pBH7E9.	89

14	Simulación de migración electroforética del análisis de restricción con el plásmido pBH7D46 y pVAX con las enzimas <i>EcoRV</i> y <i>EcoRI</i>	90
15	Fotografía del gel de agarosa con el análisis de restricción de los plásmidos pBH7E2 y pBH7E3	91
16	Fotografía del gel de agarosa con el análisis de restricción del plásmido pBH7E9	92
17	Fotografía del gel de agarosa con el análisis de restricción del plásmido pBH7D46	93
18	Estructura tridimensional de la pertactina de <i>B. bronchiseptica</i> cepa P98	94
19	Empalme del modelo tridimensional de la pertactina de <i>Bordetella pertussis</i> con la pertactina de <i>B. bronchiseptica</i> P98	95
20	Autoagregación bacteriana de los cultivos de <i>E. coli</i> transformada con el pBH7E9 e inducida con IPTG.	96
21	Micrografías de la autoagregación bacteriana de <i>E. coli</i> transformadas con el pBH7E9 inducida con IPTG	97
22	Inmunoblot con anticuerpos policlonales contra <i>B. bronchiseptica</i> y <i>Bordetella pertussis</i>	98
23	Polimorfismo electroforético de las diferentes cepas de <i>E. coli</i> transformadas con los vectores desarrollados en este trabajo y sin transformar	99
24	Reacción tipo Western blot con suero de ratón contra <i>B. bronchiseptica</i> y conjugado anti IgG de ratón.	100
25	Polimorfismo electroforético de las proteínas obtenidas de los cultivos de células HeLa transfectadas con el pBH7D46 y sin vector	101
26	Reacción tipo Western blot con el sobrenadante del cultivo de células HeLa transfectados con el pBH7D46 y que reaccionaron con un antisuero de ratón contra <i>B. bronchiseptica</i> y conjugado anti Ig's de ratón.	102
27	Grafica de calibración de la prueba de ELISA con proteínas de membrana externa de <i>B. bronchiseptica</i>	103
28	Grafica de calibración de la prueba de ELISA con proteínas totales de <i>B. bronchiseptica</i>	104
29	Evaluación de respuesta a la vacunación. Método ELISA con Proteínas totales de <i>B. bronchiseptica</i> como antígeno de captura	105

30	Evaluación de respuesta a la vacunación. Método ELISA con Proteínas de membrana externa de <i>B. bronchiseptica</i> como antígeno de captura	106
31	Evaluación de la respuesta inmunitaria humoral durante el proceso de desafío. Método ELISA con proteínas totales de <i>B. bronchiseptica</i> como antígeno de captura	107
32	Evaluación de la respuesta inmunitaria humoral durante el proceso de desafío. Método ELISA con proteínas de membrana externa de <i>B. bronchiseptica</i> como antígeno de captura	108
33	Cuantificación de las unidades formadoras de colonia recuperadas de pulmón de los ratones vacunados y desafiados	109

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Di-fosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
Amp	Ampicilina
<i>amp^r</i>	Gen de resistencia a ampicilina
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Tri-fosfato de adenosina
BHI	<i>Brain hearth infusion</i> ; Infusión cerebro corazón
BipA	<i>Bvg-intermediate phase protein A</i> ; proteína A de la fase intermedia del sistema <i>bvg</i>
Brk	<i>Bordetella resistance killing</i> ; gen que confiere resistencia a la destrucción por complemento
<i>bvg</i>	<i>Bordetella virulence gene</i> ; gen regulador de la virulencia de <i>Bordetella</i>
BvgA	Proteína activadora del sistema <i>bvg</i>
BvgR	Proteína represora del sistema <i>bvg</i>
BvgS	Proteína sensor del sistema <i>bvg</i>
Cm	Cloramfenicol
DNT	Dermonecrotoxina
EDTA	Etilendiaminotetraacetato de sodio
Fc γ	Fracción cristalizable γ
<i>fim</i>	Gen que codifica para las proteínas de la fimbria
Fim 2, 3, X, A	Proteínas 2, 3, X y A de la fimbria
GGXXP	2 glicinas, 2 aminoácidos variables y 1 prolina
Gly	Glicina
IFN	Interferón
Ig's	Inmunoglobulinas
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleucina
IPTG	isopropil-beta-D-thiogalactopiranósido
IRES	<i>internal ribosome entry site</i> ; sitios internos de entrada del ribosoma
kDa	Kilodaltones

Km	Kanamicina
<i>km^r</i>	Gen de resistencia a kanamicina
LB	Luria-Bertani
Lf	Lactoferrina
LPS	Lipopolisacárido
LTh1, LTh2	Linfocitos T cooperadores del subgrupo 1 y 2
M	Molar
µg	Microgramo
mL	Mililitro
µl	Microlitro
NFκB	Factor nuclear kappa B
OF	Prueba para identificación bacterina que detecta oxidación fermentación de un azúcar
ORF	<i>Open reading frame</i> ; marco abierto de lectura
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PME	Proteínas de membrana externa
PQP	Prolina-Glutamina-Prolina
Prn	Pertactina
<i>pm</i>	Gen de pertactina
Pro	Prolina
PT	Proteínas totales
RGD	Arginina, glicina, ácido aspártico
RisA	Proteína Activadora del sistema <i>ris</i>
<i>risAS</i>	Genes del sistema de resistencia al estrés oxidativo intracelular
RisS	Proteína sensora del sistema <i>ris</i>
SDS	Dodecil-sulfato de sodio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida con SDS
SIM	Prueba bioquímica que detecta la producción de ácido sulfhídrico, indol y motilidad en las bacterias
SST3	Sistema de secreción tipo III
SST4	Sistema de secreción tipo IV
Tcf	<i>Tracheal colonization factor</i> ; factor de colonización traqueal
TE	Solución amortiguadora de Tris-EDTA
Tf	Transferrina
TLR	Receptor tipo toll

TNF	Factor de necrosis tumoral
TSI	Medio de cultivo para identificación bacteriana elaborado a base de tres azúcares y hierro (tri-sugar-iron)
Txp	Toxina pertussis
UFC	Unidades formadoras de colonias
uORF	<i>upstream open reading frame</i> ; marco abierto de lectura ubicado río arriba
UTR	<i>Untranslate region</i> ; sitio de una secuencia de nucleótidos sin traducción
<i>vag</i>	<i>Virulence activated gene</i> ; gen activado de virulencia
Vag8	Proteína 8 del sistema <i>vag</i>
<i>vir</i>	Gen <i>virulence</i>
x g	Gravedades
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

Índice

Unidad	Tema	Página
1.	Introducción	1
1.1	Consideraciones históricas del género <i>Bordetella</i>	2
1.2	Marco Teórico	3
1.2.1	Taxonomía	3
1.2.2	Género <i>Bordetella</i>	4
1.2.3	Metabolismo	4
1.2.4	Características de cultivo	5
1.3	Marco referencial	5
1.3.1	Factores de virulencia	5
1.3.2	Patogénesis molecular de la bordetelosis	8
1.3.3	Moléculas antigénicas del género <i>Bordetella</i>	11
1.3.4	Inmunidad innata en el aparato respiratorio	12
1.3.5	Inmunidad adquirida contra <i>Bordetella</i>	15
2	Justificación	17
3	Hipótesis	19
4	Objetivos	21
4.1	Objetivo general	22
4.2	Objetivos específicos	22
5	Materiales y métodos	23
5.1	Cepas y vectores	24
5.1.1	Obtención de la cepa de <i>B. bronchiseptica</i>	24
5.1.2	Determinación de la cinética de crecimiento de la cepa de <i>B. bronchiseptica</i>	25
5.2	Extracción de ADN y plásmidos	25
5.3	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	26
5.4	Clonación del gen <i>prn</i>	27
5.5	Subclonación del gen <i>prn</i> para la expresión de proteínas	27
5.6	Subclonación del <i>prn</i> para la elaboración de una vacuna de ADN	28
5.7	Secuenciación	28
5.8	Expresión de proteínas	28
5.8.1	En <i>Escherichia coli</i>	28
5.8.2	En cultivo de células HeLa	29
5.9	Extracción de proteínas	29

5.9.1	Obtención de un extracto de proteínas totales de <i>B. bronchiseptica</i>	29
5.9.2	Obtención de un extracto de proteínas de membrana externa de <i>B. bronchiseptica</i>	30
5.9.3	Obtención de un extracto de proteínas totales de <i>E. coli</i> con pertactina recombinante	30
5.9.4	Obtención de proteínas recombinantes a partir del sobrenadante del cultivo de células HeLa transfectadas con el pBH7D46	30
5.10	Cuantificación de proteínas	31
5.11	Análisis de proteínas	31
5.11.1	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)	31
5.11.2	Análisis por inmunotransferencia tipo Inmunoblot y <i>Western blot</i>	31
5.12	Elaboración de los inmunógenos experimentales	32
5.12.1	Preparación de una bacterina de <i>B. bronchiseptica</i>	32
5.12.2	Preparación de la vacuna de ADN para la inoculación en ratones	33
5.12.3	Preparación de una vacuna acelular con <i>e. coli</i> transformada con el vector pBH7E9	34
5.12.4	Preparación de una bacterina de <i>E. coli</i> sin plásmido de expresión	34
5.13	Evaluación de la eficacia de los inmunógenos experimentales	34
5.13.1	Inmunización de los animales	34
5.13.2	Toma de muestras de suero	35
5.13.3	Desafío de los animales vacunados	35
5.14	Estandarización del método de inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) para la titulación de anticuerpos contra proteínas de <i>B. bronchiseptica</i>	35
5.14.1	Preparación del antígeno	35
5.14.2	Unión del antígeno a la fase sólida	36
5.14.3	Titulación de los sueros testigo positivo para la estandarización de la técnica de ELISA	36
5.14.4	Metodología de la prueba de ELISA	37
5.14.6	Evaluación de los resultados de la prueba de ELISA	37
5.15	Determinación de las unidades formadoras de colonia en pulmones de ratones vacunados y desafiados	37
6	Resultados	39
6.1	Curva de crecimiento de <i>B. bronchiseptica</i>	40

6.2	Extracción de ADN	40
6.3	PCR	40
6.4	Clonación y análisis de secuencia	41
6.5	Inducción de la síntesis de proteínas	43
6.6	Análisis por inmunotransferencia tipo Inmunoblot y <i>Western blot</i>	44
6.7	Estandarización de la técnica de ELISA para la cuantificación de anticuerpos contra <i>B. bronchiseptica</i>	44
6.8	Evaluación de la respuesta inmunitaria humoral a la vacunación y al desafío	45
7	Discusión	47
8	Conclusiones	58
9	Referencias	60
10	Cuadros	70
11	Figuras	76

Carta de aceptación del artículo "Clonación, secuenciación y expresión del gen de pertactina de *B. bronchiseptica* de origen canino", en la revista "Veterinaria México"

Anexo I Metodologías

Anexo II Medios de cultivo

Anexo III Preparación de soluciones y reactivos

RESUMEN

ELABORACIÓN DE UN INMUNÓGENO EXPERIMENTAL CONTRA LA BORDETELOSIS DE LOS PERROS.

Francisco Javier Basurto Alcántara

Tutor Principal: Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo

La Bordetelosis es una enfermedad infecciosa que afecta a los animales y al humano. Las bacterias del género *Bordetella* producen lesiones en los tejidos por la activación de diversos factores de patogenicidad, de los cuales, uno de los más importantes, es la pertactina. En este trabajo se elaboraron inmunógenos experimentales utilizando a la pertactina (Prn) para evaluar la inmunidad contra *B. bronchiseptica* en un modelo murino. El gen de la pertactina de *B. bronchiseptica* fue clonado y secuenciado, asimismo, con este gen, se construyeron los vectores pBH7, el pBH7E9 y el pBH7D46. La expresión de la proteína se realizó en *E. coli* y en cultivos de células HeLa. La proteína recombinante fue detectada utilizando anticuerpos monoclonales contra la pertactina y policlonales contra *B. bronchiseptica* y *B. pertussis*. Los inmunógenos consistieron en un extracto de proteínas totales de *E. coli* con el vector pBH7E9 y una vacuna de ADN constituida por el pBH7D46. La respuesta inmunitaria humoral de los ratones vacunados y desafiados se evaluó mediante la técnica de ELISA y se comparó contra la respuesta inmunitaria generada en los ratones inmunizados con una bacterina de *B. bronchiseptica* con adyuvante, así como con los testigos negativos. Además, en los ratones desafiados, se cuantificaron las unidades formadoras de colonias (UFC) recuperadas de los pulmones en diferentes tiempos de muestreo. En la prueba de ELISA para detectar anticuerpos en los ratones vacunados con los diferentes inmunógenos, no se observaron diferencias significativas de los valores de absorbancia obtenidos de los sueros de ratones vacunados con la pertactina recombinante contra los vacunados con la bacterina de *B. bronchiseptica* ni con los testigos negativos, pero se observaron diferencias significativas entre los inmunizados con la bacterina de *B. bronchiseptica* y los testigos negativos. Al cuantificar las UFC de los pulmones de los ratones vacunados y desafiados, se observó que sólo los ratones vacunados con pertactina recombinante y la bacterina de *B. bronchiseptica* disminuyeron el número de UFC= 0 en los días 16 y 21 respectivamente, se observaron diferencias significativas en los valores de los conteos obtenidos de los ratones inmunizados con la pertactina recombinante con relación a los ratones inmunizados con la bacterina de *B. bronchiseptica*, vacuna de ADN y testigos negativos. La secuencia nucleotídica del gen de la pertactina presentó 96% de identidad con otras secuencias de pertactina reportadas en el *GenBank* y el análisis de la secuencia reveló la presencia de dos regiones de repeticiones variables así como el dominio RGD de unión a células epiteliales. La secuencia de aminoácidos de la pertactina de *B. bronchiseptica* de origen canino presentó una homología del 89% con la pertactina de *B. pertussis*. Esta misma situación fue observada al obtener la conformación tridimensional con ambas proteínas. La pertactina recombinante no produjo el mismo título de anticuerpos que el generado por los ratones inmunizados con la bacterina de *B. bronchiseptica* pero sí indujo protección contra *B. bronchiseptica* al momento del desafío. Se logró la transfección de cultivos de células HeLa con la vacuna de ADN, asimismo, el gen *prn* acarreado por el pBH7D46, indujo la síntesis de proteínas en el cultivo in vitro, pero no estimuló una respuesta humoral detectable ni generó una respuesta protectora contra la infección por *B. bronchiseptica* en los ratones vacunados.

El presente trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con los proyectos: IN213198 e IN205701.

Palabras clave: *Bordetella bronchiseptica*, pertactina, recombinante PCR, clonación, vacuna acelular, vacuna ADN, vector.

SUMMARY

ELABORATION OF AN EXPERIMENTAL VACCINE AGAINST CANINE BORDETELOSIS

Francisco Javier Basurto Alcántara

Thesis director: Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo

Bordetellosis is an infectious disease affecting animals and humans. Bacterium of the genus *Bordetella* produce damage in tissues due to the activation of several virulence factors, among them pertactin (Prn). In this work experimental immunogens prepared with Prn were tested against *B. bronchiseptica* infection in a murine experimental model. The pertactin gene from *B. bronchiseptica* was cloned and sequenced, also, with this gene, the vectors pBH7, pBH7E9 and pBH7D46 were built. Protein expression was carried out in *E. coli* and HeLa cells. The recombinant protein was detected using monoclonal antibodies to Prn and polyclonal antisera against *B. bronchiseptica* and *B. pertussis*. Experimental immunogens consisted of a protein extract of transformed *E. coli* and a DNA vaccine prepared with the pBH7D46 vector. To evaluate the protective effect of the immunogens, mice were sacrificed at different time intervals and the CFU of *B. bronchiseptica* in their lungs were determined. In the ELISA test no significant differences were observed between sera from mice immunized with recombinant Prn and mice immunized with a *B. bronchiseptica* bacterin or non immunized mice; but significant differences were observed between mice immunized with the bacterin of *B. bronchiseptica* and the non immunized controls. When the sera was studied after challenge, significant differences were observed between mice immunized with recombinant Prn or the bacterin and mice immunized with the DNA vaccine or non immunized. With respect to bacterial load in the lungs only mice vaccinated with recombinant Prn or the bacterin eliminated the infection at days 16 and 21 respectively. The Prn gene nucleotide sequence presented 96% identity with other Prn sequences in the GenBank; the sequence analysis revealed the presence of two variable regions as well as the epithelial cells RGD union dominion. The amino acid sequence of *B. bronchiseptica* Prn presented a 89% homology with Prn from *B. pertussis*. The same situation was observed when the tridimensional structure was compared for both proteins. Transfection of HeLa cells was achieved with the DNA vaccine and the Prn gene transported in the pBH7D46 induced protein synthesis *in vitro*. However the DNA vaccine did not stimulate a detectable humoral response neither generated a protective response against *B. bronchiseptica* challenge.

This work was financed by the Program for Support to Research and Technological Innovation Projects (PAPIIT) with the projects: IN213198 e IN205701.

Keywords: *Bordetella bronchiseptica*, recombinant pertactin, PCR, clonation, acelular vaccine, DNA vaccine, vector.

1. Introducción

*“Todos somos ignorantes, lo que sucede es que no somos ignorantes
en las mismas cosas”
Albert Einstein*

1.1. Consideraciones históricas del género *Bordetella*.

La tos ferina es una de las enfermedades causadas por bacterias del género *Bordetella*. Fue descrita por primera vez en 1640 por el médico francés Baillou, quien ya había reportado las características epidémicas de la enfermedad con la descripción de los síntomas desde 1578 (1;1).

Bordetella pertussis es el agente etiológico de la Tos ferina, es altamente contagioso en niños. Su adaptación como patógeno sólo ha sido comprobada en humanos y no hay evidencia de que afecte a otras especies animales ni que haya algún reservorio natural para esta especie de *Bordetella* (1;1). La tos ferina se caracteriza por una infección en el tracto respiratorio medio y superior con la colonización del epitelio ciliado (2) El desarrollo de los síntomas de la enfermedad es gradual y auto limitante. (2;2)Se puede detectar una leucocitosis con linfocitosis en la fase paroxística de la enfermedad(2;2). Entre las complicaciones puede haber el desarrollo de una bronconeumonía con encefalopatía(1;2;2). Comparada con otras enfermedades, tales como la difteria y el tétanos las cuales fueron descritas por Hipócrates, la tos ferina tiene una historia corta. Aunque hay una sintomatología bien definida de la enfermedad, no existen reportes anteriores al siglo XVI, por lo que se sospechó que era una enfermedad con un origen reciente (1).

La identificación del agente etiológico de la tos ferina fue hecha por diferentes investigadores a finales del siglo XIX, pero el aislamiento se logró hasta el año 1904 por Bordet y Gengou durante la fase catarral de la enfermedad. *Bordetella bronchiseptica* fue aislada en 1910 mientras que *Bordetella parapertussis* se le aisló hasta 1937. Durante los estudios relacionados con los aislamientos, los microorganismos fueron identificados con diversos nombres; sin embargo, se les asigna el nombre de *Bordetella* hasta 1952 en honor a Jules Bordet (1).

Parkhill *et al.*, en Agosto de 2003, reportaron la secuencia del genoma de *B. bronchiseptica*, *B. pertussis* y *B. parapertussis* (3); al hacer el análisis filogenético de las tres especies, demostraron que, tanto *B. pertussis* como *B. parapertussis* derivan de manera independiente de un ancestro de *B. bronchiseptica-like* (3;3;4;4).

Bordetella parapertussis es también un patógeno adaptado al humano. Produce un cuadro similar al producido por *B. pertussis*; sin embargo, no produce linfocitosis. A diferencia de la especie *pertussis*, *B. parapertussis* sí puede afectar a otra especie animal que son los ovinos, en los cuales llega a predisponer a neumonías, cuando la infección primaria es causada por otros patógenos como *Mannheimia haemolytica* (5).

Bordetella bronchiseptica afecta las vías respiratorias de un amplio número de especies animales, entre los que se incluyen: ratones, ratas, cobayos, cerdos, conejos, gatos, perros, borregos, caballos y osos (1;6;7). *Bordetella bronchiseptica*, como agente primario o secundario, produce enfermedades respiratorias en animales, entre las que se encuentran: tos de las perreras, neumonía en conejos, rinitis atrófica del cerdo, rinitis con estornudos en gatos, neumonía en potros (1;8;8); sin embargo, las infecciones por *B. bronchiseptica*, en su gran mayoría pueden pasar como asintomáticas. Por otro lado, este género bacteriano se puede comportar como un comensal de vías respiratorias. Los animales que padecen una enfermedad por *B. bronchiseptica*, y se recuperan de ella, con o sin tratamiento, quedan como portadores crónicos asintomáticos (1).

En humanos se han documentado problemas respiratorios asociados a la infección por *B. bronchiseptica*; sin embargo, la mayoría ocurren en pacientes inmunocomprometidos graves (4;6;9-14).

1.2. Marco Teórico

1.2.1. Taxonomía

La clasificación taxonómica de las bacterias del género *Bordetella* es la siguiente:

Reino: Monera

Súper-reino: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Clase: Betaproteobacteria

Orden: Burkholderiales

Familia: Alcaligenaceae

Género: *Bordetella*

Especies: *bronchiseptica*, *pertussis*, *parapertussis*, *avium*, *hinzii*, *holmeii*, *petrii*, *trematum*

1.2.2. Género *Bordetella*

Las bacterias pertenecientes al género *Bordetella* son pequeñas (0.2X0.7 μm), pleomórficas que regularmente se les observan como cocobacilos o bacilos cortos, son aerobias (con excepción de *Bordetella petrii*, la cual es anaerobio facultativo), Gram negativas (3;15). Se han identificado ocho especies, las cuales son: *B. pertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis*, *Bordetella avium*, *Bordetella hinzii*, *Bordetella holmei*, *Bordetella trematum* (15) y *B. petrii* (16). Las especies más estudiadas han sido *B. pertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis* (3).

En el cuadro 1 se muestran las principales características biológicas, genéticas y bioquímicas del género *Bordetella*.

1.2.3. Metabolismo

Bordetella bronchiseptica es capaz de resistir en un medio ambiente con más de un 60% de humedad relativa, incluso, puede sobrevivir en agua simple hasta por 52 semanas¹ mientras que *B. pertussis* y *B. parapertussis* no pueden permanecer viable por largos periodos fuera de un hospedero. A pesar de esta diferencia, las tres especies de *Bordetella* poseen las rutas metabólicas para la biosíntesis de nucleótidos, cofactores y aminoácidos(1). *Bordetella* no utiliza a los azúcares como fuente de carbono, lo cual, probablemente se deba a que carecen de los factores que codifican para el metabolismo de azúcares como la glucocinasa, la fosfofructocinasa y la fructosa 1,6 bis-fosfatasa. El género *Bordetella* tiene en su genoma los factores que codifican para las rutas metabólicas de la gluconeogénesis (1). *Bordetella* es auxótrofa para la cisteína; sin embargo, puede utilizar la cisteína del medio de cultivo como una fuente de azufre más que de carbono (1;17). Se ha reportado que el ciclo de los ácidos tricarbóxicos no es funcional en el género *Bordetella*, esta afirmación se basa en que la Acetil Coenzima A y el Oxaloacetato no incrementan la concentración del α -cetoglutarato así como la incapacidad de la bacteria para utilizar la glucosa del medio de cultivo (1;3;17); sin embargo, posee los genes que codifican para las enzimas de este ciclo metabólico (1;3).

¹ Brad Fenwick, comunicación personal

1.2.4. Características de cultivo

Los medios de cultivo para *Bordetella* son el agar Bordet-Gengou, el cual es elaborado con una infusión de papa, glicerol y sangre desfibrinada de conejo, borrego o caballo. Este medio se utiliza en el primoaislamiento de *Bordetella pertussis*; por otro lado, se ha empleado el medio Steiner-Scholte (SS) para la elaboración de la bacterina-toxoide de *Bordetella pertussis* ya que un litro de medio produce 2 g de peso seco de bacterias y de 5-10 mg de toxina (17). La adición de ácidos grasos libres no tiene un efecto inhibitorio para la bacteria, por el contrario, su adición al medio incrementa la densidad bacteriana (17). Este medio tiene como base el glutamato como fuente de carbono debido a las deficiencias metabólicas antes descritas para la glucosa (17). El agar McConkey se utiliza en el primoaislamiento de *B. bronchiseptica* y *B. parapertussis* (1); mientras que para *B. pertussis* y *B. parapertussis* se ha utilizado el medio enriquecido-selectivo Regan-Lowe, el cual también ha sido empleado para el transporte de muestras. Este medio emplea la Cefalexina como agente selectivo para inhibir el crecimiento de flora normal sin afectar el desarrollo de *Bordetella* (18).

1.3. Marco referencial

1.3.1. Factores de virulencia

Las bacterias del género *Bordetella* utilizan diversos factores de virulencia para interaccionar con las células del hospedero. Estos factores son codificados por genes de virulencia, los cuales pueden ser regulados por otros genes o expresarse de manera independiente. Pueden ser productos de secreción o moléculas de superficie.

Los factores que han sido identificados como moléculas de adhesión son la hemoaglutinina filamentosa, la fimbria, la pertactina (Prn) y el lipopolisacárido (LPS) (19-22). Entre las toxinas que producen algunas especies de *Bordetella* están la citotoxina traqueal, la hemolisina-adenilato ciclasa, la Dermonecrotoxina (DNT) y la Toxina de *pertussis*, ésta última sólo es producida por *B. pertussis* (1). Todos estos factores de virulencia, con excepción de la citotoxina traqueal, son regulados positivamente por el sistema BvgAS (*Bordetella virulence gene A, S*), este sistema, se compone de dos proteínas una es la BvgS y la BvgA, las que son codificadas por el gen *bvgAS*. La proteína BvgS es una molécula de 135 kDa que se encuentra en la membrana citoplasmática, utiliza un

mecanismo cinasa-sensor y tiene tres dominios de transferencia de fósforo mientras que BvgA es una proteína citoplasmática que posee 4 dominios de transferencia de fósforo (15).

En condiciones de cultivo a 37 °C en ausencia de MgSO₄ o ácido nicotínico el sistema BvgAS libera el fósforo de sus dominios y *Bordetella* pasa a la fase *bvg+*, con esto, el extremo carboxilo terminal de la proteína BvgA interacciona con la subunidad α de la ARN polimerasa para iniciar la transcripción de los factores de virulencia (15).

Por otro lado, existe otro mecanismo regulador de factores de virulencia, el cual está dado por el locus *vir* (*virulence*). Este locus promueve la expresión de cuatro factores de virulencia en condiciones normales de laboratorio, pero no en presencia de moduladores como el MgSO₄ o el ácido nicotínico (23). Estos factores de virulencia son: el factor de colonización traqueal (Tcf: *Tracheal colonization factor*), el factor de resistencia a la lisis por complemento (Brk: *Bordetella resistance killing*), la Prn y la proteína Vag8 (*virulence activated gene*) (15;23)

Durante la fase *bvg+* ocurre la represión de otros genes como los asociados a la motilidad, la producción de sideróforo, enzimas respiratorias y de metabolismo biosintético. La represión de estos genes es controlada por el sistema BvgR, el cual se encuentra río abajo del locus *bvgAS*(15)

La fase *bvg-* se expresa cuando *Bordetella* crece bajo mecanismos de modulación como la adición de ≥ 40 mM MgSO₄, ≥ 10 mM de ácido nicotínico o incubación a 25° C (15), durante esta fase ocurren la expresión de otras proteínas, especialmente aquellas destinadas al metabolismo bacteriano y a la motilidad (24;25).

A diferencia de *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis*, se sabe que *B. bronchiseptica* puede invadir a los macrófagos aún cuando la bacteria se encuentra en la fase *bvg-* esto se ha asociado a la presencia de otro sistema de regulación independiente que es el sistema *risAS* (*resistance intracellular oxidative stress*) (26). Este sistema produce dos proteínas, la RisA y la RisS; las cuales son esenciales para la síntesis de fosfatasa ácida, con la cual los fagosomas se acidifican e inhiben a los productos del metabolismo oxidativo de las células fagocíticas profesionales no activadas (27), además promueven la invasión a células epiteliales (27;28).

Existe una fase entre la *bugAS*⁺ y la *bugAS*⁻ que es identificada como la *bugAS* o fase intermedia. Durante esta fase se produce otro tipo de proteínas como la BipA (*Bug-intermediate phase protein A*) (29), a la cual se le han detectado funciones de adhesina, asimismo se le ha relacionado con la autoagregación de *Bordetella* en cultivo (29;30).

La secreción de toxinas se puede dar por el sistema de secreción tipo V (Prn) o por el sistema de secreción tipo III (SST3) (19).

El sistema de secreción tipo V se caracteriza por proteínas con función de auto-transportador localizado en la membrana externa. Estas proteínas presentan en general las siguientes características: 1. poseen un péptido líder con el cual se favorece la secreción de la molécula a través de la membrana interna, 2. la proteína madura se caracteriza por tener un pasaje de secreción, 3. un dominio carboxilo terminal con el cual se forma un poro en la membrana externa; asimismo se considera que el paso de las moléculas a través de esta proteína es independiente del gasto de energía (19).

El SST3 ha sido detectado en diversas bacterias gram negativas, este sistema está compuesto, en la mayoría de los casos, por 12 proteínas; sin embargo, en *Bordetella bronchiseptica* se han identificado a la fecha 9 polipéptidos y 22 genes (31). Su función es el equivalente al de una aguja de jeringa que permite a *Bordetella* translocar las toxinas directamente en el medio, membrana citoplasmática o en el citosol de la célula blanco (Figura 1). Los genes que codifican para las proteínas del SST3 en otros sistemas son *bscJ**bscK**bscL* *bscN**bscO**bscP**bscQ**bscR**bscS**bscT**bscU*. Aunque están diferenciadas en bloques, estos se encuentran juntos en el genoma de *Bordetella*. La *bscN* es regulada por el sistema *bugAS* y junto con *bscQ**bscR**bscS* son las proteínas mejor conservadas del sistema, mientras que *bscO* y *bscP* tienen la menor homología con relación al SST3 de otras bacterias (15;32;33).

Bordetella pertussis posee además del SST3 un sistema de secreción tipo IV (SST4) (Figura 2) con el cual secreta la toxina pertussis, este sistema es semejante al SST3 pero es más complejo. La toxina pertussis es dependiente del sistema de secreción *sec*. No se sabe si el SST4 de *B. pertussis* es normal o su función está modificada con relación a otros sistemas de secreción, ya que en lugar de depositar la toxina dentro de la célula, la vierte al espacio periplásmico.

1.3.2. Patogénesis molecular de la bordetelosis

Bordetella bronchiseptica ha mostrado tener la capacidad de adherirse, invadir y persistir intracelularmente por largos periodos en vías respiratorias así como en diversas líneas de células eucarióticas; también, es capaz de producir necrosis y apoptosis de epitelios y macrófagos respectivamente (34). Estas propiedades están asociadas a las interacciones de los diferentes factores de virulencia, los cuales, son un producto de la adaptación a diversos estados ambientales donde se desarrolla *B. bronchiseptica* (34). La síntesis de los factores de virulencia se da de manera secuencial y algunos presentan una sinergia al momento de producir daño (35).

Bordetella bronchiseptica ingresa al organismo a través del aparato respiratorio. Se instala como comensal en la mucosa nasal y traqueal mediante adhesinas fimbriales y no fimbriales. En este sitio los mecanismos sensor (BvgS) y activador (BvgA) pueden activar o retardar la transcripción de factores de virulencia dependientes del sistema *bvgAS* (22).

La adhesión a células epiteliales se puede dar por diversos mecanismos reguladores. Uno puede ser durante la fase *bvgAS*⁻ por el factor de colonización traqueal, otro, por las moléculas de adhesión como la pertactina y la hemoaglutinina filamentosa(34) dependientes del sistema *bvgAS* durante la fase *bvgAS*⁺ y un tercero que ocurre durante la fase de variación del *bvgAS* con la fimbria(22). La fimbria tiene una alta afinidad por las células ciliadas(5). Existe una modulación entre las fases *bvgAS*⁺ y *bvgAS*⁻ que es la fase de variación y le permiten a *B. bronchiseptica* evadir la inmunidad (22;36). Es decir, *B. bronchiseptica* no requiere forzosamente ingresar al organismo en la fase patógena para poder instalarse en la mucosa respiratoria(5;21).

Durante la fase *bvg*⁻, *Bordetella* produce el Sideróforo, el cual posee la capacidad de liberar el hierro asociado a la Transferrina (Tf) o a la Lactoferrina (Lf); asimismo puede expresar receptores para el hierro unido a la Tf o a la Lf, en ambos casos *Bordetella* utiliza el hierro como parte de los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano (25;37).

Una vez que se ha instalado *Bordetella* en el tracto respiratorio, se produce una ciliostasis con extrusión de células ciliadas así como con una secreción de moco por parte de las células caliciformes o globosas(38).

La ciliostasis que se reporta en diversas enfermedades causadas por *Bordetella* es producida por la citotoxina traqueal (Figura 3). La citotoxina traqueal es un muramil-dipéptido de bajo peso molecular que es liberado durante la fase exponencial de crecimiento *in vitro*. Además de la ciliostasis, la citotoxina traqueal es responsable de la hipersecreción de moco en las vías respiratorias, lo cual produce la signología clínica con el reflejo tusígeno. La destrucción del aparato mucociliar por parte de la citotoxina traqueal predispone al paciente a padecer problemas secundarios como neumonía o bronconeumonía causada por otros agentes infecciosos como bacterias del género *Mannheimia*, *Pasteurella*. (38).

Una vez activada la fase *bugAS+* se sintetizan otras adhesinas como la Pertactina (Figura 4) y la hemoaglutinina filamentosa (21). No ha sido demostrado que la Prn tenga un efecto citotóxico por si sola; sin embargo, su participación es esencial para que las toxinas de *Bordetella* tengan una acción citotóxica sobre células epiteliales y macrófagos. Se ha visto que, en cepas con mutaciones en el gen *prn* de *B. bronchiseptica*, disminuye considerablemente la toxicidad a células epiteliales, mientras que la inoculación de extractos de membranas de *Bordetella*, con alto contenido de Prn, a cultivos de macrófagos, no tiene ningún efecto citotóxico (34). El estudio de los mecanismos de secreción, identifican a la Prn junto con el factor de colonización traqueal y Brk, como autotransportadores del sistema de secreción tipo V, el cual es el más simple de los sistemas de secreción, las tres proteínas poseen un dominio Arg-Gly-Asp (RGD), el cual tiene la función de adhesión a células epiteliales (19).

El lipopolisacárido (LPS) ha demostrado tener diversas funciones dependiendo de la especie de *Bordetella* que se trate (39). En *B. pertussis* es fundamental para la colonización de la mucosa nasal, en *B. parapertussis* es necesario para la colonización de los pulmones, mientras que en *B. bronchiseptica* participa en la permanencia intracelular en macrófagos alveolares. En estudios con bacterias a las cuales se les mutó el gen *wlb* produjo una estructura truncada del LPS lo cual impidió una adecuada colonización y persistencia de la bacteria en el tracto respiratorio de los animales infectados con estas cepas mutantes (39).

Como se mencionó anteriormente, la secreción de toxinas se puede dar por el sistema de secreción tipo V (Prn) o por el sistema de secreción tipo III (SST3), pero en el caso de *B. pertussis* también es por el sistema de secreción tipo IV (SST4), el cual está compuesto por 12 proteínas (40). Entre los efectos biológicos que se han asociado con el SST3 está la inducción de apoptosis en macrófagos y un efecto de inmunosupresión de los linfocitos locales, ya que los péptidos translocados por este sistema de secreción producen la inhibición del factor nuclear κ B (NF κ B) (33).

Entre las toxinas que secreta *Bordetella* están:

1. la toxina dermonecrótica (DNT), posee dos dominios, el A que corresponde a la porción enzimática y el B que identifica al receptor con el cual se une a las células blanco. La DNT es la responsable de la destrucción de los cornetes nasales en los cerdos que padecen rinitis atrófica. La atrofia de los cornetes se da cuando la DNT produce una deficiencia en la diferenciación de los osteoblastos. Por otro lado la DNT tiene una función de transglutaminasa y produce malformaciones por una reorganización anómala de la tensión de la actina en las células al alterar la función de una pequeña GTPasa Rho mediante la desaminación y la poliaminación en la Gln 63 de esta enzima(41).
2. Toxina de *pertussis* (Txp) es una toxina ADP-ribosilante que produce inflamación y leucocitosis. La Txp es secretada por el SST4. La Txp está conformada por 5 subunidades (S1, S2, S3, S4, y S5), las cuales se ensamblan en una proporción 1:1:1:1:2:1. La subunidad S1 posee una actividad enzimática, mientras que el pentámero S2, S3, S4 y S5 es el responsable de unión a la membrana celular (42). La toxina entra a la célula por endocitosis y viaja de manera retrógrada por el aparato de Golgi hasta llegar al retículo endoplásmico, ahí, mediante una degradación asociada al retículo endoplásmico pierde su plegamiento y pasa al citosol, donde la S1 inicia su actividad enzimática. La S1 cataliza la transferencia de un 5'-difosfato de adenosina (ADP-ribosa) a partir de la nicotinamida-adenin-dinucleótido (NAD) a la subunidad α inhibitoria de la proteína G (G α). La ribosilación de la G α previene la inhibición de la adenilato ciclasa, con lo que hay un incremento de adenosin monofosfato cíclico (AMPc). La Txp es un poderoso inmunógeno y adyuvante ya que además de inducir inmunidad contra si misma, promueve inmunidad contra los otros antígenos co-administrados (10).
3. La hemolisina-adenilato ciclasa o adenilato ciclasa es, junto con la toxina de *pertussis*, la toxina más potente del género *Bordetella*. Sus efectos han sido descritos

con detalle en los últimos años. La hemolisina-adenilato ciclasa es esencial para el establecimiento y permanencia de *B. bronchiseptica* y *B. pertussis* en los pulmones (43). La hemolisina-adenilato ciclasa puede intoxicar a una gran variedad de células de diversos orígenes; sin embargo, la unión a macrófagos, neutrófilos y células dendríticas se da con la asociación de la toxina a las integrinas CD11b/CD18; esta unión toxina-receptor es dependiente de calcio. La toxina unida al receptor se transloca al citosol y activa a la calmodulina, lo que cataliza la conversión de ATP a AMPc. La acumulación intracelular del AMPc inhibe la quimiotaxis, fagocitosis y la producción de superóxidos(44). Finalmente, se ha reportado que la hemolisina-adenilato ciclasa induce apoptosis de macrófagos (43;44). Aún no es muy claro como secreta *Bordetella* esta toxina. La hemolisina-adenilato ciclasa puede inducir la síntesis de anticuerpos protectores en ratones.

La supervivencia de *Bordetella* en la tráquea y en los alvéolos murinos se ha asociado a la activación del gen *brk* el cual le confiere resistencia al complemento (15;45). Aún no es muy claro el mecanismo, mediante el cual, actúa este gen; sin embargo, en estudios donde se hizo una mutación en dicho gen, la actividad del complemento para destruir a *Bordetella* fue más efectiva (45).

La supervivencia intracelular de *Bordetella* ocurre, por un lado, por las acciones ya mencionadas con la hemolisina-adenilato ciclasa, pero por otro, esta la protección dada por los genes *risA* y el *risS*. Como se describió en la sección de Factores de Virulencia, este sistema es independiente del *bugAS*. Su función es, regular la síntesis de fosfatasa ácida, con la cual *Bordetella* modifica la acidificación del fagosoma e inhibe al oxígeno reactivo que participa en el proceso de la explosión respiratoria que se produce en los macrófagos no activados (27;28).

1.3.3. Moléculas antigénicas del género *Bordetella*

La inmunidad protectora se ha asociado, principalmente a la pertactina y a la hemoaglutinina filamentosa y en el caso de *B. pertussis* también a la toxina de *pertussis*.

Montaraz *et al.* (46) demostraron, mediante el empleo de anticuerpos monoclonales contra la pertactina de *B. bronchiseptica* que los ratones quedaban protegidos contra el desafío con la bacteria patógena; por otro lado Novotny *et al.* (47) hizo lo propio pero con cerdos.

La pertactina es una proteína de membrana con un peso molecular de 68, 69 o 70 kDa en *B. bronchiseptica*, *B. pertussis* y *B. parapertussis*, respectivamente. Entre sus funciones biológicas han sido descritas la de autotransportador para los sistemas de secreción tipo V así como la de adhesión a células epiteliales (19). Posee dos regiones de aminoácidos, las cuales, pueden presentar variaciones en el número de repeticiones según sea la especie de *Bordetella* (48).(49)

La pertactina en las tres especies bacterianas posee un dominio RGD que participa en la adhesión a células epiteliales(10;48). Inmediatamente después del dominio RGD se encuentra la región I, la cual sólo en *B. bronchiseptica* y *B. pertussis* presenta variaciones en la repetición de la secuencia GGXXP (48;49). La región II sólo tiene variaciones en la repetición de la secuencia PQP en *B. bronchiseptica*, mientras que permanece constante en *Bordetella pertussis* y *Bordetella parapertussis* (48). Ésta segunda región posee propiedades antigénicas para inducir inmunidad protectora(48).

Se ha reportado que la fimbria es altamente inmunogénica e induce la síntesis de anticuerpos (5). Se han detectado cuatro serotipos de fimbria en el género *Bordetella* y son Fim2, Fim3, FimX y FimA. Estos se producen durante la fase de variación *bugAS* (22).

Como se describió en la sección de patogénesis molecular, tanto la hemolisina-adenilato ciclasa y la Txp son poderosos inmunógenos. La Txp además tiene un efecto adyuvante, con el cual se favorece la respuesta contra antígenos co-administrados(10;42;50).

El LPS juega un papel importante para resistir la acción de péptidos antimicrobianos por parte del hospedero. Resiste la acción del la defensina β 1 de los humanos y al péptido antimicrobial traqueal bovino, así como algunas otras defensinas. El título de anticuerpos contra el LPS no se correlaciona con el índice de protección (51).

1.3.4. Inmunidad innata en el aparato respiratorio

El aparato respiratorio cuenta con diversos mecanismos de inmunidad innata para evitar la acción patógena de los agentes infecciosos que lo pueden invadir (52-56).

En la mucosa del aparato respiratorio, de la nariz, de los cornetes nasales y de la tráquea existe el aparato mucociliar, el cual, por un lado, secreta moco, que atrapa y envuelve a las partículas que llegan a ingresar durante el proceso de respiración y por otro, los movimientos ascendentes facilitan la expulsión de cualquier partícula atrapada en el moco (52;53;55).

El moco es tan solo uno de los productos que se secretan en las mucosas, junto con este se secreta una gran variedad de sustancias antimicrobianas, como el complemento, que se encuentra en una concentración de hasta un 10% mayor que en el suero (45). El complemento tiene diversos efectos biológicos, como causar la lisis de cuerpos celulares que se da por el complejo de ataque a membrana, el cual corresponde a la función primaria de este sistema de defensa; puede además producir inflamación por la liberación de anafilatoxinas, las cuales, tienen la propiedad de unirse a los mastocitos, activar los canales α adrenérgicos y promover la degranulación de éstas células; la fracción C3b produce la opsonización de las células en las cuales se haya iniciado la cascada de activación del complemento; asimismo, durante el proceso se liberan factores quimiotácticos que atraen a las células fagocíticas al sitio donde ocurre la reacción de este sistema de defensa; por otro lado, se ha demostrado que el complemento tiene un papel importante en el proceso de desarrollo de la inmunidad adquirida. El C3b unido a la superficie de un antígeno promueve la respuesta por parte de los linfocitos T (57;58); la fracción C3d-Ag promueve la síntesis de moléculas de co-estimulación lo que facilita que los linfocitos B interactúen con las células presentadoras de antígeno para promover la activación de los Linfocitos B (57;58).

La lisozima es otra molécula liberada en la secreción mucosa. La lisozima se puede encontrar en todos los fluidos del organismo excepto en orina, líquido cefalorraquídeo y sudor. Se encuentra también en los lisosomas de las células fagocíticas. Su efecto es el de una muramidasa que hidroliza los enlaces glucosídicos del ácido N-acetil-murámico con la N-acetil-glucosamina de la pared celular de las bacterias gram positivas (52),(55). Otras sustancias con propiedades microbicidas incluyen a la fosfolipasa A₂ secretoria, las serprocidinas y la proteína bactericida incrementadora de la permeabilidad (59). Estas sustancias son producidas y liberadas en las células epiteliales de las mucosas así como con los gránulos de los polimorfonucleares (PMN's) (59).

La interacción de agentes infecciosos o sus productos de secreción, con los receptores membranales de las células, puede inducir la liberación de sustancias antimicrobianas. Como ejemplo de lo anterior están los receptores tipo toll (TLR: *Toll-like receptor*) (52;60), con los cuales se ha demostrado la síntesis de péptidos microbicidas, citocinas asociadas a la inflamación y expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (52;61).

Hay otras sustancias que son secretadas y que de manera directa o indirecta afectan el desarrollo de agentes patógenos como es el caso de la lactoferrina, que es una proteína que atrapa el hierro que es esencial para las bacterias. Además de encontrarla en los leucocitos se le puede detectar en secreciones mucosas así como en la leche (25;52), otro ejemplo es la betalisisina que se encuentra en las secreciones mucosas de la nasofaringe y tiene actividad bactericida (52).

Uno de los mecanismos de inmunidad innata más efectivos es la fagocitosis por células fagocíticas profesionales como los neutrófilos, macrófagos y precursores de células dendríticas. La eficiencia de los macrófagos para fagocitar se incrementa al ser activados por citocinas como el interferón γ y IFN γ y la interleucina (IL) 12 (52;53). Dentro del grupo de las células fagocíticas del aparato respiratorio se encuentran las células con receptores *Scavenger* los cuales tienen como función detectar específicamente a una variedad de ligandos polianiónicos como ARN de doble cadena, LPS y ácido lipoteicoico, entre otros (52). Los macrófagos alveolares protegen la porción más distal del aparato respiratorio (52).

Las células dendríticas corresponden al grupo de células presentadoras de antígenos (62). Se puede decir que tienen tres fases de desarrollo:

- 1) el precursor de célula dendrítica,
- 2) la célula dendrítica inmadura y
- 3) la célula dendrítica madura.

En las dos primeras fases la célula dendrítica puede capturar antígenos, mientras que en la tercera sólo participan en la presentación de antígenos (62).

La captación de antígenos por parte de la célula dendrítica se da por medio de:

- 1) macropinocitosis,
- 2) endocitosis: vía lectinas, receptores de Fcγ o antígenos opsonizados
- 3) fagocitosis de: cuerpos apoptóticos o necróticos, bacterias, virus o parásitos intracelulares. (62).

En el caso del aparato respiratorio, se ha demostrado que las células dendríticas pueden llegar, en un lapso de 1 hora, en grandes cantidades al epitelio de los bronquios. Esto como respuesta ante antígenos inhalados que produzcan inflamación y por la liberación de quimiocinas (62).

El origen de las células dendríticas es de dos tipos, uno mielóide y otro linfóide (58;62;63). En ambos casos, se ha demostrado que poseen una alta capacidad para presentar antígenos a los linfocitos T CD4+ (62). Las células dendríticas responden al estímulo de citocinas como la IL-12, con la cual se promueve la síntesis de IFN γ y con esto contribuyen a la activación de macrófagos (64-66), asimismo pueden secretar cantidades importantes de citocinas pro-inflamatorias y antivirales tales como la IL-6, el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y el IFN α . Con base en la información anterior, se muestra que las células dendríticas son esenciales, tanto para la inmunidad innata como para la adquirida (62). En la Figura 5 se muestra el ciclo de vida de las células dendríticas y su participación en los procesos de inmunidad innata e inmunidad adquirida.

1.3.5. Inmunidad adquirida contra *Bordetella*

La patogénesis molecular de *Bordetella* muestra la capacidad que tiene esta bacteria para evadir los mecanismos de inmunidad innata; sin embargo, el control de la población bacteriana y de la enfermedad en sí, se debe más a una respuesta inmunitaria adquirida por parte de los linfocitos T cooperadores del subgrupo 1 (Th1) (1;15;67;68).

La inmunidad que se genera contra un agente patógeno radica en la adecuada neutralización de sus factores de virulencia y en la eliminación del agente patógeno del organismo (67).

En los estudios realizados sobre la inmunidad contra *Bordetella* marca dos mecanismos efectivos de respuesta inmunitaria para controlar al agente infeccioso. Uno es la inmunidad humoral, tanto secretoria como sérica, con lo cual se contrarresta la acción

patógena de toxinas y adhesinas y el otro, está dado por los linfocitos T cooperadores del subgrupo 1, ya que éstas células liberan citocinas que activan a los macrófagos con lo cual se puede eliminar al agente infeccioso de las vías respiratorias (39;53;57;67;69;70).

Sin embargo, se desconocen las causas por las que algunos animales llegan a eliminar totalmente a la *Bordetella* del aparato respiratorio, mientras que otros individuos, quedan como portadores asintomáticos permanentes (67).

A pesar de la vacunación contra *B. pertussis*, se ha detectado en países como los Estados Unidos de América, Canadá, Australia, y Holanda un incremento de la incidencia de tos ferina en los últimos años. La hipótesis sobre esta variación radica en posibles diferencias entre la antigenicidad de las moléculas de las vacunas y las cepas de campo que afectan a la población (50). Los estudios enfocados a tratar de dilucidar las variaciones en la efectividad de la inmunidad contra *Bordetella* indican que la participación de los linfocitos T cooperadores del subgrupo 1 son esenciales para dar una respuesta protectora (39), por lo que el empleo de vacunas en la profilaxis de enfermedades asociadas a este género bacteriano pueden contribuir a contrarrestar los efectos causados, tanto en animales como en los humanos (8; 67).

2. Justificación

*"Cada quien obtiene lo que negocia".
Desconocido*

Tomando como base que *Bordetella* cuenta con los factores de virulencia con los que puede evadir de manera muy eficaz los mecanismos de inmunidad innata, pero es altamente susceptible a la inmunidad específica y que es el agente etiológico de problemas respiratorios en diversas especies domésticas, donde el hombre es un huésped accidental y la infección de éste ocurre por el estrecho contacto con animales enfermos o portadores asintomáticos, principalmente mascotas, se pretende evaluar en un modelo murino, la acción inmunogénica de la pertactina recombinante elaborada en *E. coli* así como de una vacuna de ADN contra la misma proteína y determinar su potencial como inmunógeno en perros para la prevención de la bordetelosis.

3. Hipótesis

*“¿Qué es un espíritu cultivado?
Es el que puede mirar las cosas desde muchos puntos de vista”
Henry F. Amiel*

Si la pertactina de *B. bronchiseptica* ha mostrado que genera una inmunidad protectora en cerdos y ratones, entonces:

- 3.1 La pertactina recombinante, elaborada en *E. coli* será capaz de inducir inmunidad protectora en ratones al ser desafiados con una suspensión de bacterias patógenas.
- 3.2 El empleo de una vacuna de ADN que contenga el gen de la pertactina de *B. bronchiseptica* generará inmunidad protectora en ratones inmunizados con el plásmido vector.

4. Objetivos

"No hay viento favorable para el que no sabe donde va"
Lucio Anneo Séneca

4.1. Objetivo general

Elaborar una vacuna de proteínas recombinantes y otra de ADN contra la pertactina de *B. bronchiseptica* mediante la clonación y expresión del gen *prn* para inocularla en ratones susceptibles y evaluar la inmunidad que desarrollan contra la *B. bronchiseptica* al ser desafiados con una suspensión de bacterias vivas virulentas.

4.2. Objetivos específicos

- 4.2.1. Determinar el tiempo de cultivo de *B. bronchiseptica*, mediante la aplicación de una curva de crecimiento bacteriano para obtener una cosecha de bacterias que sea útil para la purificación de ADN genómico, para la elaboración de bacterinas y para producir inóculos de desafío.
- 4.2.2. Amplificar el gen *prn* mediante la aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para obtener un producto que se pueda clonar en el vector pCR2.1 y con esto obtener la secuencia del producto clonado para lograr la identificación del gen de pertactina.
- 4.2.3. Hacer una subclonación del gen de pertactina en los vectores pET28a y pVAX1, mediante cortes con enzimas de restricción y ligazones, para obtener un plásmido que exprese la pertactina recombinante y otro para emplearlo como vacuna de ADN que sea capaz de expresar la pertactina en células eucarióticas.
- 4.2.4. Lograr la expresión del gen de pertactina mediante la transformación y cultivo de bacterias *E. coli*, así como por transfección de cultivos de células HeLa con el plásmido que contenga el gen *prn* para evaluar la síntesis de pertactina recombinante en cultivos *in vitro*.
- 4.2.5. Obtener extractos de proteínas de los cultivos de bacterias transformadas con el plásmido de expresión que contenga el gen *prn* para utilizar las proteínas en la inmunización de ratones susceptibles a *B. bronchiseptica* y evaluar su inmunogenicidad.
- 4.2.6. Inocular el plásmido de la vacuna de ADN con el gen *prn* en ratones susceptibles a *B. bronchiseptica* para evaluar su inmunogenicidad.

5. Materiales y métodos

*“Hay ciertas cosas que para hacerlas bien no basta haberlas aprendido”
Lucio Anneo Séneca*

5.1. Cepas y vectores.

Las cepas utilizadas en este trabajo se enlistan en el Cuadro 2. *Bordetella bronchiseptica* P98 se identificó mediante pruebas bioquímicas para el género *Bordetella* y por la presencia de pertactina mediante Western blot con los anticuerpos monoclonales BB05 y BB07 (71). *Bordetella bronchiseptica* fue cultivada en caldo infusión cerebro-corazón² (BHI) a 37°C en una incubadora con agitador orbital³ a 200 rpm durante 18 horas.

Las diferentes cepas de *Escherichia coli* fueron cultivadas en agar y caldo Luria-Bertani (LB).

El vector pCR2.1 con resistencia a kanamicina y ampicilina fue adquirido con el *Topo TA Cloning Kit*®⁴. El vector pET28a se obtuvo de Novagen®, el pVAX1 se adquirió de Invitrogen®

Las cepas transformadas con los plásmidos fueron cultivadas en agar o caldo LB con kanamicina⁵ 50 µg/ml

5.1.1 Obtención de la cepa de *B. bronchiseptica*

Se utilizó una cepa patógena P98 de *B. bronchiseptica* aislada de un caso clínico de tos de las perreras y que es portadora del gen *prn* el cual expresa a la pertactina con un peso molecular de 68 kDa (71).

La cepa de *B. bronchiseptica* se sembró en 5 cajas de Petri con agar Mc Conkey. Los cultivos se incubaron 48 horas en una estufa bacteriológica⁶ a 37° C. Se cosecharon las colonias colectándolas con un asa de vidrio y se resuspendieron en leche descremada estéril. Se colocaron en crioviales en un volumen de 1.8 ml y se almacenaron en un tanque de nitrógeno líquido hasta su utilización. Para verificar que los cultivos no se contaminaron con el manejo de la cosecha, a partir de los sobrantes de la suspensión bacteriana en leche se sembraron en agar Mc Conkey y se evaluó la homogeneidad de colonias así como las pruebas bioquímicas básicas como triple-azúcar-hierro (TSI),

² Baker®

³ Lab-Line® *Incubator-shaker*

⁴ Invitrogen®.

⁵ Sigma®

⁶ Blue M. ® *Bacteriological incubator*

citrato, urea, ácido sulfhídrico-indol-motilidad (SIM) y oxidación-fermentación de glucosa (OF).

5.1.2 Determinación de la cinética de crecimiento la cepa de *B. bronchiseptica*.

B. bronchiseptica P98 fue sembrada en una caja de petri con agar Mc Conkey, se incubó a 37° C durante 48 horas, posteriormente se resembraron de 5 a 10 colonias en un tubo con 3 ml de BHI, se incubaron a 37° C durante 24 horas en agitación. Del tubo con el inóculo se tomaron 300 µl de cultivo de *B. bronchiseptica* por cada 50 ml de BHI y se sembraron en el medio de cultivo de prueba. Se incubaron a 37°C con agitación a 200 rpm. El crecimiento de la población bacteriana se determinó mediante la densidad óptica (DO) del cultivo con el empleo de un espectrofotómetro Perkin-Elmer® a 650 nm. Los muestreos se hicieron cada hora a partir del momento de siembra hasta que se alcanzó la fase estacionaria. Con los valores de absorbancia se elaboró una gráfica para correlacionar densidad óptica contra tiempo de cultivo.

5.2 Extracción de ADN y plásmidos

Se utilizó ADN de la cepa P98 de *B. bronchiseptica* (Prn+) de origen canino (71). La extracción y purificación de ADN cromosómico se realizó con el método de tiocianato de guanidina descrito por Pitcher *et al.* (72).

Las bacterias se cultivaron en 10-20 ml de caldo BHI durante 19 horas, posteriormente se centrifugaron en una centrífuga Jouan®⁷ a 20 x g (≈400 rpm) durante 10 minutos (sólo para sedimentar las bacterias sin compactarlas demasiado). Se agregaron 550 µl de la solución de lisis [tiocianato de guanidina⁸ 5M, etilen diamino tetra acetato de sodio⁹ (EDTA) 0.1M, Sarkosyl⁸ 0.5%]: se mezcló 5-10 minutos con una pipeta, cuidando de no hacer espuma. Se adicionaron 250 µl de acetato de amonio⁹ 7.4 M (se guardó a -20 °C). Se mezcló por inversión suave del tubo y se colocó en hielo por 10 minutos. Se agregaron 500 µl de cloroformo-isoamil-alcohol⁹ (24:1 V/V) y se mezcló en un agitador para tubos¹⁰ durante 4-5 minutos. La mezcla se centrifugó a 15,000 x g en una microfuga¹¹ (≈10,000 rpm) durante 5 minutos. El sobrenadante se pasó a otro tubo y se repitió el paso anterior 2 veces más (esto se recomienda cuando el ADN se va a utilizar en la PCR). El

⁷ Jouan® modelo MR1812

⁸ Sigma

⁹ JT Baker

¹⁰ Thermolyne® MaxiMix plus

¹¹ Fisher Scientific® 235C

sobrenadante se precipitó con 0.7 volúmenes de isopropanol⁹ o 1 ml de etanol absoluto⁹. La pastilla de ADN se extrajo con una punta de pipeta y se colocó en otro tubo, para agregarle 1 ml de etanol absoluto y centrifugarlo. El ADN se lavó tres veces con etanol al 70%, se dejó secar y se resuspendió en 50-100 µl de agua destilada estéril.

La purificación de los plásmidos se realizó mediante la aplicación del método de lisis alcalina (73). Las bacterias se incubaron en 40 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente, se centrifugaron en tubos de plástico¹² de 50 ml. La pastilla bacteriana se resuspendió en 1 ml del amortiguador Tris¹³ 25 mM, EDTA 25 mM pH8 y se dejó incubar 5 minutos en hielo, se agregaron 2 ml de una solución fresca de NaOH¹⁴ 0.2N, dodecil sulfato de sodio¹³ (SDS) 1%, se mezcló bien por inversión suave de los tubos hasta que se vio transparente, homogéneo y muy viscoso. Se incubó en hielo 10 minutos, se añadieron 1.5 ml de acetato de potasio¹⁴ 3M pH 4.8, se mezcló bien hasta que se perdió la viscosidad y se observó un precipitado blanco. Se dejó incubar 15 minutos en hielo. La mezcla se centrifugó a 7,500 rpm/5 minutos y se pasó el sobrenadante a un tubo limpio, se añadieron 4 ml de fenol-cloroformo¹⁴, se agitó 30 segundos en el agitador para tubos y se centrifugó 2 minutos a 15,000 x g en la microfuga, la fase acuosa se pasó a un tubo de plástico con teflón¹⁵ y se añadieron 10 ml de etanol absoluto frío. Se dejó precipitar 20 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 10 minutos en la microfuga (15,000 x g), se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. La pastilla de ADN se resuspendió en 200 µl de agua des-ionizada estéril, se agregó RNAsa A¹⁶, se dejó incubar a 37°C una hora, los plásmidos obtenidos se conservaron a -20° C hasta su uso.

5.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El gen de pertactina se amplificó por medio de la PCR. Los iniciadores utilizados se diseñaron con base en la secuencia reportada por Li *et al.* (74), 5'-3' gatgatgcgtcgtgtaaca y para la porción 3'-5' accggtacagctggtaaag, con los cuales se amplificó un producto de 2880 pb.

La reacción de PCR se ajustó a un volumen final de 50 µl, de los cuales fueron: 1 µl de ADN genómico de *B. bronchiseptica* con una concentración entre 50 y 250 ng/µl, 5 µl de

¹² Falcon®

¹³ USB®

¹⁴ JT Baker®

¹⁵ Nalgene®

¹⁶ Invitrogen®

amortiguador¹⁶ 10X [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, estabilizadores, y 50% (v/v) glicerol], 2.5 µM de MgCl¹⁶, 200 µM de mezcla de dNTP's¹⁶, 25 pM de iniciadores, solución *Enhancer* de Invitrogen ® con una concentración final de reacción de 3X (15 µl), 0.5 µl de Taq Pfx¹⁶ (2.5 U) agua des-ionizada estéril cbp 50 µl. Los ciclos del termociclador fueron: uno de desnaturalización previa a 94° C durante 4 minutos y posteriormente 33 ciclos con 94° C 45 segundos, 52° C 45 segundos, 72° C 2:45 minutos. Uno para la extensión final a 72 °C durante 8 minutos.

5.4 Clonación del gen *prn*

El producto de PCR fue clonado directamente en el plásmido pCR2.1 mediante el sistema TOPO TA *Cloning Kit*¹⁶ con metodología que marca el fabricante. Con el plásmido ligado se transformaron bacterias *E. coli* DH5α competentes por el método de cloruro de calcio, se sembraron en placas de agar LB con kanamicina 50 µg/ml, 40 µl de isopropil-beta-D-thiogalactopiranosido¹⁷ (IPTG) 1M y 40 µl con 40 mg/ml de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopiranosido¹² (X-Gal). Se dejaron incubar a 37° C durante toda la noche. Al día siguiente se hizo el escrutinio de clonas con la selección de colonias blancas y el descarte de colonias azules.

5.5 Subclonación del gen *prn* para la expresión de proteínas

Se obtuvo el inserto del plásmido pBH7 mediante la digestión con la enzima de restricción *EcoRI*¹⁷ con la metodología que marca el fabricante. El inserto se purificó a partir de un gel de agarosa con el Kit para purificación de ADN¹⁸ a partir de geles de agarosa según la técnica establecida por el fabricante. Para la subclonación se utilizó el plásmido pET28a¹⁹, el cual se digirió previamente con la enzima de restricción *EcoRI*. La ligazón se hizo con la metodología del sistema *LigaFast*²⁰, 3 U de ligasa T4¹⁷ y una proporción de 3:1 (vector: inserto). Se hizo el escrutinio de las colonias mediante la purificación de los plásmidos por lisis alcalina y un posterior análisis de restricción con las enzimas *Clal*²⁰ y *EcoRV*¹⁷, para definir la dirección de lectura del inserto.

¹⁷ Invitrogen®

¹⁸ Quiagen®

¹⁹ Novagen®,

²⁰ Promega®

5.6 Subclonación del gen *prn* para la elaboración de una vacuna de ADN

La metodología fue igual al caso anterior pero con la diferencia de que se utilizó el plásmido pVAX1¹⁷, el cual posee el promotor de citomegalovirus para la expresión de proteínas en células eucarióticas así como el promotor T7 para expresión de proteínas en bacterias y un sitio BGH-PolyA para la poliadenilación del ARNm en células eucarióticas.

5.7 Secuenciación

Se purificó el plásmido pBH7 mediante el sistema *Concert High Purity*²¹ con el procedimiento que marca el fabricante. Para obtener la secuencia de ambas cadenas del plásmido pBH7 se utilizó un secuenciador automático²² y con el kit de secuenciación *BigDye Terminator cycle sequencing*.

Los iniciadores para secuenciación se diseñaron con el software Vector NT²³ y se muestran en el Cuadro 3. En el primer ensayo de secuenciación se utilizaron los iniciadores M13 de adelantado y reverso, cuyas secuencias de alineamiento se encuentran en el vector pCR2.1¹⁷, los siguientes se diseñaron conforme se obtuvieron las secuencias parciales.

5.8 Expresión de proteínas

5.8.1 En *Escherichia coli*.

Las bacterias *E. coli* Rosetta y BL21 transformadas con los plásmidos pBH7E9 y pBH7 respectivamente. La *E. coli* Rosetta se incubó en placas de agar LB con kanamicina²⁴ (Km) 50 µg/ml y cloramfenicol²⁴ (Cm) 2.5 mg/ml, mientras que la *E. coli* BL21 sólo se incubó con Km 50 µg/ml. Se sembraron 5-10 colonias en 10 ml de caldo LB con los antibióticos correspondientes y se dejaron incubar durante 16 hrs. Se sembraron en una proporción de 1:50 en 100 ml de caldo LB con los antibióticos correspondientes y se incubaron con agitación (200 rpm) a 37° C hasta que alcanzaron una D.O. 0.5 - 0.6 a 600 nm; en ese momento, los cultivos se dividieron en dos partes; a una parte se le agregó 10 mM de IPTG, mientras que la otra se mantuvo sin inductor a manera de control y se dejaron en incubación por 1 hora más a temperatura ambiente con agitación (200 rpm), posteriormente se agregó rifampicina²⁴ a una concentración de 50 µg/ml de medio y se dejó incubar a temperatura ambiente durante toda la noche. Las bacterias se cosecharon

²¹ Gibco®

²² Applied Biosystem®, modelo 3100

²³ Informax, Inc

²⁴ Sigma®

mediante centrifugación, se lavaron con solución amortiguadora de Na_2HPO_4 ²⁵ 10 mM (pH 7.2). Las bacterias fueron sonicadas en un homogenizador ultrasónico²⁶ con una punta modelo CV26 en baño de hielo con pulsos de 9 segundos con 9 segundos de descanso. El producto del sonicado se centrifugó a 10,000 rpm en la microfuga. Se recuperó el sobrenadante, se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford (75) y se colocaron 50 μg en un gel al 12.5% de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE); el pellet se resuspendió en solución amortiguadora de urea 8M, tris 20 mM, NaCl 0.3 M pH8 ajustado con HCl y se colocaron 5 μl en un SDS-PAGE.

5.8.2 En cultivo de células HeLa

Se preparó un cultivo de células HeLa en un frasco de cultivo de 25 cm^2 de base con 10 ml de medio esencial mínimo²⁷ (MEM) y 10 % de suero fetal bovino. Se dejó incubar a 37° C en una estufa con 5% de CO_2 . Cuando el cultivo alcanzó un 60% de confluencia, se hizo la transfección al agregar 0.9 ml de MEM con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de pBH7D46 y 100 μl de Carbopol 934 TM al 0.5%.

Se dejó incubar durante 3 días a 37° C y 5% de CO_2 . Posteriormente se recuperó el sobrenadante, el cual se mantuvo a -20° C hasta su utilización.

5.9 Extracción de proteínas.

Se hizo la extracción de proteínas a partir de cultivos de *B. bronchiseptica*, de *E. coli* y/o de células HeLa para utilizarlas en: el análisis del polimorfismo electroforético en SDS-PAGE, inmunoblot, western blot, ELISA o elaboración de inmunógenos acelulares.

Se aplicaron las metodologías descritas por Montaraz *et al.* (46), Matsuyama *et al.* (76) así como la precipitación con ácido tricloroacético.

5.9.1 Obtención de un extracto de proteínas totales de *B. bronchiseptica*.

Se elaboró un cultivo de *B. bronchiseptica* como se describe en la primera parte del punto 5.1.2. Se cosecharon las bacterias mediante centrifugación a 1500 x g (\approx 4,000 rpm) durante 15 minutos, el paquete celular se resuspendió en 5 ml de solución salina amortiguadora de fosfatos (SSAF) pH 7.2 estéril, las bacterias se lavaron una vez con 5 ml

²⁵ JT Baker®

²⁶ Cole Parmer®

²⁷ Eagle®

de SSAF pH 7.2 estéril. La suspensión bacteriana se colocó en baño de hielo y se sonicaron a 90 hertz con pulsos de 1 minuto hasta clarificar. El producto del sonicado se centrifugó a 1535 x g (\approx 4,200 rpm) durante 20 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se precipitó con 5 volúmenes de acetona²⁸ fría. El precipitado se resuspendió en 1 ml de SSAF estéril. Las proteínas se almacenaron en congelación a -20° C hasta su utilización

5.9.2 Obtención de un extracto de proteínas de membrana externa de *B. bronchiseptica*

Se cultivaron las bacterias en 30 ml de caldo BHI durante 19 horas. Se lavaron con 10 ml de Na₂HPO₄ 10 mM (pH 7.2) y se centrifugaron durante 2 minutos en una microfuga (10,000 x g). La pastilla bacteriana se resuspendió en 5 ml del mismo amortiguador, se agitó en un agitador de tubos. La suspensión de bacterias se sonicó a 90 hertz, 45 ° de amplitud hasta aclarar (9 segundos de sonicado por 9 segundos de descanso durante 1:30 minutos). El sonicado se centrifugó a 10,000 x g durante 2 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se colocó en otro tubo y se centrifugó a 10,000 x g a 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante se guardó (proteínas solubles). La pastilla se resuspendió en 500 µl de amortiguador de Na₂HPO₄ 10 mM (pH 7.2) pero adicionado con 2% de tritón X-100²⁹. La solución de proteínas se incubó a 37°C durante 30 minutos y posteriormente se centrifugó 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se removió (membranas internas), el sedimento se resuspendió en 1 ml de amortiguador de Na₂HPO₄ 10 mM (pH 7.2) y se centrifugó a 10,000 x g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se desecha mientras que el sedimento se resuspendió en 500 µl de SSAF pH7.2 (membranas externas).

5.9.3 Obtención de un extracto de proteínas totales de *E. coli* con pertactina recombinante.

Se siguió la metodología descrita en el punto 5.9.1. **Obtención de proteínas totales de *B. bronchiseptica*.**

5.9.4 Obtención de proteínas a partir del sobrenadante del cultivo de células HeLa transfectadas con el pBH7D46

Las proteínas se obtuvieron mediante precipitación con ácido tricloroacético.

²⁸ JT Baker®

²⁹ Sigma®

Brevemente, se agregó un volumen igual de ácido tricloroacético al 20% a la muestra de proteínas. Se incubó 30 minutos en hielo, se centrifugó en una microfuga a 4° C a 10,000 x g durante 15 minutos, se removió el sobrenadante y se agregaron 300 µl de acetona fría. Se centrifugó en la microfuga durante 5 minutos a 4° C, se removió el sobrenadante y se dejó secar el pellet. El precipitado se resuspendió en 1/10 del volumen original en solución salina amortiguadora de fosfatos (SSAF).

5.10 Cuantificación de proteínas:

Para la cuantificación de la concentración de las proteínas se siguió el método de Bradford (75). La muestra de proteínas se hidrolizó previamente para obtener una lectura de mayor precisión. Se colocaron 30 µl de la muestra de proteínas en un tubo Eppendorff, se agregó 1 ml de ácido tricloroacético y se dejó precipitar durante 30 minutos en baño de hielo, después se centrifugaron durante 15 minutos a 10,000 x g en una microfuga y se agregó 1 ml de NaOH 0.4N para hidrolizar las proteínas. Se colocaron 100 µl en una cubeta para espectrofotómetro, se le agregó 1 ml de reactivo de Bradford y se interpoló el valor de la densidad óptica en la curva patrón que se elaboró con albúmina sérica bovina.

5.11 Análisis de proteínas

5.11.1 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con dodecilo sulfato de sodio (SDS-PAGE)

Se siguió la metodología de Laemmli descrita en el manual de usuario de *Mini-Protean® II Multi-Casting Chamber*³⁰. Las muestras de los extractos de proteína fueron ajustadas a una concentración final de 50 µg para evaluar el polimorfismo bioquímico en geles de poliacrilamida al 12% con SDS.

5.11.2 Análisis por inmunotransferencia tipo Inmunoblot y Western blot

La Prn se detectó mediante inmunotransferencia tipo Inmunoblot con los anticuerpos policlonales contra *B. bronchiseptica* y *B. pertussis* así como monoclonales BB05, BB07 y tipo Western blot con suero policlonal contra *B. bronchiseptica* en membranas de nitrocelulosa³¹ o nylon³¹. Los antígenos de prueba fueron los extractos de proteína descritos en el punto número 5.9 de este capítulo. Se siguieron las metodologías descritas en el manual de usuario del *Miniblotter 45*³² así como en el de *Mini-Protean® II Multi-*

³⁰ BioRad

³¹ Amercham

³² Immunonetics®.

Casting Chamber. En la reacción tipo Western blot se hizo con las siguientes diferencias: el proceso de transferencia se hizo sobre membranas de nylon previamente activadas en metanol; para la reacción de transferencia se utilizó la cámara *Mini-Protean® II Multi-Casting Chamber* conectada a una fuente de poder con 18 V y 300 mA durante toda la noche. La cámara se colocó en una hielera con refrigerantes durante todo el proceso. El bloqueo de membranas se hizo con leche descremada al 5% en solución amortiguadora salina Tris-Tween (TBS-T). En la fase de detección se emplearon anticuerpos anti Ig's de ratón elaborados en cabra, conjugados con peroxidasa de rábano (Amercham), el cual fue diluido 1/6000 en TBS con 5% de leche descremada y se dejó reaccionar con la membrana a 37° C durante toda la noche sobre un agitador orbital a 50 rpm. Al día siguiente la membrana se lavó y se reveló con 4-1-cloro-naftol y peróxido de hidrógeno. En cada prueba se utilizó como control positivo el extracto de proteínas de membrana externa de *B. bronchiseptica* P98 mientras que el negativo se utilizó el extracto de proteínas de *E. coli* sin vector.

5.12 Elaboración de los inmunógenos experimentales

5.12.1 Preparación de una bacterina de *B. bronchiseptica*

Bordetella bronchiseptica se sembró en agar BHI y se dejó en incubación a 37°C durante 24 horas. Al día siguiente se tomaron 5-10 colonias y se sembraron en un tubo con 10 ml de caldo BHI y se incubaron durante toda la noche. Posteriormente se sembraron 2 ml de cultivo en 500 ml de caldo BHI y se dejó incubar durante 19 horas a 37°C. Las bacterias se cosecharon mediante centrifugación a 5000 x g/min. Y se lavaron una vez con SSAF pH 7.2 estéril. Las bacterias fueron resuspendidas en 50 ml de SSAF.

La suspensión de bacterias se ajustó al tubo número 2 del nefelómetro de McFarland (77). Se agregó solución de carbopol a una concentración final de 1% (77). Las bacterias se inactivaron con formaldehído a una concentración final de 0.05% y se dejaron en incubación a 37 °C durante 24 horas (77).

Se comprobó la esterilidad de la bacterina al sembrar 100 µl en una placa de agar sangre, la cual se dejó incubar en una estufa bacteriológica a 37° C durante 3 días.

Con el producto terminado y libre de bacterias vivas, se inocularon 20 ratones CD1 hembras por vía subcutánea en el espacio inter-escapular con 0.5 ml de la suspensión a

cada ratón. Los ratones fueron revacunados 14 días después por vía intraperitoneal con el mismo volumen de la bacterina.

5.12.2 Preparación de la vacuna de ADN para inoculación en ratones.

Se siguió la metodología descrita en el producto de Quiagen® para la purificación de vacunas de ADN por columnas de intercambio iónico. Es importante que todos los reactivos estén estériles y libres de endotoxinas.

El plásmido pBH7D46 fue transformado en *E. coli* TopF10', se sembraron placas de agar LB con Km 50 µg/ml y se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente se sembraron 5-10 colonias en un tubo con 5 ml de caldo LB con Km 100 µg/ml y se dejó incubar toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se resembraron 10 ml de cultivo en 500 ml de caldo LB con Km 100 µg/ml y se dejó incubar durante 7 horas más en una incubadora con agitador orbital a 200 rpm. Una vez concluida la incubación, el matraz se colocó en hielo y se siguió el procedimiento de extracción establecido en el manual de usuario del producto Quiagen para purificación de plásmidos.

El ADN se eluyó en columnas Qiagen (una columna por cada 50 ml de medio de cultivo). El ADN se precipitó con isopropanol y fue lavado con etanol y secado. El ADN fue resuspendido en Tris-EDTA (TE) 1X libre de endotoxinas. Es recomendable dejar el ADN disolviendo toda la noche.

Al día siguiente, se agregó NaCl a la solución ADN-TE a una concentración final de 0.1M de NaCl.

Se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto. Se dejó precipitar a -20 °C por 30 minutos y se recuperó el ADN mediante centrifugación (10,000 x g), posteriormente se lavó una vez con etanol al 70% en agua y se recuperó el ADN por centrifugación (10,000 x g).

El pellet se dejó secar y posteriormente se resuspendió en 1X de una SSAF estéril y libre de endotoxinas. Se agregó la cantidad de SSAF necesaria para dejar una concentración final de 1.5 a 2 mg/ml de ADN. En este punto se dejó disolver la solución ADN-SSAF toda la noche.

La concentración de ADN se determinó mediante el empleo de un espectrofotómetro de luz UV con lecturas en las longitudes de onda de 260 y 280 nm. El ADN se diluyó con PBS para dejar una concentración final de 1 mg/ml . El ADN se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

Al ADN se le agregó Carbopol 934 como adyuvante a una concentración final del 1%. Cada ratón fue inmunizado con 100 µg de ADN por vía intradérmica en la base de la cola. Catorce días después fueron revacunados con la misma dosis por la misma vía.

5.12.3 Preparación de una vacuna acelular con *E. coli* transformada con el vector pBH7E9

Se siguió el procedimiento descrito en el punto 5.8.1 para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. La extracción se hizo de acuerdo a la metodología descrita en el punto 5.9.3. Después de cuantificar la concentración de proteínas hidrolizadas mediante el método de Bradford (75), se ajustó la concentración final de proteína a 120 µg/ml . Se agregó carbopol a una concentración final de 1%. Se hizo una prueba de esterilidad al sembrar 100 µl en placas de agar sangre y agar papa e incubarlas a 37 °C y temperatura ambiente durante 14 días. Cada ratón fue inmunizado con 60 µg de proteína por vía subcutánea y revacunado, con la misma dosis, por vía intraperitoneal al día 14.

5.12.4 Preparación de una bacterina de *E. coli* Rosetta sin plásmido de expresión.

Se siguió la metodología descrita en el punto 5.12.1 de elaboración de una bacterina de *B. bronchiseptica*, pero con un tiempo de incubación de 12 horas. Este inmunógeno se utilizó como testigo de la inmunidad generada por *E. coli*.

5.13 Evaluación de la eficacia de los inmunógenos experimentales

5.13.1 Inmunización de los animales

Se utilizaron 20 ratones CD1 hembras por lote. Se colocaron en cajas de policarbonato con cama de viruta de madera esterilizada, se marcaron con muescas en las orejas, se les suministró agua y alimento comercial *ad libitum*. La distribución de los lotes se muestra en el cuadro 4. Los ratones fueron inmunizados con las concentraciones que se describen en la preparación de cada uno de los inmunógenos y fueron revacunados 14 días después.

5.13.2 Toma de muestras de suero

La toma de muestras de suero se hizo mediante punción cardiaca con jeringas de 1 ml y aguja del número 27. Todos los animales que no fueron desafiados fueron muestreados los días 7, 14, 21 y 28 después de la primo vacunación (n=5 por cada día de muestreo por grupo) para determinar la curva de respuesta inmunitaria humoral a la vacunación; mientras que los desafiados se sangraron unos minutos antes de sacrificarlos para la toma de muestras de pulmón (n=3 por cada día de muestreo por grupo).

Las muestras de suero se limpiaron por centrifugación y se almacenaron en congelación a -20°C hasta su utilización.

Antes de utilizar los sueros, éstos fueron adsorbidos con *E. coli* Rosetta sin plásmidos de acuerdo a la técnica de Graber y Zingales (78), con lo que cada suero quedó con una dilución final de almacenamiento de 1:15.

5.13.3 Desafío de los animales vacunados

Se siguió la metodología descrita por Guiso N. (79) con algunas diferencias: Se colocaron en una cámara de aspersión de 34X24X16 cm, se les conectó un humidificador de oxígeno³³ con 10 ml de la suspensión de bacterias con una densidad óptica de 1.0 a 650 nm para así obtener una concentración aproximada de 10⁹ UFC/ml . El humidificador se conectó a compresor de aire y se asperjaron los animales durante 10 minutos. Los ratones se regresaron a sus respectivas jaulas y se tomaron muestras de suero y sacrificaron para obtener el número de UFC de pulmón de 3 animales los días 0, 3, 7, 16 y 21. Los pulmones fueron homogenizados y se hicieron diluciones en 4.5 ml de caldo BHI desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁴. Se sembraron 10 µl de cada dilución en muestras pareadas en placas agar McConkey para cuantificar UFC que se recuperaron del pulmón. La lectura de las placas se hizo 24 horas después de la siembra.

5.14 Estandarización del método de inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) para la titulación de anticuerpos contra proteínas de *B. bronchiseptica*.

5.14.1 Preparación del antígeno

Se utilizaron como antígeno las proteínas totales (PT) y proteínas de membrana externa (PME) de *B. bronchiseptica* descritas en los puntos 5.9.1 y 5.9.2 de éste capítulo.

³³ Misty-Neb™ Nebulizer. Airlife™, Allegiance. McGaw Park IL 60085 USA

5.14.2 Unión del antígeno a la fase sólida

Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano, para lectura colorimétrica. Se hicieron diluciones de los antígenos de proteínas de membrana externa así como de proteínas totales de *B. bronchiseptica* con SSAF pH 7.2 para ajustar la concentración en 1, 2 y 3 µg/100 µl y 1, 2, 3, 4 y 5 µg/100 µl respectivamente. Se colocaron 100 µl de antígeno según la concentración y se dejó incubar a temperatura ambiente durante toda la noche. Al día siguiente se lavaron los pozos con 250 µl/pozo de SSAF-Tween (10mM pH 7.2, 0.05% de Tween 20). La placa fue bloqueada con 100 µl de albúmina sérica bovina (ASB) al 1% y se dejó incubar a temperatura ambiente durante dos horas, posteriormente se lavó la placa tres veces con SSAF-Tween. Las placas se taparon con plástico autoadherible y se guardaron en refrigeración a 4 °C hasta su utilización.

5.14.3 Titulación de los sueros testigos positivo para la estandarización de la técnica de ELISA

Se utilizaron los sueros de los ratones inmunizados con la bacterina de *B. bronchiseptica* con y sin desafío como testigos positivo mientras que, como testigos negativo se utilizaron sueros de ratones libres de *B. bronchiseptica* así como los inmunizados con la bacterina de *E. coli* Rosetta, el plásmido pVAX1 y PBS.

A partir de las muestras de suero adsorbidas con *E. coli* y con una dilución de 1/15, se hicieron diluciones triples seriadas de 8 sueros positivos y 8 sueros negativos para tener diluciones de trabajo desde 1/50 hasta 1/12150. Cada dilución se colocó sobre los pozos previamente sensibilizados y bloqueados. Se cubrió la placa con plástico autoadhesivo y se dejó incubar a 37 °C durante 1 hora. Se hicieron tres lavados con 250 µl de SSAF-Tween por cada pozo en un lavador de microplacas. A cada pozo se le agregaron 100 µl de conjugado anti Ig's de ratón³⁴ elaborado en cabra diluido 1/6000 con SSAF. Se cubrió la placa con plástico autoadhesivo y se dejó incubar a 37 °C durante 1 hora, durante la incubación se preparó el sustrato con 5 µl de H₂O₂ en 120 µl de H₂O y también se preparó la solución de cromógeno con 7.5 mg de ácido 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic³⁵ (ABTS) en 50 ml de solución de citrato (0.2M de fosfato de sodio³⁶, 0.1M ácido cítrico). Se mezcló 50 ml de la solución de cromógeno con 19 µl de la solución de sustrato,

³⁴ Amercham®

³⁵ Sigma®

³⁶ JT Baker®

la cual se empleó inmediatamente después de prepararse. Después de la incubación con el conjugado se lavó tres veces la placa con 250 μ l de SSAF-tween en un lavador de microplacas. Se agregaron 100 μ l de la mezcla sustrato-cromógeno en cada pozo mediante la utilización de una micropipeta multicanal y se incubó la reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se determinó la absorbancia con un lector de microplacas a 605 nm. Las lecturas de la absorbancia se graficaron. Se seleccionó la dilución de suero donde hubo una mayor diferencia entre el control positivo y el negativo.

5.14.4 Metodología de la prueba de ELISA

Se siguió el procedimiento descrito en el punto anterior pero con las siguientes diferencias.

La dilución de trabajo de los sueros fue de 1/450. Esta dilución se definió con base en la mayor diferencia de los valores de absorbancia obtenidos entre los positivos y los negativos evaluados en la estandarización de la prueba. Las evaluaciones de los sueros se hicieron por duplicado para cada uno de los antígenos utilizados. En cada placa hubo un control positivo y uno negativo

5.14.5 Evaluación de los resultados de la prueba de ELISA

Se aplicó un análisis de varianza (ANDEVA) seguido del estadístico T de Student para determinar las diferencias entre grupos.

5.15 Determinación de las unidades formadoras de colonia en pulmones de ratones vacunados y desafiados

Se siguieron las metodologías descritas por Guiso *et al.* (79) Sharon y Washington (80) y Brock y Ward (81).

Después de haber sangrado a los ratones, se hizo una disección para extraer las vías respiratorias bajas desde la tráquea hasta los pulmones. El aparato respiratorio fue flameado para eliminar contaminaciones y se colocó en un tubo con 2 ml de SSAF pH 7.2 para homogenizar los tejidos. Posteriormente se hicieron diluciones décuples desde 10^{-1} hasta 10^{-4} . De cada dilución, se hicieron siembras por duplicado con 10 μ l de cada dilución del homogenizado en cajas de agar McConkey. Se dejaron en incubación durante 24 horas y se hizo el conteo de las colonias de cada dilución. Los resultados fueron

analizados mediante un análisis de varianza de Kruskal Wallis, seguidos del estadístico U de Mann Whitney para determinar la diferencia entre grupos.

6. Resultados

“La victoria y el fracaso son dos imposibles, y hay que recibirlos con idéntica serenidad y con saludable punto de desdén”
Rudyard Kipling

6.1 Curva de crecimiento de *B. bronchiseptica*.

Bordetella bronchiseptica se cultivó en caldo BHI. Para evaluar su desarrollo en cultivo se realizó una cinética de crecimiento bacteriano. Se observó que las bacterias entraron a la fase estacionaria a las 21 horas, por lo que se decidió hacer cultivos de 19 horas para la obtención de ADN con el mínimo de factores que pudieran alterar la calidad del ácido nucleico. El medio BHI es utilizado como en medio de uso general y principalmente está recomendado para el cultivo de bacterias del género *Streptococcus* spp y *Staphylococcus* spp así como *E. coli* y otras enterobacterias³⁷; sin embargo, ha sido útil en el cultivo de *B. bronchiseptica* sin inhibir la expresión de la pertactina, no así para *B. pertussis*. El medio SS es selectivo para el aislamiento y cultivo de bacterias del género *Bordetella* ya que contiene aminoácidos esenciales para la bacteria (prolina, ácido glutámico) así como sales de potasio y calcio; sin embargo, se prefirió el empleo del medio BHI por tener un costo por libra menor en comparación con el medio SS.

En la Figura 6 se muestra la curva de la cinética de crecimiento de *B. bronchiseptica*, donde los valores de lectura corresponden a la densidad óptica de los muestreos. Las lecturas se hicieron con muestras pareadas para disminuir el error de lectura.

6.2 Extracción de ADN

Al aplicar el método de tiocianato de guanidina para la obtención de ADN de *B. bronchiseptica* se obtuvo un rendimiento de hasta 4 µg/µl de ADN por cada 20 ml de medio de cultivo, con una incubación a 37° C con agitación orbital a 200 rpm durante 19 horas. Para su utilización en la PCR se requirió diluir el ADN hasta que se obtuvo una concentración entre 50 y 250 ng/µl.

6.3 PCR

El producto de la reacción en cadena de la polimerasa presentó 2880 pares de bases (Figura 7). Aunque se utilizó la Taq pfx de Invitrogen®, la cual está indicada para incrementar la especificidad de las reacciones de la PCR, se observó que al amplificar el gen *prn* de *B. bronchiseptica* se obtuvo además del producto, un bandeo inespecífico, lo cual probablemente se debió al alto contenido de G-C del genoma de *B. bronchiseptica*. Debido a lo anterior se decidió purificar la banda a partir del gel de agarosa (Figura 8) para poderlo clonar en el vector pCR2.1.

³⁷ notación de etiqueta

6.4 Clonación y análisis de secuencia

En la Figura 9 se muestra el mapa del plásmido pBH7 el cual contiene el gen *prm* que codifica para la pertactina de *B. bronchiseptica*. El pBH7 confiere resistencia a kanamicina y ampicilina, posee un origen de replicación y cuenta con el sitio *f1 ori*, el cual es otro sitio de replicación que participa en la conjugación bacteriana. El gen *prm* quedo entre los promotores T7 y LacZ.

En los sitios de inserción, el vector cuenta con la secuencia M13 de adelantado y reverso, lo cual fue de utilidad para obtener la secuencia del inserto. Se verificó que la secuencia correspondiera a la del gen *prm* mediante un análisis comparativo en el servicio BlastX de la biblioteca del Instituto Nacional de Salud (NIH) de los Estados Unidos de Norteamérica con la dirección electrónica www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/. La secuencia de nucleótidos del gen de pertactina fue registrada en el *GenBank* del NIH con número de acceso AY376325. La secuencia reportada fue identificada como la pertactina de la cepa de campo (*Wild type*) de *B. bronchiseptica* P98 de origen canino.

El producto clonado contiene 2880 pb el cual incluye el ATG para el codón de inicio en el sitio 148 y la secuencia de terminación TAA en el nucleótido 2875. Debido a que el pBH7 cuenta con dos promotores, uno es el T7 y otro es LacZ, se pudo inducir la síntesis de proteínas con este vector al agregar 2 mM de IPTG. La síntesis de proteínas fue detectada por inmunoblot con el empleo de los anticuerpos monoclonales BB05 y BB07 (datos no mostrados).

Una vez clonado el gen *prm* en el pBH7 se hicieron dos subclonaciones mas, una con el vector pET28a y se le denominó pBH7E9 (Figura 10) y otra en el vector pVAX1, el cual se le identificó como pBH7D46 (Figura 11).

Durante el proceso de escrutinio para identificar a las colonias bacterianas portadoras del plásmido con inserto, se detectaron dos plásmidos, los cuales fueron identificados como pBH7E2 y pBH7E3, los cuales presentaron el gen *prm* pero en sentido inverso de lectura (Figura 12).

Para la identificación de la dirección de lectura en cada una de las subclonaciones se elaboró una simulación de migración electroforética de un ensayo de restricción con el

software Vector NT1 (Figura 13 y 14) y posteriormente realizarlo en el laboratorio con cada uno de los plásmidos obtenidos en las subclonaciones (Figuras 15, 16 y 17)

El producto de PCR que fue clonado en el vector pCR2.1 y que fue identificado como pBH7 se utilizó para obtener la secuencia completa del inserto.

Mediante el empleo del software Vector NT1 se comparó la secuencia del gen *prn* de *B. bronchiseptica* P98 en el pBH7 con las secuencias del mismo gen de la *B. bronchiseptica* RB50, la B14 y la cepa CN7531. Se detectó un 89.7% de identidad de nucleótidos.

En el Cuadro 5 se muestra el alineamiento y corresponde a las secuencias de aminoácidos de la pertactina de *B. bronchiseptica* P98 clonada en el pBH7 comparada con las de las cepas RB50, B14 y CN7531 citadas anteriormente. Se obtuvo la probable traducción de aminoácidos a partir del ATG reportado en la CN7531 como codón de inicio. Se detectó un 98% de positivos (aminoácidos iguales) con un 96.6% de identidad (aminoácidos del mismo grupo). El dominio RGD se encuentra en el aminoácido 261

La región I se caracteriza por fragmentos repetidos con la secuencia GGXXP y se encuentra próxima al dominio RGD, mientras que la región 2 son secuencias repetidas de PQP.

En el análisis de la secuencia de pertactina de *B. bronchiseptica* se observó que la cepa RB50 presenta, en la región I, una secuencia GGXXP extra en el sitio 277 con relación a las otras secuencias comparadas.

Al comparar la región II de la secuencia de aminoácidos de la pertactina obtenida a partir del pBH7 se observó una homología del 100% con relación a las secuencias B14 y CN7531, con la cepa RB50 hubo una similitud del 95%, debido a que ésta última carece de una prolina en el sitio 595 de la última repetición PQP.

Se observaron cambios en dos aminoácidos de la secuencia de la pertactina de *B. bronchiseptica* P98 y que son diferentes a los de las secuencias comparadas. Uno se encuentra en el sitio 148 y otro en el 859. En el primero se detectó la presencia de una Thr en lugar de una Ala lo que indica que la pertactina de *B. bronchiseptica* P98 posee un sitio polar neutro en lugar del hidrofóbico que se reporta en las secuencias RB50, B14 y CN7531, el segundo fue una His en lugar de una Arg, donde ambos aminoácidos forman

parte del mismo grupo de aminoácidos básicos. Cambios no significativos de aminoácidos como la lys del sitio 8 de la cepa P98 que coincide con la RB50 y la B14, pero no en la cepa CN7531 que presenta una Leu; la Tyr del sitio 34 de la cepa P98 cambia en la RB50 por una His; la Cys del sitio 469 está en la cepa P98 y en la cepa CN7531 mientras que en la RB50 y la B14 tienen una Val; en los sitios 508 y 519 las cepas P98, RB50 y B14 poseen un Trp y una Ala respectivamente, la cepa CN7531 tiene una Leu y una Gly en los mismos sitios; en el sitio 804 hay una Ala en la cepa RB50, mientras que las otras tres cepas tienen una Ser; sin embargo, este cambio es totalmente irrelevante debido a que la pertactina madura sólo posee hasta el aminoácido 632. Estas variaciones de aminoácidos no afectan las características inmunogénicas de la molécula debido a que se conservan sin cambios las dos regiones variables, así como el dominio RGD del sitio 261, que es el receptor de adhesión a células

Con base en la secuencia de nucleótidos y en el ATG identificado como codón de inicio de la cepa de *B. bronchiseptica* CN7531, se elaboró la secuencia de aminoácidos, la cual se envió, vía correo electrónico, a la página Web "*Predict Protein structure prediction and sequence analysis*" con la dirección electrónica <http://maple.bioc.columbia.edu/pp/> y se obtuvo el modelo tridimensional de la Pertactina (Figura 18).

Mediante el empleo del software DeepView/Swiss-PDBviewer 3.7 (SP5) se hizo un empalme de moléculas entre la pertactina de *Bordetella pertussis* y la de *B. bronchiseptica* P98 clonada en el pBH7. Se observaron cambios, principalmente a nivel del asa del dominio RGD, lo cual se le ha asociado a la virulencia por especie (Figura 19).

6.5 Inducción de la síntesis de proteínas

Cuando se realizó el proceso de inducción de la síntesis de proteínas se requirió de una concentración mayor de IPTG que la recomendada para el vector de expresión (10 mM vs 1 mM) así como la adición al medio de cultivo de 50 µg/ml de Rifampicina, la cual inhibe a la ARN polimerasa de *E. coli* pero no a la T7 ARN polimerasa, con lo que se favoreció la expresión de proteínas asociadas al promotor T7 que se encuentra en los tres vectores desarrollados en este trabajo. Durante el proceso de cultivo se observó que las bacterias *E. coli* que contenían el plásmido con el *prn* en dirección correcta del marco de lectura (pBH7E9 y pBH7D46), formaban conglomerados lo cual fue visible tanto macroscópicamente como microscópicamente (Figuras 20 y 21). No se observó en los cultivos de *E. coli* sin plásmido, así como en la *E. coli* transformada con pBH7E2 o

pBH7E3, los cuales presentan el marco abierto de lectura en sentido inverso al promotor T7

6.6 Análisis por inmunotransferencia tipo Inmunoblot y Western blot

El extracto de proteínas totales obtenido a partir de la *E. coli* transformada con el pBH7 reaccionó con los anticuerpos monoclonales BB05 y BB07 contra la pertactina de *B. bronchiseptica* (datos no mostrados) así como con anticuerpos policlonales contra *B. bronchiseptica* y *B. pertussis* mediante la aplicación de la técnica de inmunotransferencia tipo inmunoblot (Figura 22).

En la Figura 23 se muestra el gel de poliacrilamida donde se presenta la expresión de proteínas de las *E. coli* transformadas con los plásmidos pBH7, pBH7E9 y pBH7D46 inducidas con IPTG y rifampicina, asimismo se incluyen como testigo de la prueba los extractos de proteína de la *E. coli* BL21 y *E. coli* Rosetta sin plásmidos e inducidas con IPTG y rifampicina.

En la Figura 24 se muestra la inmunotransferencia tipo *Western blot* donde se aprecia las bandas de reacción de los extractos de proteína de las bacterias *E. coli* transformada con los plásmidos pBH7 y pBh7E9.

En la Figura 25 se muestra la fotografía del gel de poliacrilamida con la electroforesis de proteínas de los cultivos de células HeLa transfectadas con el pBH7D46 y el control sin plásmido. La muestra del carril 1 se tomó el día 3 mientras que la muestra del carril 3 se tomó el día 5 post-transfección. Asimismo en la Figura 26 se muestra la reacción de transferencia tipo *Western blot* de las mismas proteínas en reacción con un suero policlonal de ratón contra *B. bronchiseptica* y antisuero anti inmunoglobulinas totales de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Amercham) .

6.7 Estandarización de la técnica de ELISA para la cuantificación de anticuerpos contra *B. bronchiseptica*.

En las Figuras 27 y 28 se muestran las curvas de los valores de absorbancia obtenidos durante el proceso de estandarización de la prueba de ELISA para evaluar la respuesta inmunitaria a la vacunación así como en los animales vacunados y desafiados. Se utilizó como antígeno de captura proteínas de membrana externa en concentraciones de 1, 2 y 3 µg por pozo (Figura 27) así como proteínas totales de *B. bronchiseptica* en

concentraciones desde 1 hasta 5 µg por pozo (Figura 28). Se utilizaron diferentes sueros policlonales de ratón contra *B. bronchiseptica* como testigo positivo con diluciones desde 1/50 hasta 1/36,450, mientras que, el testigo negativo se obtuvo de los sueros de ratones libres de *B. bronchiseptica* o vacunados con *E. coli* sin plásmido, o inoculados con el vector pVAX1 o con SSAF.

Se observó una mayor variabilidad en los resultados de las pruebas de ELISA trabajadas con proteínas totales que con PME como antígeno de captura; sin embargo, se decidió utilizar ambos antígenos en la evaluación general de los sueros de los ratones vacunados y desafiados.

Con los resultados obtenidos se trabajó con la dilución 1/450 de los sueros así como con 2 µg de PME o 5 µg de proteínas totales de *B. bronchiseptica* como antígenos de captura debido a que, con estas constantes, se obtuvo la mayor diferencia en los valores de absorbancia de las lecturas.

6.8 Evaluación de la respuesta inmunitaria humoral a la vacunación y al desafío

En las Figuras 29 y 30 se muestran las graficas de los valores de absorbancia en la prueba de ELISA para determinar la respuesta inmunitaria a la vacunación. Se utilizaron como antígenos de captura el extracto de proteínas totales (5 µg por pozo) y proteínas de membrana externa de *B. bronchiseptica* (2 µg por pozo) respectivamente. Se muestrearon 5 ratones de cada grupo los días 0, 7, 14, 21 y 28. Los ratones fueron revacunados el día 14. Al igual que en la estandarización de la prueba de ELISA, se observó una mayor variabilidad de los valores de absorbancia en los sueros trabajados con proteínas totales que con las PME.

En las Figuras 31 y 32 se muestran las curvas de los valores de absorbancia en la evaluación de la respuesta inmunitaria humoral durante el proceso de desafío. Se tomaron muestras de 3 animales de cada grupo los días 0, 3, 7, 16 y 21 después del desafío. Los sueros fueron evaluados mediante la técnica de ELISA con la utilización de proteínas totales (Figura 31) y proteínas de membrana externa (Figura 32) como antígenos de captura. Al igual que en los resultados descritos anteriormente, se observó una mayor variabilidad de los valores de absorbancia en la prueba de ELISA cuando se utilizaron las proteínas totales de *B. bronchiseptica*.

En la Figura 33 se muestran los resultados obtenidos en el desafío de los animales inmunizados. La gráfica muestra las curvas de las unidades formadoras de colonias recuperadas de los ratones desafiados. Como se puede observar, sólo los ratones inmunizados con la bacterina de *B. bronchiseptica* y los vacunados con el extracto de proteínas de *E. coli* transformada con el pBH7E9 lograron disminuir los conteos de colonias a 0. Los valores graficados corresponden al logaritmo de las UFC detectadas en cada día de muestreo. La evaluación estadística mostró diferencias significativas entre los ratones inmunizados con el extracto de proteínas de *E. coli* con pertactina recombinante con relación a los otros tres grupos, incluyendo a los vacunados con la bacterina de *B. bronchiseptica*.

7. Discusión

"Ni la contradicción es indicio de falsedad, ni la falta de contradicción es indicio de verdad"
Blaise Pascal

En este trabajo se desarrollaron inmunógenos experimentales contra la bordetelosis canina elaborados mediante la manipulación del ADN genómico de *B. bronchiseptica*. Se elaboró una vacuna acelular con *E. coli* transformada con el vector pBH7E9, la cual expresó la pertactina de *B. bronchiseptica* y generó protección en los ratones vacunados; asimismo se elaboró una vacuna de ADN con el vector pBH7D46, la cual no estimuló una inmunidad humoral detectable ni protección en los ratones vacunados pero sí expresó proteínas recombinantes en cultivos *in vitro*.

Se logró la amplificación del gen *prn* con la metodología de la PCR con el empleo de la Taq Pfx de Invitrogen®, la cual funciona bajo el sistema *Hot Start* ya que contiene un anticuerpo unido a la enzima, y éste se desprende cuando el termociclador alcanza una temperatura superior a los 60° C, esta propiedad inhibe la replicación fuera de las temperaturas de síntesis (82;83) con lo que aumenta la especificidad. También posee una vida media de 2 horas a 96° C, mientras que otras polimerasas convencionales tienen una vida media de 9 minutos a la misma temperatura (83), esto permite un mayor número de ciclos de reacción sin la degradación de la enzima (83). Aunque la taq Pfx está diseñada para disminuir las reacciones inespecíficas en la PCR, en este trabajo se observó un bandeo inespecífico (Figura 7), el cual pudo deberse al alto contenido de G-C en el genoma de *Bordetella* (82) por lo que se requirió la purificación de la banda a partir del gel de agarosa para poder realizar la clonación con el gen completo.

El producto de la PCR fue clonado en el vector pCR2.1 de Invitrogen®, que se caracteriza por poseer terminaciones cohesivas de timinas que interaccionan con las adeninas que se unen al producto durante la fase de poliadenilación a 72° C, además de tener unida una topoisomerasa en cada extremo cohesivo que facilita la inserción del producto de PCR³⁸.

La pertactina recombinante detectada con el empleo de anticuerpos monoclonales y policlonales mostró dos tamaños diferentes, uno de 68 kDa y otro de 115 kDa. La Prn obtenida a partir del pBH7E9 presentó el tamaño de 68 kDa, lo cual indica que sufrió los cortes enzimáticos reportados por Li *et al.* (74), quien señala un primer corte entre la Ala 32 y Asp 33 mientras que el segundo corte ocurre entre la Asn 632 y la Ala 633; a diferencia de la pertactina obtenida a partir de los cultivos de células HeLa transfectados

³⁸ TOPO TA Cloning Manual de usuario

con el pBH7D46 y en *E.coli* BL21 con el pBH7, donde la molécula presentó un tamaño de 115 kDa.

En el análisis de la secuencia de pertactina de *B. bronchiseptica* se observó que la cepa RB50 presenta, en la región I, una secuencia GGXXP extra en el sitio 277 con relación a las otras secuencias comparadas, lo que coincide con otros trabajos anteriores y secuencias de pertactina reportadas en el *GenBank* (48). Al comparar la región II de la secuencia de aminoácidos de la pertactina obtenida a partir del pBH7 se observó una homología del 100% con relación a las secuencias reportadas por Li *et al.* y King *et al.* (49;74); con la cepa RB50 hubo una semejanza del 95%, debido a que carece de una Pro en el sitio 595 de la última repetición PQP.

En el análisis del alineamiento de secuencias de aminoácidos se dedujo que los cambios en aminoácidos, mostrados en la comparación del Cuadro 5, no afectaron las propiedades antigénicas de la molécula, ya que, aunque se desconoce si la Prn expresada en *E. coli* logró plegarse bajo la conformación tridimensional de un autotransportador, sí se logró su detección en la reacción antígeno-anticuerpo de las pruebas de inmunotransferencia. Asimismo, en este análisis se observó que conserva el dominio RGD de adhesión a células así como las regiones de repeticiones variables I y II.

Cuando se analizó la estructura tridimensional de la molécula de la pertactina, se observó una homología del 89% con relación a la pertactina de *B. pertussis*. La principal diferencia entre las dos moléculas de pertactina se encuentra en el asa del dominio RGD y la región I. Esto se detectó al hacer una superposición de ambas moléculas mediante el empleo del software *DeepView/Swiss Pdb viewer*.

Para la expresión de proteínas se utilizaron las cepas BL21 y Rosetta de *E. coli*. La *E. coli* BL21 contiene el gen que expresa a la T7 ARN polimerasa lo cual permite la expresión de proteínas, por otro lado, la síntesis de la proteína queda en su estado nativo ya que carece de proteasas *ompT* que puedan degradar a las proteínas recombinantes en un momento dado (84); La *E. coli* Rosetta además de expresar la T7 ARN polimerasa, posee plásmidos que confieren resistencia a cloranfenicol, los cuales además, sintetizan ARNt para codones "raros" para *E. coli*, éstos son: AGG/AGA (arginina), CGG (arginina), AUA (isoleucina) CUA (leucina) CCC (prolina), and GGA (glicina) (85).

En los diferentes ensayos de transformación bacteriana con los plásmidos desarrollados en este trabajo, se obtuvieron resultados diversos. La *E. coli* BL21 (DE3) expresó la pertactina a partir del pBH7, pero no la Prn del pBH7E9. Asimismo, con la *E. coli* Rosetta se logró la expresión de la pertactina codificada por el pBH7E9. La probable explicación a este resultado, es que el pBH7E9 posee el gen *lacI* (Figura 10), el cual puede inhibir la síntesis de la T7 ARN polimerasa en la *E. coli* BL21 (DE3) en ausencia del inductor IPTG y así evitar expresiones no deseadas. En los casos en los que el vector posee el gen *lacI*, se recomienda incrementar la concentración de IPTG de 0.1 mM hasta 2 mM. En este trabajo, se logró detectar la síntesis de Prn recombinante cuando se incrementó la concentración del inductor a 10 mM.

La expresión de proteínas en *E. coli* es compleja, ya que la proteína por sintetizar no debe ser tóxica para la bacteria; debe haber compatibilidad metabólica para sintetizar todas las moléculas relacionadas con la proteína y se deben activar los mecanismos adecuados para inducir la síntesis de la proteína (86). En el caso de la pertactina, no se ha demostrado la toxicidad de la proteína para *E. coli* (74), puede ser sintetizada como su precursor de 93 kDa o como molécula madura de 68 o 69 kDa (74;87).

La pertactina recombinante, obtenida a partir de la inducción con IPTG y rifampicina en las *E. coli* con los plásmidos pBH7 y pBH7E9, se observó que presentó 2 pesos moleculares diferentes, uno fue de 115.2 kDa y otro de 68 kDa. (Figura 22). La molécula de 68 kDa, como se mencionó anteriormente puede ser procesada por *E. coli*; sin embargo, la molécula de 115.2 kDa no coincide con los pesos esperados, ya que si se considera que la traducción comenzara desde el codón de inicio, el peso molecular sería de 97 kDa, por otro lado, si la transcripción se iniciara desde el ATG ubicado en el sitio 109 después del promotor, el peso molecular debería ser de 106.6 kDa, por lo que se desconocen los factores que influyeron en la migración electroforética aberrante detectada en la Prn derivada del pBH7.

La detección de la pertactina se logró mediante técnicas de *immunoblot* y *Western blot*. En el primero se utilizaron anticuerpos monoclonales BB05 y BB07. Se observó una reacción muy débil (datos no mostrados), tanto en la muestra derivada del pBH7 como en las muestras testigo de *B. bronchiseptica*, esto se debió a que los anticuerpos fueron elaborados en 1984 (46) y el título a la fecha es muy bajo (1/200). Con el empleo de policlonales contra *B. bronchiseptica* y *B. pertussis* se observaron reacciones de mayor

intensidad. La reacción de *Western blot* se aplicó con los extractos de proteína de las *E. coli* transformadas con los plásmidos pBH7, pBH7E9 y pBH7D46 y con la utilización de anticuerpos policlonales contra *B. bronchiseptica*. La reacción de mayor intensidad se observó con el pBH7E9; sin embargo, para lograr esto se requirió precipitar las proteínas con ácido tricloroacético y resuspenderlas en 1/10 del volumen original, ya que de lo contrario, la reacción era más débil que con el extracto derivado del pBH7.

La pertactina detectada en *E. coli* Rosetta a partir de del pBH7E9 presentó un peso molecular de 68 kDa, este fenómeno de corte sobre el dominio carboxilo terminal ya ha sido reportado por Charles *et al.* (87), quien menciona que *E. coli* es capaz de procesar a la pertactina desde su peso original de 93 kDa hasta el de 69 kDa con la pertactina de *B. pertussis*, esto mismo, no ocurrió con la *E. coli* BL21 transformada con el pBH7 ya que el tamaño molecular fue de 115.2 kDa.

Se ha reportado el fenómeno de migración electroforética aberrante en moléculas que son derivadas de genes recombinantes (88;89). Esto puede deberse a: 1. secuencias repetidas de aminoácidos ácidos (89), 2. Metilación o adenilación del aminoácido Lisina (90), 3. Formación de dímeros estables de la proteína recombinante (88), 4. Inicio de la transcripción a partir del promotor del vector y antes del ATG del gen clonado (86). Tomando como base los puntos anteriores y considerando la transcripción de la proteína recombinante a partir del promotor T7 no se puede definir la causa exacta por la cual se obtuvo la molécula de 115.2 kDa ya que el análisis de la secuencia indica que se produce una proteína con 975 aminoácidos con un peso de 102 kDa con 28 aminoácidos ácidos y 17 lisinas, los cuales representan el 2.87% y 1.74%, respectivamente, del total de aminoácidos y se requiere, por lo menos de un 22% de alguno de estos dos aminoácidos para modificar la migración electroforética (88). Asimismo, con el peso detectado en la pertactina recombinante, se descarta la posibilidad de la formación de dímeros estables.

Una de las propiedades del vector pET28a es que promueve la fijación de una cola de polihistidinas al final del dominio carboxilo terminal; sin embargo, en el caso de pertactina recombinante no tuvo el efecto esperado, por lo que, para poder purificar la proteína sin que sufra los cortes enzimáticos, es necesario incubar a la *E. coli* con inhibidores de proteasas.

Otra opción para mejorar la expresión de la proteína recombinante consistiría en hacer una subclonación en otro vector que permita obtener una mayor producción de Pm, como ejemplo de esto, Ozer *et al.* (91), inducen la síntesis de proteínas recombinantes mediante el empleo del promotor *nirB* en *E. coli* bajo condiciones anaerobias, con lo que lograron una concentración de pertactina del 30% con relación a las proteínas totales bacterianas.

Durante los ensayos para promover la síntesis de proteínas se observó que las bacterias transformadas con los plásmidos pBH7, pBH7E9 y pBH7D46 formaban conglomerados. Este efecto se observó conforme se incrementa la molaridad de IPTG en el cultivo; asimismo, cuando se utilizó la rifampicina en el proceso de inducción de la síntesis de proteínas, el efecto no disminuyó. El fenómeno de autoagregación bacteriana promovida por la adición de 10 mM de IPTG no ha sido reportada con la pertactina tanto en *B. bronchiseptica* como en *E. coli* transformada con plásmidos que contengan el gen *prn*. Se ha reportado la autoaglutinación de *B. bronchiseptica* causada por la expresión del gen *bipA* (29) el cual se expresa durante la fase *bvj* cuando se cultiva *B. bronchiseptica* a 29°C (29;30); sin embargo, con respecto al gen *bipA* no hay ninguna relación reportada con el gen de pertactina. Asimismo no se encontró ninguna referencia relacionada al fenómeno con *E. coli* y la pertactina.

En la evaluación de la síntesis de proteínas de la *E. coli* transformada con el pBH7D46 no se pudo demostrar la presencia de la pertactina con la reacción de *Western blot*; sin embargo, sí se detectó una reacción a partir de los sobrenadantes de los cultivos de células HeLa y anticuerpos policlonales contra *B. bronchiseptica*. En un primer ensayo, se intentó la transfección de las células con el vector solo, pero no hubo reacción en la prueba de inmunotransferencia. En un segundo ensayo, se agregó el co-polímero Carbopol 934™ en una concentración final del 1% con lo cual se pudo detectar la presencia de dos proteínas que reaccionaron con el suero policlonal. Una presentó un peso similar al producido por la *E. coli* transformada con el pBH7 (115 kDa), pero también hubo reacción con otra proteína de un peso de 35 kDa. Esta reacción no pudo ser detectada en los cultivos testigos negativos

La evaluación de la inmunidad en los ratones vacunados mostró que las proteínas totales de *E. coli* transformada con el plásmido pBH7E9 generó inmunidad protectora al desafiarlos con una suspensión de bacterias patógenas, aunque los valores de absorbancia en las pruebas de ELISA en la evaluación de la respuesta a la vacunación y

durante el proceso de desafío no fueron equiparables a los generados por los ratones inmunizados con la bacterina de *B. bronchiseptica*.

Tal y como se describió en los sub-capítulos de Moléculas antigénicas de *B. bronchiseptica* y en Inmunidad adquirida contra *B. bronchiseptica*, la producción de anticuerpos contra Prn generan protección (46;92). Actualmente se sabe que la participación de los linfocitos Th1 son una pieza fundamental para la protección, esto parecería ser una contradicción debido a que los linfocitos Th2 son los responsables de la regulación de la síntesis de anticuerpos; sin embargo los Th1 producen IFN γ , el cual, por un lado, activa a macrófagos, pero por otro, participa en la regulación de la síntesis de anticuerpos IgG2a del ratón y promueve la formación de receptores Fc γ RI (55;92). Con todo esto, la destrucción y eliminación de microorganismos de las vías respiratorias es mucho más efectiva ya que no sólo es la activación de los macrófagos lo que contribuye a la limpieza de las vías respiratorias, sino que también se aprovecha la capacidad de opsonización por parte de los anticuerpos y la presencia de receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas en las células fagocíticas (15). Mahon *et al.* menciona, que si bien los anticuerpos trasudados a las vías respiratorias son útiles para controlar la invasión por *Bordetella*, también dice que la participación de la IL12 e IFN γ son necesarios para activar a las células fagocíticas profesionales y así eliminar a la bacteria del tracto respiratorio (92). Por otro lado, también se pueden dar otros mecanismos inmunológicos, los cuales no fueron detectados en este trabajo, como sería la producción de anticuerpos secretorios.

Se han descrito diferentes dosis de pertactina para inmunizar ratones y han sido de 0.125, 0.5, 2 y 8 μ g de Prn purificada por vía intranasal con revacunación en el día 14 (79), 5 μ g de Prn de *Bordetella pertussis* por vía subcutánea con revacunación el día 28 (49), hasta 20 μ g por vía intramuscular con revacunación el día 52 (93). Tomando como base los datos anteriores y considerando que en este trabajo se utilizó un lisado de *E. coli* con Prn recombinante como inmunógeno experimental, se hizo el ajuste en la concentración de proteína a 60 μ g de proteínas totales por dosis/ratón, ya que si se aplicaba la dosis convencional de 1.5 μ g por animal (77), la respuesta era demasiado pobre para conferir protección. En el trabajo de Guiso *et al.* (79), la dosis con la que obtuvo el mayor índice de protección durante el desafío fue la de 8 μ g por vía intranasal (79).

Aunque el sistema de evaluación utilizado con los ratones desafiados no corresponde a una prueba de potencia típica, se observó que los animales vacunados con el extracto de *E. coli* con la Prn recombinante disminuyeron, de manera significativa a partir del día 16, la cantidad de UFC en pulmón y antes que los ratones vacunados con la bacterina de *B. bronchiseptica* lo cual es una clara muestra de la capacidad que tiene el inmunógeno para generar protección contra la infección causada por este género bacteriano.

Guiso *et al.* lograron reducir el número de UFC en ratones vacunados con vacunas acelulares de *Bordetella pertussis* hasta el día 15; sin embargo, los conteos que muestran en sus gráficos no llegaron a 0 (79), esta diferencia puede deberse a que utilizaron ratones Balb/c en sus experimentos, los cuales son una cepa endogámica y que presentan un balance Th1:Th2 en favor de los Th2, mientras que en este trabajo se utilizaron ratones CD1, que son clasificados dentro de las cepas abiertas o exogámicas con un balance Th1:Th2 a favor de los Th1 (6;66;94;95). En las figuras 1, 2 y 3 del trabajo de Guiso *et al.* (79), la curva de UFC recuperada de los animales testigos es muy semejante a la obtenida en este trabajo.

Se observó que los ratones inmunizados con el lisado de *E. coli* que contenía a la Prn recombinante desarrollaron una respuesta secundaria en la revacunación del día 14 así como en el día 7 post-desafío, mientras que los ratones vacunados con la bacterina de *B. bronchiseptica* sólo mostraron una respuesta secundaria al desafío pero no se aprecia durante la revacunación del día 14. Esta variación es probable que se deba a que, en la prueba de ELISA, se utilizaron como antígenos de prueba el extracto de proteínas totales o proteínas de membrana externa de *B. bronchiseptica*, donde los sueros de los ratones inmunizados con la pertactina recombinante, sólo detectaron a ésta, mientras que los sueros de los animales vacunados con la bacterina de *B. bronchiseptica* reaccionaron además con otras moléculas presentes en el antígeno de captura, lo cual explica también, el por qué los ratones vacunados con la bacterina de *B. bronchiseptica* presentaron valores de absorbancia mayores a los de los sueros de ratones inmunizados con Prn recombinante.

Los ratones vacunados con el pBH7D46 no mostraron signos de inmunidad humoral ni inmunidad protectora contra *B. bronchiseptica*. Asimismo no se observaron signos de que haya inducido tolerancia, ya que, tanto la curva de anticuerpos detectados en el proceso de desafío como en las UFC's recuperadas de pulmón, no hubo diferencias significativas

con relación a los testigos negativos. Todo esto pudo haberse debido a que no se logró translocar el pBH7D46 en las células del sitio de inoculación. Esto parecer ser un problema común en las terapias génicas y con las vacunas de ADN, ya que algunos investigadores han propuesto el uso de técnicas como la de electroporación *in vivo* (96-98) o el sistema *gene gun* con microesferas de oro (99;100).

Otro factor asociado a la falta de respuesta a la vacunación con el pBH7D46 pudo haberse debido a que no se logró inducir la síntesis de proteínas con el promotor del citomegalovirus (CMV) humano que contiene el vector (101). El manual de usuario del vector pVAX1 establece que, para el buen funcionamiento del promotor del CMV en la síntesis de proteínas producidas por el vector, deberá existir una secuencia Kosak de iniciación de la traducción justo antes del ATG del codón de inicio (102). La importancia de este sitio radica en que permite la acción de una nucleoproteína que facilita la unión a la subunidad 40S de los ribosomas. Esta secuencia nucleotídica es conocida como "sitios internos de entrada del ribosoma" (IRES: *internal ribosome entry site*) y poder así iniciar la traducción de la proteína (103); en el análisis de la secuencia del gen de pertactina clonado en el pBH7, no se detectó la presencia del fragmento Kosak en el ATG del codón de inicio, lo que podría explicar el fracaso de la expresión de proteínas en los ratones vacunados con el pBH7D46; sin embargo, en los cultivos de células HeLa transfectados con este vector, sí expresaron la pertactina, la cual fue detectada con la prueba de *Western blot* con anticuerpos policlonales contra *B. bronchiseptica*. Para dar una explicación a este fenómeno existen dos principios bioquímicos que son: 1. la presencia de proteínas que protegen al ARNm de la acción de las RNAsas, éstas proteínas "estabilizadoras" del ARN han sido nombradas "falsas proteínas de unión a sitios internos de entrada del ribosoma" (*putative IRES-binding proteins*), este proceso fue identificado en el tropismo tisular que tienen algunos virus para replicarse en ciertos tejidos, ya que si las células infectadas por el agente viral carecen de estas proteínas estabilizadoras del ARNm, éste será degradado y el virus no podrá causar un daño (103) y 2. La degradación del ARNm en células eucarióticas puede ocurrir también por la presencia de marcos abiertos de lectura anteriores (uORF: *upstream open reading frame*) a un sitio sin traducción (UTR: *untranslate region*), es decir, un ARNm policistrónico que contengan uno o más codones de inicio con sus respectivos codones de terminación ubicados entre el promotor y el codón de inicio de la proteína que se espera que se exprese (104), En este último caso, el gen *pm* clonado en el pBH7 presenta un ATG a partir del nucleótido 5 del inserto y hay un TAA a partir del nucleótido 16, lo cual muestra que 1. El codón de inicio

no está en fase con el codón de finalización y 2. El codón de inicio se encuentra en posición +2 con relación al promotor CMV. Si esto fuera la causa de la falta de traducción del gen *prn* en las células de los ratones, probablemente ocurrieron mutaciones puntuales por inserción entre estos dos sitios para formar un uORF durante el proceso de subclonación del gen al desarrollar el pBH7D46, lo cual se tendría que probar mediante la obtención de la secuencia del inserto clonado en el vector pVAX1.

En el estudio de los factores que influyen en la eficacia de las vacunas génicas, es el adyuvante (105). Se han desarrollado una gran variedad de adyuvantes para vacunas, pero son pocos los utilizados con las vacunas de ADN (106). El objetivo que debe cumplir el adyuvante es el de facilitar la translocación del vector a las células del sitio de aplicación (101). Por lo que se han utilizado para este propósito lípidos que puedan fusionarse a la membrana celular o polímeros sintéticos que contribuyan a la adhesión celular del vector para facilitar la transfección (107-112). En uno de los ensayos de transfección con el pBH7D46 sin adyuvante, no se logró detectar la presencia de la pertactina en el medio de cultivo de las células utilizadas en la prueba; sin embargo, cuando se agregó el Carbopol 934™ al pBH7D46 y éste se agregó al cultivo celular, se identificó la presencia de la proteína en el sobrenadante mediante la prueba de *Western blot*.

Aunque los resultados obtenidos con la vacuna acelular son positivos, se considera necesario realizar más investigaciones con el inmunógeno acelular de *E. coli* con Prn recombinante para conocer a fondo los mecanismos inmunológicos que se activan durante el desarrollo de la respuesta inmunitaria celular y humoral así como el efecto sobre los mecanismos de inmunidad innata asociados al proceso.

En este trabajo se obtuvieron resultados positivos y negativos con la vacuna de ADN elaborada con el pBH7D46 ya que, por un lado, se demostró la transfección de cultivos celulares con éste vector, pero por otro, no se pudo inducir inmunidad protectora en los ratones vacunados. Por lo que es necesario continuar los estudios con este inmunógeno para definir las condiciones idóneas para su empleo como vacuna, para lo cual se propone la subclonación en otro vector que permita hacer un monitoreo del vector en el sitio de aplicación.

Prospectiva

Purificación de la pertactina recombinante para la producción de anticuerpos monoclonales y para utilizarla como antígeno en pruebas inmunológicas.

Determinar la dosis efectiva de la vacuna acelular de *E. coli* con pertactina recombinante en perros.

Evaluación de los mecanismos de activación de la inmunidad celular y humoral en la inmunización con pertactina recombinante.

Evaluar la inmunidad de la pertactina combinada con otros inmunógenos.

Realizar la subclonación del gen de pertactina en otros vectores para vacunas de ADN con los cuales se pueda monitorear la síntesis de proteínas.

Evaluar la capacidad de transfección *in vivo* e *in vitro* así como el poder inmunogénico del vector pBH7D46 al mezclarlo con otros adyuvantes

8. Conclusiones

*“Lo verdadero es demasiado sencillo, pero siempre se llega a ello
por lo más complicado”
George Sand*

- 8.1** Se logró la amplificación clonación y expresión del gen *prn* de *B. bronchiseptica*.
- 8.2** La estructura tridimensional de la pertactina de la *B. bronchiseptica* P98 y cuyo gen fue clonado en el pBH7 presenta una homología del 89% con relación a la pertactina de *Bordetella pertussis*. Las variaciones más importantes se localizan a nivel del asa del dominio RGD lo cual podría explicar la capacidad que tiene *B. bronchiseptica* para infectar a diversas especies animales.
- 8.3** La vacuna elaborada con el lisado de *E. coli* con pertactina recombinante resultó inmunogénica para los ratones, los cuales mostraron protección al ser desafiados con una suspensión de bacterias patógenas.
- 8.4** La vacuna de ADN elaborada con el vector pBH7D46 no generó inmunidad protectora para los ratones vacunados por lo que se requiere de más estudios.

9. Referencias

*“Las personas trascienden cuando su obra perdura más
que su propia vida”
Francisco J. Basurto A.*

9. Referencias

1. Gerlacha G, Von Wintzingerodeb F, Middendorfa B, Grossa R. Evolutionary trends in the genus *Bordetella*. *Microbes and Infection* 2001; 3:61-72.
2. Parton R.. Review of the biology of *Bordetella pertussis*. *Biologicals* 1999; 27,71-76.
3. Parkhill J, Sebahia M, Preston A, Murphy LD, Thomsom N, Harris DE, *et al*. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nature Genetics* 2003; advance online publication:1-9.
4. Kirimanjeswara GS, Mann PB, Harvill ET. Role of antibodies in immunity to *Bordetella* infections. *Infection and Immunity*, 2003; vol. 71, (no. 4):1719-1724.
5. Rajeev S, Kania SA, Nair RV, Mc Pherson JT, Moore RN, Bemis DA. *Bordetella bronchiseptica* fimbrial protein-enhanced immunogenicity of a *Mannheimia haemolytica* leukotoxin fragment . *Vaccine* 2001; 19:4842-4850.
6. Bemis DAS. *Bordetella bronchiseptica* infection of rats and mice. *Comparative Medicine* 2003; 53(1):11-20.
7. Bemis DA, Shek WR, Clifford CB. *Bordetella bronchiseptica* infection of rats and mice. *Comp Med* 2003; 53(1):11-20.
8. Keil DJ, Fenwick B. Evaluation of canine *Bordetella bronchiseptica* isolates using randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting and ribotyping . *Veterinary Microbiology* 1999; 66:41-51.
9. Ausiello CML. Cell-mediated immune responses in four-year-old children after primary immunization with acellular pertussis vaccines. *Infect Immun* 1999; 67(8):4064-4071.
10. Bassinet L, Gueirard P, Maitre B, Housset B, Gounon P, Guiso N. Role of adhesins and toxins in invasion of human tracheal epithelial cells by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 2000; 68(4):1934-1941.
11. Berkelman RL. Human illness associated with use of veterinary vaccines. *Clin infect dis* 2003; 37(3):407-414.
12. Deschutter I, Malfroot A, Dab I, Hoebrekx N, Muyltermans G, Pierard D *et al*. Molecular typing of *Bordetella pertussis* isolates recovered from belgian children and their household members. *Clin Infect Dis* 2003; 36(11):1391-1396.
13. Lorenzo-Pajuelo B, Villanueva JL, Rodriguez-Cuesta J, Vergara-Irigaray N, Bernabeu-Wittel M, Garcia-Curiel A *et al*. Cavitary pneumonia in an AIDS patient caused by an unusual *Bordetella bronchiseptica* variant producing

- reduced amounts of pertactin and other major antigens. *J Clin Microbiol* 2002; 40(9):3146-3154.
14. Gueirard P, Weber C, Le Coustumier A, Guiso N. Human *Bordetella bronchiseptica* infection related to contact with infected animals: persistence of bacteria in host. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995; 33(8):2002-2006.
 15. Mattoo S, Foreman-Wykert AK, Cotter PA, Miller JF. Mechanisms of *Bordetella* pathogenesis . *Frontiers in bioscience* 2001; 6:168-186.
 16. Von Wintzingerode F, Schattke A, Siddiqui RA, Rösick U, Göbel UB, Gross R. *Bordetella petrii* sp. Nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2001; 51:1257-1265.
 17. Bogdan JA, Nazario-Larrieu J, Sarwar J, Alexander P, Blake MS. *Bordetella pertussis* autoregulates pertussis toxin production through the metabolism of cysteine. *Infection and Immunity*, 2001; 69(11):6823-6830
 18. Regan J, Lowe F. Enrichment medium for the isolation of *Bordetella*. *J Clin Microbiol* 1977; 6(3):303-309.
 19. Henderson IR, Nataro JP. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infection and Immunity*, 2001; 69(3):1231-1243.
 20. Spears PA, Temple LM, Orndorff PE. A role for lipopolysaccharide in turkey tracheal colonization by *Bordetella avium* as demonstrated in vivo and in vitro. *Mol Microbiol* 2000; 36(6):1425-1435.
 21. Cotter PA, Yuk MH, Mattoo S, Akerley BJ, Boschwitz J, Relman DA *et al*. Filamentous hemagglutinin of *Bordetella bronchiseptica* is required for efficient establishment of tracheal colonization. *Infection and Immunity*, 1998; 66(12):5921-5929.
 22. Mattoo S, Miller Jf, Cotter PA. Role of *Bordetella bronchiseptica* fimbriae in tracheal colonization and development of a humoral immune response. *Infect Immun* 2000; 68(4):2024-2033.
 23. Finn TM, Amsbaugh DF. Vag8, a *Bordetella pertussis* bug-regulated protein. *Infect Immun* 1998; 66(8):3985-3989.
 24. Bock AG. The bvgas two-component system of *Bordetella* spp.: a versatile modulator of virulence gene expression. *International Journal of Medical Microbiology*: 2001; 291(2):119-130.
 25. Brickman TJ, Armstrong SK. Alcaligin siderophore production by *Bordetella bronchiseptica* strain RB50 is not repressed by the *bvgAS* virulence control system. *J Bacteriol* 2002; 184(24):7055-7057.
 26. Jungnitz H, West NP, Walker MJ, Chhatwal GS, Guzman CA. A second two-component regulatory system of *Bordetella bronchiseptica* required for

- bacterial resistance to oxidative stress, production of acid phosphatase, and in vivo persistence. *Infect Immun* 1998; 66(10):4640-4650.
27. Zimna K, Medina E, Jungnitz H, Guzmán CA. Role played by the response regulator *ris* in *Bordetella bronchiseptica* resistance to macrophage killing. *Fems Microbiology Letters* 2001; 201:177-180.
 28. Brockmeier SL, Register KB. Effect of temperature modulation and *bvg* mutation of *Bordetella bronchiseptica* on adhesion, intracellular survival and cytotoxicity for swine alveolar macrophages. *Veterinary Microbiology* 2000; 73:1-12.
 29. Stockbauer KE, Fuchslocher B, Miller JF, Cotter PA. Identification and characterization of *bipA*, a *Bordetella bvg*-intermediate phase protein. *Mol Microbiol* 2001; 39(1):65-78.
 30. Fuchslocher B, Millar LL, Cotter PA. Comparison of *bipA* alleles within and across *Bordetella* species. *Infect Immun* 2003; 71(6):3043-3052.
 31. Stockbauer KE, Foreman-Wykert AK, Miller JF. *Bordetella* type III secretion induces caspase 1-independent necrosis. *Cellular Microbiology* 2003; 5(2):123-132.
 32. Winstanley C, Hales BA, Sibanda LM, Dawson S, Gaskell RM, Hart CA. Detection of type III secretion system genes in animal isolates of *Bordetella bronchiseptica*. *Veterinary Microbiology* 2000; 72:329-337.
 33. Hy M, Harvill ET, Cotter PA, Miller JF. Modulation of host immune responses, induction of apoptosis and inhibition of NF- κ B activation by the *Bordetella* type III secretion system. *Mol Microbiol* 2000; 35(5):991-1004.
 34. Forde CB, Shi X, Li J, Roberts M. *Bordetella bronchiseptica*-mediated cytotoxicity to macrophages is dependent on *bvg*-regulated factors, including pertactin. *Infect Immun* 1999; 67(11):5972-5978.
 35. Gueirard P, Druilhe A, Pretolani M, Guiso N. Role of adenylate cyclase-hemolysin in alveolar macrophage apoptosis during *Bordetella pertussis* infection in vivo. *Infect Immun* 1998; 66(4):1718-1725.
 36. Martinez de Tejada G, Cotter PA, Heininger U, Camilli A, Akerley BJ, Mekalanos JJ *et al*. Neither the *bvg* phase nor the *vir* locus of *Bordetella pertussis* is required for respiratory infection in mice. *Infect Immun* 1998; 66(6):2762-2768.
 37. Pradel E, Guiso N, Loch C. Identification of *alcR*, an *araC*-type regulator of alcaligin siderophore synthesis in *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* 1998; 180(4):871-880.
 38. Luker KE, Collier JAL, Kolodziej EW, Marshall GR, Goldman WE. *Bordetella pertussis* tracheal cytotoxin and other muramyl peptides: distinct structure-activity relationships for respiratory epithelial cytopathology. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90:2365-2369.

39. Harvill ET, Preston A, Cotter PA, Allen AG, Maskell DJ, Miller JF. Multiple roles for *Bordetella* lipopolysaccharide molecules during respiratory tract infection. *Infect Immun* 2000; 68(12):6720-6728.
40. Gauthier A, Thomas NA, Finlay BB. Bacterial injection machines. *J Biol Chem* 2003; 278(28):25273-25276.
41. Matsuzawa T, Kashimoto T, Katahira J, Horiguchi V. Identification of a receptor-binding domain of *Bordetella* dermonecrotic toxin. *Infect Immun* 2002; 70(7):3427-3432.
42. Bagley KC, Abdelwahab SF, Tuskan RG, Fouts TR, Lewis GK. Pertussis toxin and the adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* activate human monocyte-derived dendritic cells and dominantly inhibit cytokine production through a camp-dependent pathway. *J Leukoc Biol* 2002; 72(5):962-969.
43. Guermonprez P, Khelef N, Blouin E, Rieu P, Ricciardi-Castagnoli P, Guiso N *et al*. The adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* binds to target cells via the $\alpha\beta$ integrin (cd11b/cd18). *J Exp Med* 2001; 193(9):1035-1044.
44. El-Azami-El-Idrissi M, Bauche C, Loucka J, Osicka R, Sebo P, Ladant D *et al*. Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with cd11b/cd18: role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain. *J Biol Chem* 2003; 278(40):38514-38521.
45. Rambow AA, Fernandez RC, Weiss AA. Characterization of *brkA* expression in *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun* 1998; 66(8):3978-3980.
46. Montaraz JA, Novotny P, Ivanyi J. Identification of a 68-kilodalton protective protein antigen from *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun* 1985; 47(3):744-751.
47. Novotny P., Kobisch M., Cownley K., Chubb AP, Montaraz JA. Evaluation of *Bordetella bronchiseptica* vaccines in specific-pathogen-free piglets with bacterial cell surface antigens in enzyme-linked immunosorbent assay. *Infection and Immunity* 50[1], 190-198. 1985.
48. Register KB. Novel genetic and phenotypic heterogeneity in *Bordetella bronchiseptica* pertactin. *Infect Immun* 2001; 69(3):1917.
49. King AJ, Berbers G, Van Oirschot HFLM, Hoogerhout P, Knipping K, Mooi FR. Role of the polymorphic region 1 of the *Bordetella pertussis* protein pertactin in immunity. *Microbiology* 2001; 147(11):2885.
50. Mooi FR, He Q, Van Oirschot H, Mertsola J. Variation in the *Bordetella pertussis* virulence factors pertussis toxin and pertactin in vaccine strains and clinical isolates in finland. *Infect Immun* 1999; 67(6):3133.
51. Chalker VJ, Toomey C, Opperman S, Brooks HW, Ibuoye MA, Brownlie J *et al*. Respiratory disease in kennelled dogs: serological responses to *Bordetella bronchiseptica* lipopolysaccharide do not correlate with bacterial isolation or clinical respiratory symptoms. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10(3):352-356.

52. Charles AJ, Ruslan M. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:197-216.
53. Van Crevel R, Ottenhoff THM, Van Der Meer JWM. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(2):294-309.
54. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. Immune response to infectious diseases. In: Goldsby Richard A, Kindt Thomas J., Osborne Barbara A., Kuby Janis, editors. *Immunology*. New York: W.H. Freeman, 2003: 389-412.
55. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and molecular immunology*. 4th ed. Philadelphia.: Saunders, 2000.
56. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:189-220.
57. Kerekes K, Prechl J, Bajtay Z, Józsi M, Erdei A. A further link between innate and adaptive immunity: C3 deposition on antigen-presenting cells enhances the proliferation of antigen-specific T cells. *Int Immunol* 1998; 10(12):1923-1930.
58. Carroll MC. The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:545-568.
59. Risso A. Leukocyte antimicrobial peptides: multifunctional effector molecules of innate immunity. *J Leukoc Biol* 2000; 68:785-792.
60. Zhang G, Ghosh S. Toll-like receptor-mediated NF- κ B activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest* 2001; 107(1):13-19.
61. Haynes LM, Moore DD, Kurt-Jones EA, Finberg RW, Anderson LJ, Tripp RA. Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. *Journal of Virology* 2001; 75(22):10730-10737.
62. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu VJ *et al*. Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology* 2000; 18(1):767-811.
63. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig Michel C. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:685-711.
64. Nakanishi K, Yoshimoto Tomohiro, Haruki Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:423-474.
65. Gately MK, Renzetti LM, Magrath Jeanne, Stern LS, Adorini L, Gubler U *et al*. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:495-521.
66. Szeto CC, Gillespie KM, Mathieson PW. Levamisole induces interleukin-18 and shifts type 1/type 2 cytokine balance. *Immunology* 2000; 100:217-224.

67. Ryan M, Mc Carthy L, Rappuoli R, Mahon BP, Mills KHG. Pertussis toxin potentiates th1 and th2 responses to co-injected antigen: adjuvant action is associated with enhanced regulatory cytokine production and expression of the co-stimulatory molecules b7-1, b7-2 and cd28 . *Int Immunol* 2003; 10(4):651-662.
68. Mills KHG. Immunity to *Bordetella pertussis*. *Microbes and Infection* 2001; 3:655-677.
69. Watanabe M, Naga M. Reciprocal protective immunity against *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in a murine model of respiratory infection . *Infect Immun* 2001; 69(11):6981-6986.
70. Schutte BC, Mc Cray PB. Defensins in lung host defense. *Annual Review of Physiology* 2002; 64(1):709-748.
71. Molina González MG. Aislamiento y caracterización de *Bordetella bronchiseptica* de origen canino. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán; Universidad Nacional Autónoma de México, 2001.
72. Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ. Rapid extraction of genomic DNA with guanidinium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol* 1989; 8:151-156.
73. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Alkaline lysis. *Molecular cloning a laboratory manual*. 1989: 1.25-1.28.
74. Li J, Fairweather NF, Novotny Pavel, Dougan G, Charles IG. Cloning, nucleotide sequence and heterologous expression of the protective outer-membrane protein p.68 pertactin from *Bordetella bronchiseptica*. *Journal of General Microbiology* 2003; 138:1697-1705.
75. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annal.Biochem.* 1, 248-254. 1976.
76. Matsuyama SI, Inokuchi K, Mizushima. Promoter exchange between ompf and ompc, genes for osmoregulated major outer membrane proteins of *Escherichia coli* k-12. 1984. *J bacteriology* 158.[3], 1041-1047. 1984.
77. Pastoret PP, Vannier P. *Veterinary Vaccinology*. 1st ed. Oxford: Elsevier, 1997.
78. Graber A, Zingales B. Alternative method to remove antibacterial antibodies from antisera used for screening of expression libraries. *Biotechniques* 19, 28-30. 1985.
79. Guiso N, Capiou C, Carletti G, Poolman J, Hauser P. Intranasal murine model of *Bordetella pertussis* infection. I. Prediction of protection in human infants by acellular vaccines. *Vaccine* 1999; 17(19):2366-2376.
80. Sahron M, Washington JA. Antibacterial susceptibility test: dilution methods. In: Ballows Albert, Hausler William J., Herrmann Keneth L., Isenberg Henry D.,

Shadommy Lean, editors. Manual of clinical microbiology. ASM, 1991: 1105-1116.

81. Brock t, Ward DM. Basic microbiology with applications. 3rd edition. Ed. USA, prentice hall, 1986.
82. Westfall B, SK, Solus J, Hughes J, Rashtchian A, *et al.* Improved PCR specificity and yield with platinumtm *taq* DNA polymerase. Focus 19[3], 46-48. 1997.
83. Westfall B, Sitaraman K, Lee JE, Borman J, Rashtchian A. Platinum *pfx* DNA polymerase for high-fidelity PCR. Focus 21[2], 46-48. 1999.
84. BL21(DE3) competent cells, BL21(DE3)pLyss competent cells, and BL21 competent cells. Instruction manual. Stratagene, editor. Revision #083004c, 1-11. 2003. Stratagene.
85. Protein expression and purification facility: expression in *Escherichia coli*. [Http://www.embl-heidelberg.de/externalinfo/geerlof/draft_frames/flowchart/exp_e_coli/expression_ecoli.html](http://www.embl-heidelberg.de/externalinfo/geerlof/draft_frames/flowchart/exp_e_coli/expression_ecoli.html) . 11-9-2001.
86. Pet system manual. Novagen 10th. 2002. *Cn biosciences, inc.*
87. Charles I, Fairweather N, Pickard D, Beesley J, Anderson R, Dougan G, *et al.* Expression of the *Bordetella pertussis* p.69 pertactin adhesin in *Escherichia coli*: fate of the carboxy-terminal domain. Microbiology 140[12], 3301-3308. 1994.
88. Reed AL, Yamazaki H, Kaufman JD, Rubinstein Y, Murphy B, Johnson AC. Molecular cloning and characterization of a transcription regulator with homology to GC-binding factor. J Biol Chem 1998; 273(34):21594-21602.
89. Widner WR, Whiteley HR. Two highly related insecticidal crystal proteins of bacillus thuringiensis subsp. kurstaki possess different host range specificities. Journal of Bacteriology 171[2], 965-974. 1989.
90. Lewin B. Genes VII. 8th ed. Oxford: Oxford University press, 2003.
91. Oxer MD, Bentley CM, Doyle JG, Peakman TC, Charles IG, Makoff AJ. High level heterologous expression in *E. coli* using the anaerobically- activated *nirB* promoter. Nucleic Acids Res 1991; 19(11):2889-2892.
92. Mahon BP, Ryan MS, Griffin F, Mills KH. Interleukin-12 is produced by macrophages in response to live or killed *Bordetella pertussis* and enhances the efficacy of an acellular pertussis vaccine by promoting induction of th1 cells. Infect Immun 1996; 64(12):5295-5301.
93. Charles IG, Li JL, Roberts M, Beesley K, Romanos M, Pickard DJ *et al.* Identification and characterization of a protective immunodominant B cell epitope of pertactin (p.69) from *Bordetella pertussis*. Eur J Immunol 1991; 21(5):1147-1153.

94. Scott P. IFN-gamma modulates the early development of th1 and th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* 1991; 147(9):3149-3155.
95. Basurto-Alcántara FJ. Evaluación del estado inmunológico del ratón desnudo et/et. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, 1996.
96. Scheerlinck JPY, Karlis J, Tjelle TE, Presidente PJA, Mathiesen I, Newton SE. In vivo electroporation improves immune responses to DNA vaccination in sheep. *Vaccine* 2004; 22(13-14):1820-1825.
97. Otten G, Schaefer M, Doe B, Liu H, Srivastava I, Megede JZ *et al.* Enhancement of DNA vaccine potency in rhesus macaques by electroporation. *Vaccine* 2004; 22(19):2489-2493.
98. Takada A, Watanabe S, Okazaki K, Kida H, Kawaoka Y. Infectivity-enhancing antibodies to Ebola virus glycoprotein. *J Virol* 2001; 75(5):2324-2330.
99. Zuber AK, Brave A, Engstrom G, Zuber B, Ljungberg K, Fredriksson M *et al.* Topical delivery of imiquimod to a mouse model as a novel adjuvant for human immunodeficiency virus (HIV) DNA. *Vaccine* 2004; 22(13-14):1791-1798.
100. Thomsen LL, Topley P, Daly MG, Brett SJ, Tite JP. Imiquimod and resiquimod in a mouse model: adjuvants for DNA vaccination by particle-mediated immunotherapeutic delivery. *Vaccine* 2004; 22(13-14):1799-1809.
101. Donnelly J, Liu MA, Ulmer JB. Antigen presentation and DNA vaccines. *Am J Respir Crit Care Med* 162, s190-s193. 2000.
102. Manual de usuario: vector pVAX1. Invitrogen life technologies, editor. Version b. 2002.
103. Kozak M. Alternative ways to think about mRNA sequences and proteins that appear to promote internal initiation of translation. *Gene* 318, 1-23. 30-10-2003.
104. Oliveira CC, McCarthy JEG. The relationship between eukaryotic translation and mRNA stability. *J Biol Chem* 1995; 270(15):8936-8943.
105. Shedlock DJ, Weiner DB. DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *Journal of Leukocyte Biology* 68, 793-806. 2000.
106. Butts C, Zubkoff I, Robbins DS, Cao S, Sarzotti M. DNA immunization of infants: potential and limitations. *Vaccine* 1998; 16(14-15):1444-1449.
107. Morrow WJ, Sheikh NA. Summary: modern vaccine adjuvants and delivery systems meeting, Dublin, 4-6 June 2003. *Vaccine* 2004; 22(19):2361.
108. Lima KM, Dos Santos SA, Rodrigues J, Silva CL. Vaccine adjuvant: it makes the difference. *Vaccine* 2004; 22(19):2374-2379.

109. Pearse MJ, Drane D. ISCOMATRIX™ adjuvant: a potent inducer of humoral and cellular immune responses. *Vaccine* 2004; 22(19):2391-2395.
110. Holmgren J, Czerkinsky C, Eriksson K, Mharandi A. Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges. *Vaccine* 2003; 21(supplement 2):s89-s95.
111. Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunology and cell biology* 2004; 82(5):488-496.
112. Jin H, Li Y, Ma A, Zhang F, Xie Q, Gu D *et al.* Effect of chemical adjuvants on DNA vaccination. *Vaccine* 2004; 22(21-22):2925-2935.

10. Cuadros

*“La verdad es lo que es, y sigue siendo verdad aunque se piense al revés”
Antonio Machado*

Cuadro 1

Propiedades biológicas y bioquímicas de las especies de *Bordetella* (1)

Característica	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>B. holmesii</i>	<i>B. hinzii</i>	<i>B. avium</i>	<i>B. trematum</i>
Hospedero	Humanos	Humanos y Ovinos	Mamíferos	Humanos	Aves Humanos	Aves reptiles y pавos	humanos
Enfermedad	Tos ferina	Tos ferina benigna	Rinitis atrófica, tos de las perreras, bronco-neumonía,	Septicemia, enfermedad respiratoria	Septicemia, asintomático	Coriza de los pavos	desconocido
Sitio de aislamiento	Tracto respiratorio	Tracto respiratorio	Tracto respiratorio, sangre	Tracto respiratorio, sangre	Tracto respiratorio, sangre	ND	Heridas, infecciones de oído
Contenido de G-C (%)	66-68	66-68	66-68	61.5-62.3	65-67	62	64-65
Tamaño del genoma (kpb)	3 880-4 060	>4 400	>4 400	ND	ND	ND	ND
Motilidad	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Crecimiento en agar McConkey	(-)	(+)	(+)	(+/-)	(+)	(+)	(+)
Catalasa	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Oxidasa	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
Asimilación de Citrato	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

ND* No documentado

Cuadro 2 Cepas y vectores utilizados en este trabajo.

Cepa o vector	Descripción	Origen o referencia
<i>Bordetella bronchiseptica</i> P98	Cepa tipo silvestre, obtenida de un aislamiento de campo origen canino, Prn+.	
<i>Escherichia coli</i> TOP10F'	F' {lacIq Tn10 (TetR)} <i>mcrA</i> .(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> .M15. <i>lacX74 recA1 deoR araD139.(ara-leu)7697 galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i> Esta cepa sobreexpresa el represor Lac. Se puede hacer el escrutinio de colonias azul/blanco mediante la adición de IPTG y X-Gal a las placas de agar LB.	Invitrogen®
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F- ϕ 80 <i>lacZ</i> M15 \square <i>lacZ</i> YA- <i>argF</i>) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsd R17</i> (rk-, mk+) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA</i> (confiere resistencia al fago T1)	Invitrogen®
<i>Escherichia coli</i> Rosetta	<i>E. coli</i> derivada de la cepa Turner. Sintetiza ARNt's para codones raros (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA). Es resistente a cloranfenicol	Novagen®
pCR2.1	Plásmido abierto con extremos cohesivos con una timidina. Posee la enzima topoisomerasa I unida covalentemente al vector ("vector activado"). Tiene los promotores T7 y <i>LacZ</i> . Confiere resistencia a kanamicina y ampicilina	Invitrogen®
pET28a	Plásmido para expresión de proteínas. Posee un promotor T7 con terminador. Confiere resistencia a kanamicina.	Novagen®
pVAX1	Plásmido utilizado para el desarrollo de vacunas de ADN. Posee el promotor para el citomegalovirus humano (CMV), el cual es útil para promover la síntesis de proteínas en células eucarióticas así como el sitio de poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento bovina (BGH polyA). Además tiene el promotor T7 para evaluar la síntesis de proteínas en bacterias que sinteticen la T7 ARN polimerasa. Contiene el gen de resistencia a kanamicina	Invitrogen
pBH7	Plásmido derivado del pCR2.1 con el gen <i>prn</i> .	Este estudio
pBH7E9	Plásmido derivado del pET28a con inserto del gen <i>prn</i> de <i>B. bronchiseptica</i> . El inserto quedó entre el promotor T7 y el terminador T7. Codifica para una cola de polihistidinas. El marco abierto de lectura se encuentra en fas +1 con relación al promotor T7	Este estudio
pBH7D46	Plásmido derivado del pVAX1 con inserto del gen <i>prn</i> de <i>B. bronchiseptica</i> . El inserto quedó entre el promotor del CMV y el sitio BGH polyA con el marco de lectura abierto en fase +1 con relación a los promotores del CMV y el T7	Este estudio

Cuadro 3 Iniciadores para secuenciación del inserto en el pBH7

El número progresivo a la izquierda de cada oligonucleótido identifica a la fase de secuenciación. M13 corresponde al iniciador que se alinea con el promotor en el vector pCR2.1 junto al sitio de clonación múltiple. Los valores entre paréntesis indican el la sección de bases detectadas en el proceso de secuenciación

<i>Adelantado 5'-3'</i>	<i>Reverso 5'-3'</i>
1. GTAAAACGACGGCCAG (M13)(-106 A 298)	1. CAGGAAACAGCTATGAC (M13) (-103 A 432)
2. TACGCCGACTGGAACAACCA (238 A 956)	2. ACCTCCAGGCCAGGCGACC (272 A 908)
3. GGGCCAATGAGCTTACGGTT (812 A 1449)	3. GCTTGGACAACGCATTGCT (839 A 1483)
4. ACAACGCCACTGGGTCAT (1424 A 2188)	4. ATGACCCAGGTGGCGTTGT (1451 A 2230)
5. AGTTGCGCCTGAATCCGGAC (2064 A 2902)	5. TTGGCCCCGAATACAGACACCGC (2073 A 3283)

Cuadro 4 Distribución de los ratones en los lotes de experimentación con los diferentes inmunógenos elaborados en este trabajo.

Grupo	Inmunógeno	Revacunación	Muestra	Desafío
0	PBS	PBS	Suero	Sí
1	Bacterina de B.b.	Bacterina de B.b.	Suero	No
2	Bacterina de B.b.	Bacterina de B.b.	Suero	Sí
3	Vacuna ADN pBH7D46	Vacuna ADN pBH7D46	Suero	Sí
4	Extracto de proteínas	Extracto de proteínas	Suero	No
5	Extracto de proteínas	Extracto de proteínas	Suero	Sí
6	Bacterina de E.coli Rosetta	Bacterina de E.coli Rosetta	Suero	Sí
7	Vacuna con pVAX1		Suero	Sí

11. Figuras

*“Si quiere trabajadores creativos, deles tiempo suficiente para jugar”
John Cleese*

Sistema de secreción tipo III

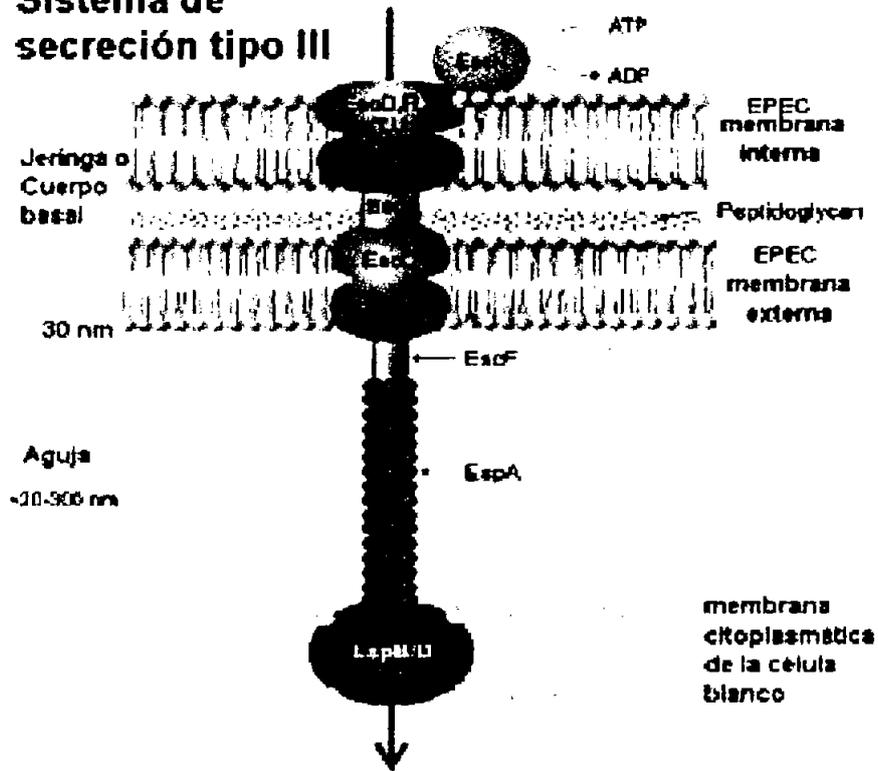


Figura 1. Estructura y ensamblaje de las proteínas del sistema de secreción tipo III.

La flecha indica la ruta de secreción de la toxina.

(Nota: La imagen corresponde a un modelo general y no a las proteínas que conforman el SST3 de *Bordetella*)

Tomado de "Bacterial Injection Machines *J. Biol. Chem.* Vol. 278, No. 28"

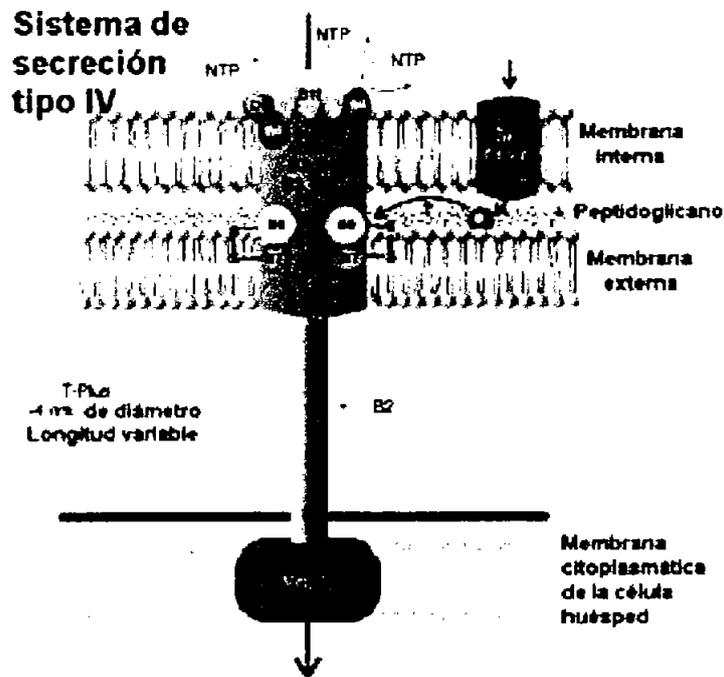
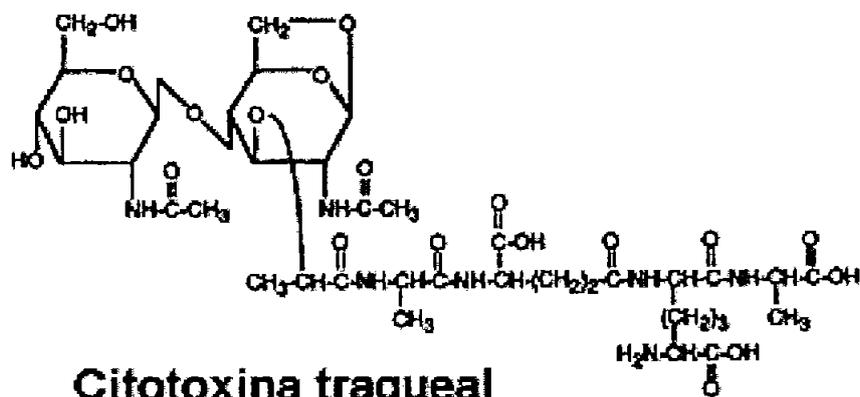


Figura 2. Estructura y ensamble de las proteínas del sistema de secreción tipo IV.

Las flechas indican la ruta que sigue la toxina para ser secretada. La toxina de *pertussis* es dependiente del sistema Sec el cual se muestra en color azul.

(Nota: La identificación de las proteínas es basado en el modelo de *Agrobacterium tumefaciens* y no en el de *Bordetella pertussis*).

Tomado de "Bacterial Injection Machines *J. Biol. Chem.* Vol. 278, No. 28"



Citotoxina traqueal

(GlcNAc-1,8-anhydro-MurNAc-L-Ala-γ-D-Glu-meso-A₂pm-D-Ala)

Figura 3. Composición química de la citotoxina traqueal.

La porción tóxica corresponde a la porción aminoácida.

Tomado de "Bordetella pertussis tracheal cytotoxin and other muramyl peptides. Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 90 1993".

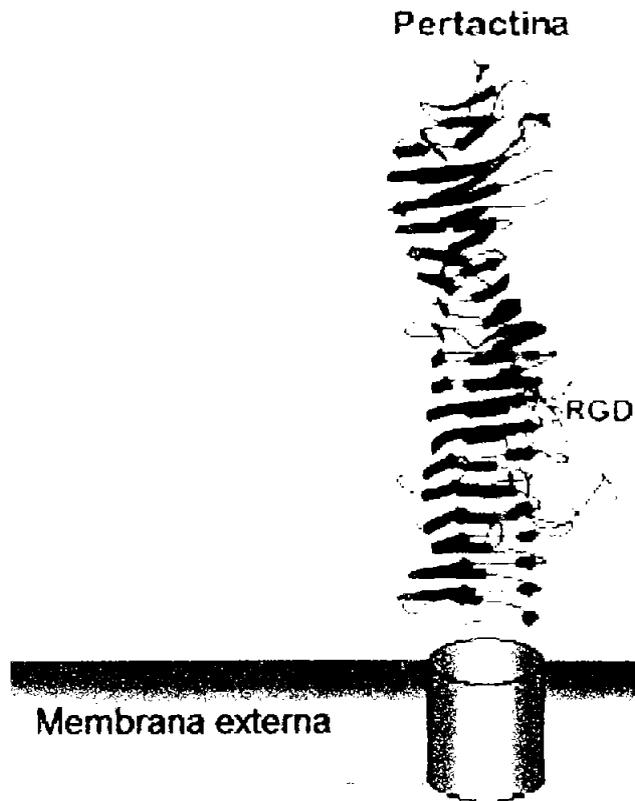


Figura 4. Estructura de la **PERTACTINA** de *Bordetella*.

Tomado de "Adhesins and invasins of pathogenic bacteria: a structural view" *Microbes and Infection*. In press

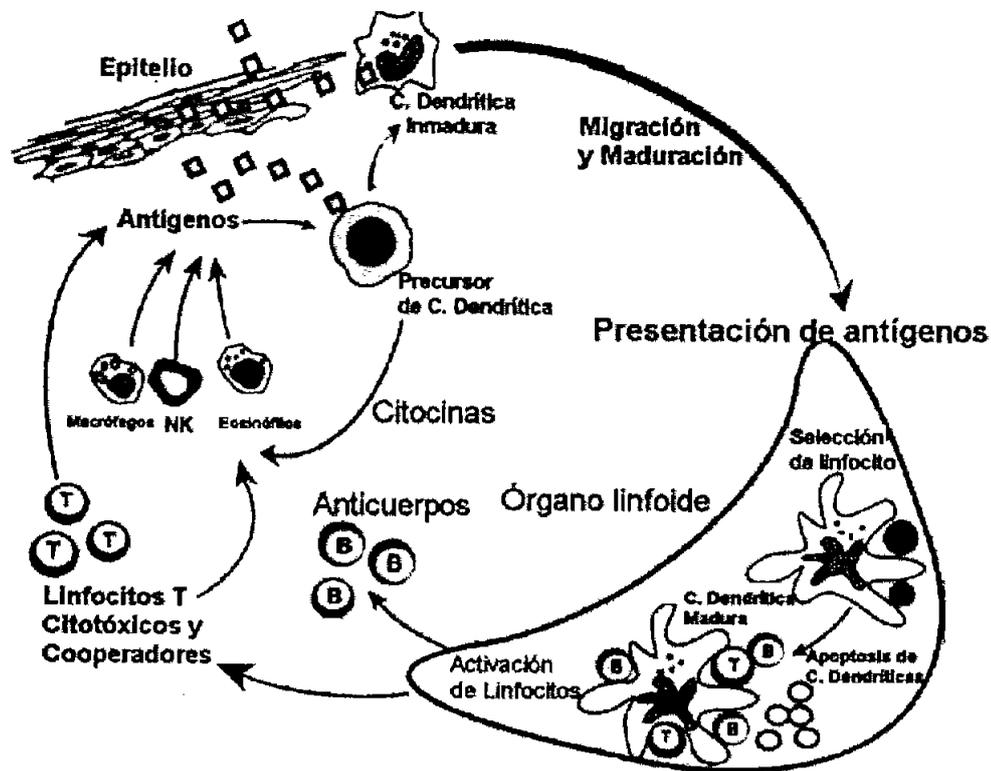


Figura 5. Ciclo de vida de las células dendríticas y su participación en los procesos de Inmunidad Innata y Adquirida. Los antígenos ingresan a través de un epitelio. El precursor de la célula dendrítica los captura mediante fagocitosis o endocitosis y libera citocinas que promueven la actividad microbicida y viricida de macrófagos, células NK y eosinófilos. La célula dendrítica inmadura migra hacia el órgano linfoide más cercano al sitio de la infección. Una vez que la célula dendrítica madura, presenta los antígenos a la clona de linfocito que sea capaz de interactuar su TCR con los epítopos unidos a las moléculas de histocompatibilidad de clase II. Los linfocitos activados por la presentación de antígenos salen a circulación. Los linfocitos B se transforman en células plasmáticas que producen y liberan anticuerpos, mientras que los linfocitos T producen citocinas para producir inflamación, activar la fagocitosis o a las células NK, asimismo, los linfocitos pueden actuar directamente contra los antígenos que ingresaron a través del epitelio. Tomado y traducido de: "Immunobiology of Dendritic Cells". *Ann. Rev. Immunol.* Vol.18. 2000.

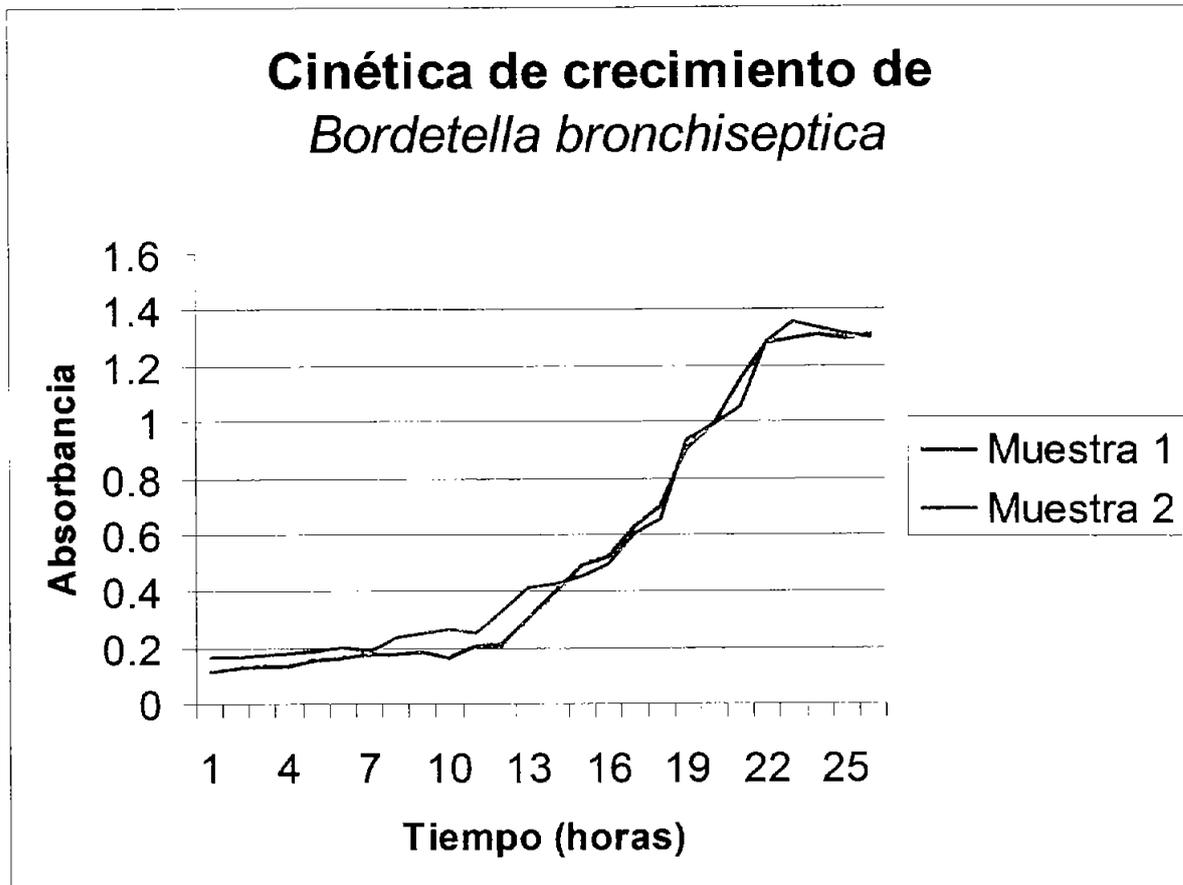


Figura 6. Curva de la cinética de crecimiento de *B. bronchiseptica* donde se observa el desarrollo bacteriano con base en el valor de absorbancia correlacionado con el tiempo de incubación. La curva se desarrolló mediante muestras pareadas.

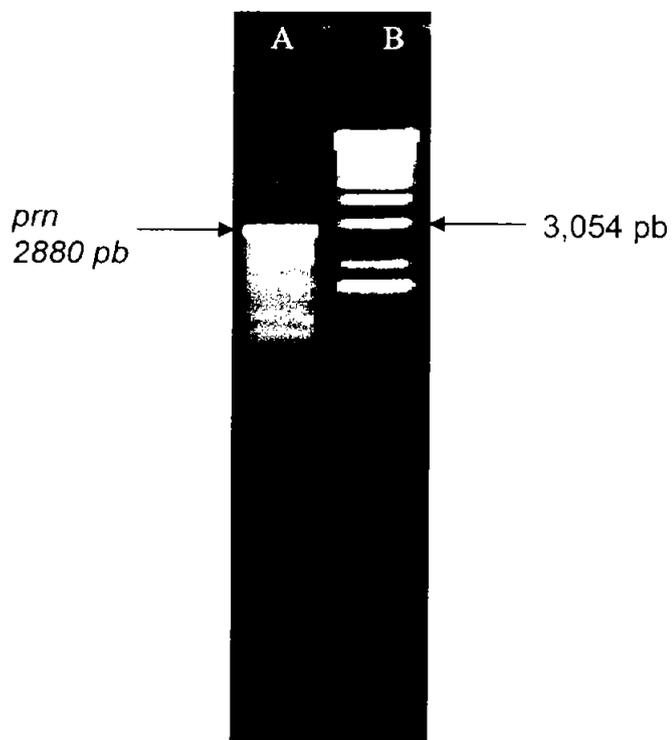


Figura 7.

Fotografía del gel de agarosa con la amplificación del gen *prn* de *B. bronchiseptica* mediante la PCR.

En el carril A se muestra el amplificado de 2880 pb que corresponde al gen *prn*, en el carril B se observa el marcador 1Kb para determinar el tamaño aproximado del producto de PCR.

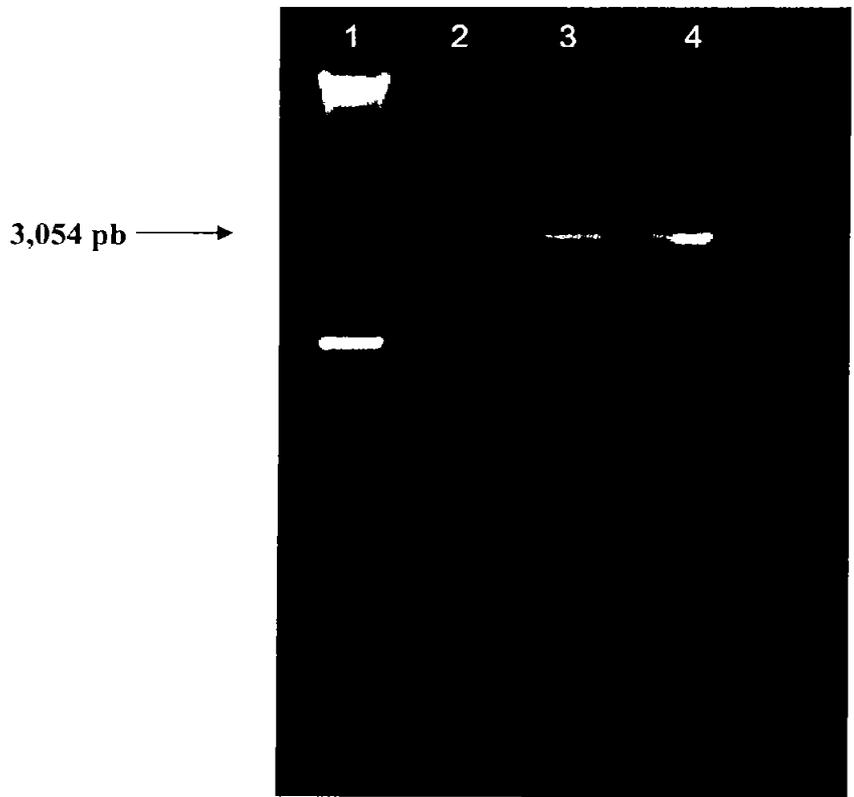


Figura 8.

Fotografía del gel de agarosa con la purificación del amplificado del gen *pm* de *B.bronchiseptica* que se obtuvo mediante la PCR

El ADN se purificó a partir del gel de agarosa mediante la utilización del *Gel extraction kit* de Quiagen®.

En el carril 1 se encuentra el marcador 1 Kb, en los carriles 2, 3 y 4 se muestran las tres eluciones obtenidas a partir de la resina Quiagen para la purificación de ADN a partir de geles de agarosa.

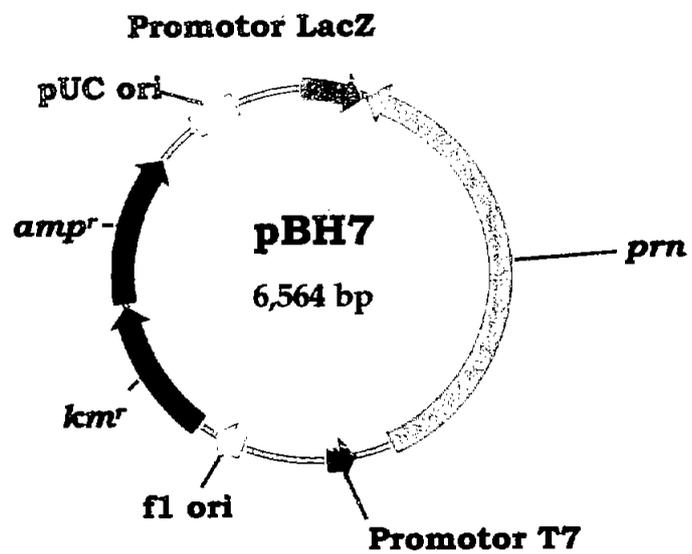


Figura 9

Mapa del pBH7. Se construyó a partir del vector pCR2.1 de Invitrogen®. El inserto con el gen *prn* quedó entre los promotores T7 y LacZ. El plásmido contiene los genes de resistencia a ampicilina (*amp^r*) y kanamicina (*km^r*) así como el origen de replicación del pUC19.

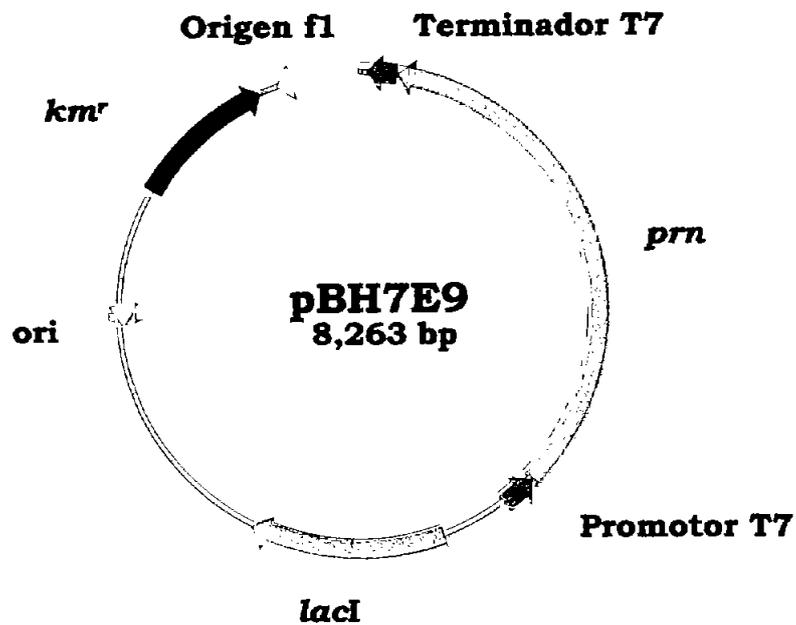


Figura 10:

Mapa del pBH7E9. La construcción de este vector se hizo a partir del plásmido de bajo número de copias pET28a. El inserto quedó entre el promotor T7 y el terminador T7. El plásmido codifica para una cola de polihistidinas para la recuperación de la proteína recombinante. El plásmido contiene el gen de resistencia a kanamicina (*kmr*).

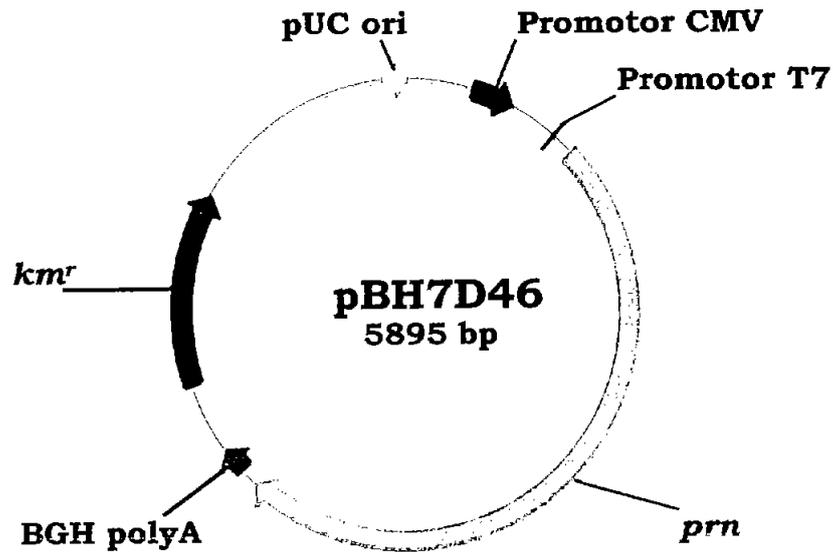


Figura 11

Mapa del pBH7D46. La construcción de este vector se hizo a partir del plásmido pVAX1 de alto número de copias. El inserto con el gen *prn* quedó entre el promotor del citomegalovirus humano (CMV) y el sitio de poliadenilación del gen de la hormona del crecimiento Bovina (BGH PolyA) para la finalización de la síntesis de proteínas. El plásmido cuenta con el promotor T7 el cual es útil para detectar la presencia de la proteína recombinante en un cultivo bacteriano. El plásmido contiene el gen de resistencia a kanamicina (*kmr*) el cual es útil para replicar el plásmido en cultivos bacterianos.

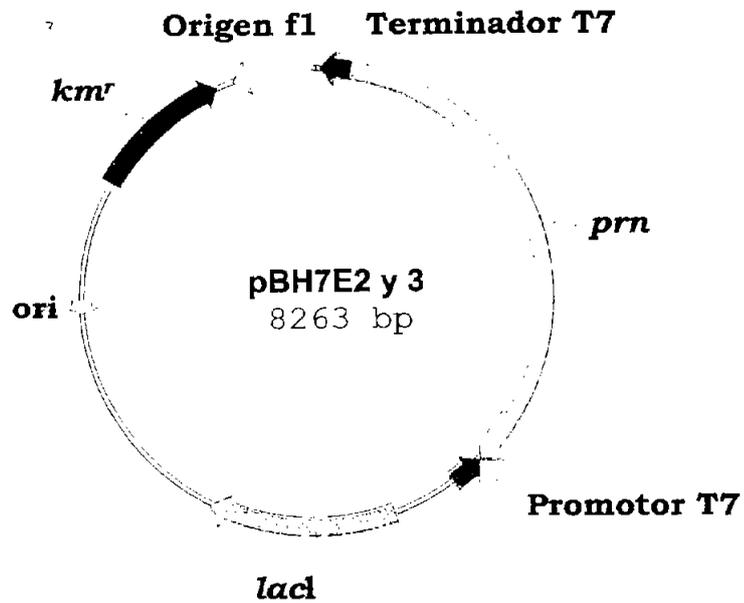
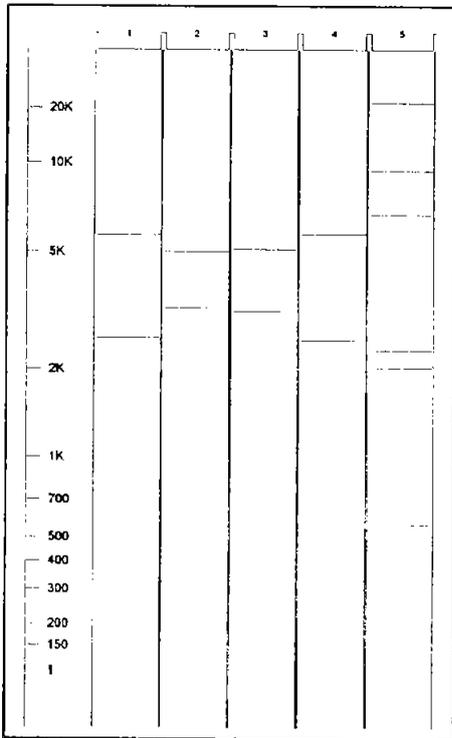


Figura 12

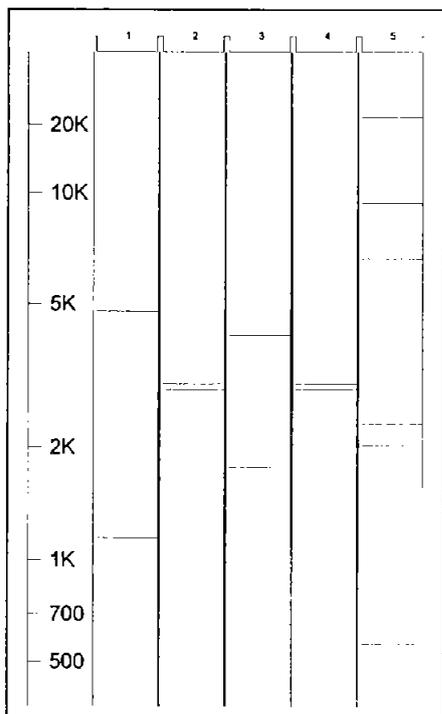
Mapa de los vectores pBH7E2 y 3. Durante el escrutinio en la subclonación del gen *prn* en el pET28a se detectaron dos plásmidos con inserto los cuales presentaron el gen *prn* con el marco abierto de lectura en sentido inverso con relación al promotor T7.



Carril	1	2	3	4	Marcador
Enzima	ClaI	EcoRV	ClaI	EcoRV	HindIII
Lectura	Correcta	Correcta	Inversa	Inversa	
vector identificado	pBH7E9	pBH7E9	pBH7E2 pBH7E3	pBH7E2 pBH7E3	Lambda

Figura 13

Simulación de migración electroforética del análisis de restricción con los plásmidos pBH7E2, pBH7E3 y pBH7E9 y las enzimas *ClaI* y *EcoRV*. En el recuadro superior derecho se muestra la relación del carril con las enzimas a utilizar y la dirección de lectura del plásmido correspondiente. Se utilizó el *software* VectorNT1 para el diseño del análisis de restricción.



Carril	1	2	3	4	Marcador
Enzima	<i>EcoRV</i>	<i>EcoRV</i>	<i>EcoRV</i>	<i>EcoRI</i>	HindIII
Dirección de lectura	Correcta	linearizado	Inversa	Libera fragmento	
Plásmido identificado	pBH7D46	pVAX1	pBH7D??	pBH7D46	Lambda

Figura 14

Simulación de migración electroforética del análisis de restricción con el plásmido pBH7D46 y pVAX con las enzimas *EcoRV* y *EcoRI*. En el recuadro superior derecho se muestra la relación del carril con la enzima a utilizar y la dirección de lectura del plásmido correspondiente.

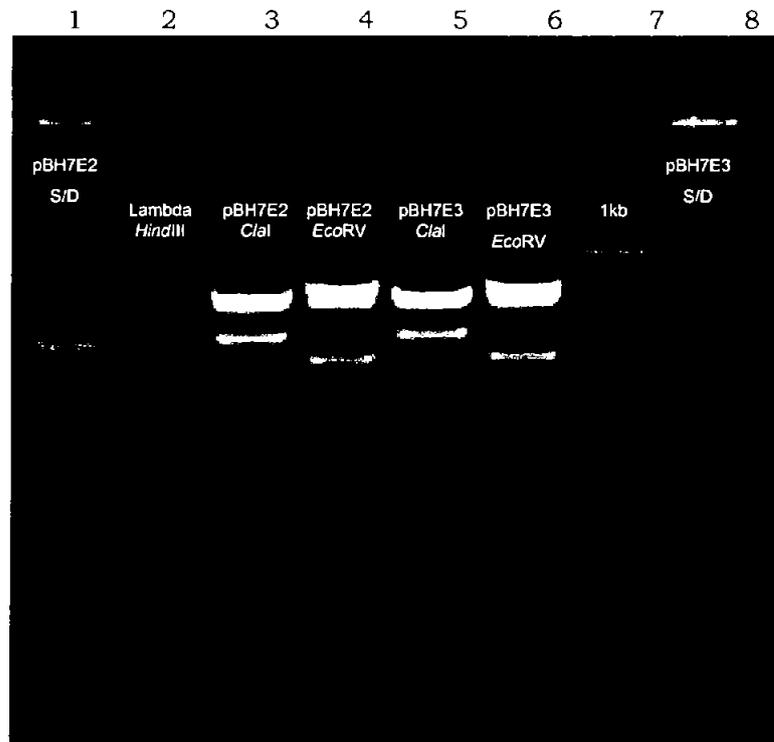


Figura 15

Fotografía del gel de agarosa con el análisis de restricción de los plásmidos pBH7E2 y pBH7E3, los cuales fueron cortados con las enzimas *EcoRV* y *ClaI*. En los carriles 1 y 8 se muestran los plásmidos pBH7E2 y pBH7E3 sin digerir respectivamente, en el 2 se observa el marcador Lambda *HindIII*, en el carril 3 y en el 4 se muestra la digestión del pBH7E2 con *ClaI* y *EcoRV* respectivamente, en los carriles 5 y 6 corresponden a las digestiones del pBH7E3 con las enzimas anteriores, en el carril 7 se muestra el marcador de bases 1Kb. En ambos plásmidos, la liberación de fragmentos por la acción de las enzimas, indica que la dirección de lectura se encuentra en sentido inverso.

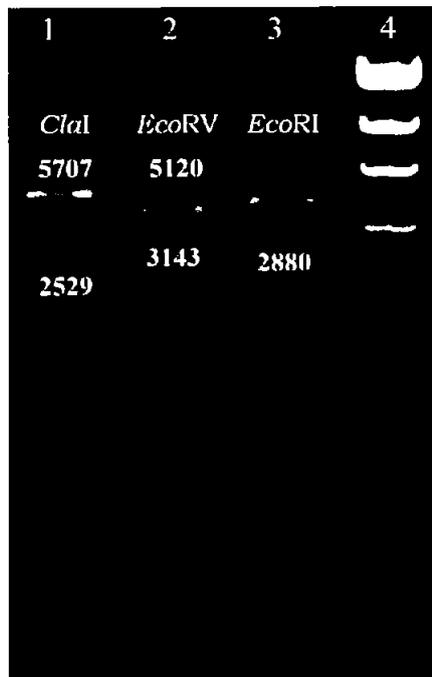


Figura 16

Fotografía del gel de agarosa con el análisis de restricción del plásmido pBH7E9 con las enzimas de restricción *Clal*, *EcoRV* y *EcoRI*. En el carril 1 se observa el pBH7E9 digerido con *Clal* la cual libera un fragmento de 2529 y otro de 5707 pb, la muestra del carril 2 se digirió con *EcoRV* que produce un fragmento de 3143 y 5120 pb y en el carril 3 con *EcoRI* con la que se libera el inserto *pm* de 2880 pb, el cuarto carril corresponde al marcador *Lambda HindIII*. Como se muestra en la simulación, el plásmido presenta una dirección de lectura correcta con relación al promotor T7.

Nota: las bandas extras de los carriles 1 y 3 son del plásmido sin digerir.

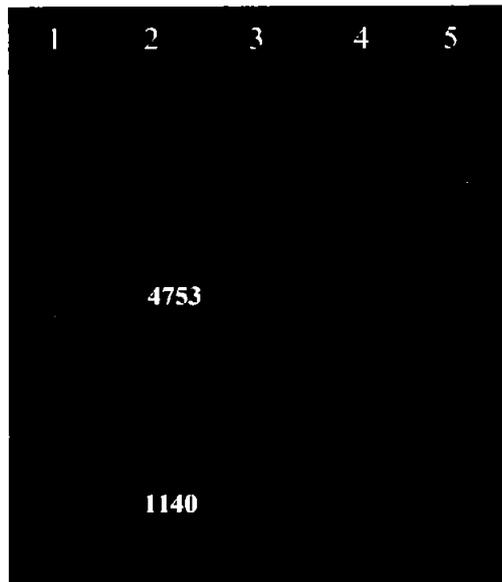


Figura 17

Fotografía del gel de agarosa con el análisis de restricción del plásmido pBH7D46 con las enzimas de restricción *EcoRV* y *EcoRI*. De izquierda a derecha se observa primero el pBH7D46 sin digerir, en el segundo carril, el mismo plásmido digerido con *EcoRV* con la que libera un fragmento de 1140 y otro de 4753 pb, los dos siguientes carriles corresponden al pVAX1 digerido con las enzimas *EcoRV* y *EcoRI*, las cuales lo linearizaron, el quinto carril corresponde al marcador Lambda HindIII.

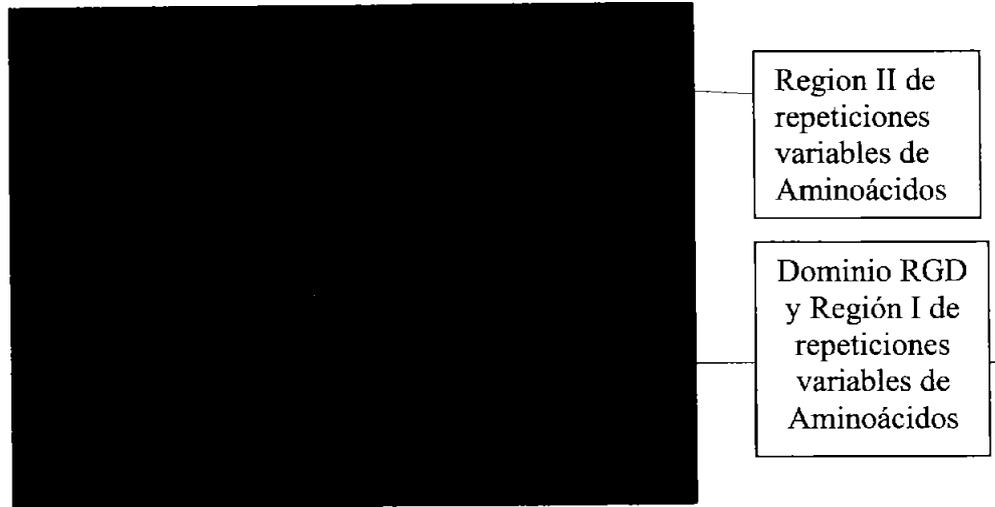


Figura 18

Estructura tridimensional de la pertactina de *B. bronchiseptica* cepa P98 cuya secuencia de nucleótidos fue clonada en el pBH7, pBH7E9 y pBH7D46. Servicio proporcionado por “*Predict Protein structure prediction and sequence analysis*” con la dirección electrónica <http://maple.bioc.columbia.edu/pp/>

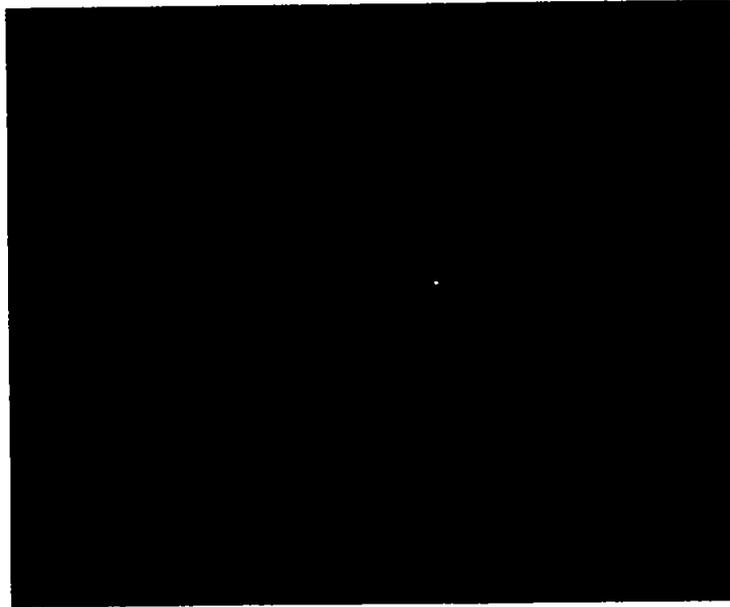


Figura 19.

Empalme del modelo tridimensional de la pertactina de *Bordetella pertussis* con la pertactina de *B. bronchiseptica* P98. Las porciones en color rojo corresponden a la Prn de *Bordetella pertussis*.

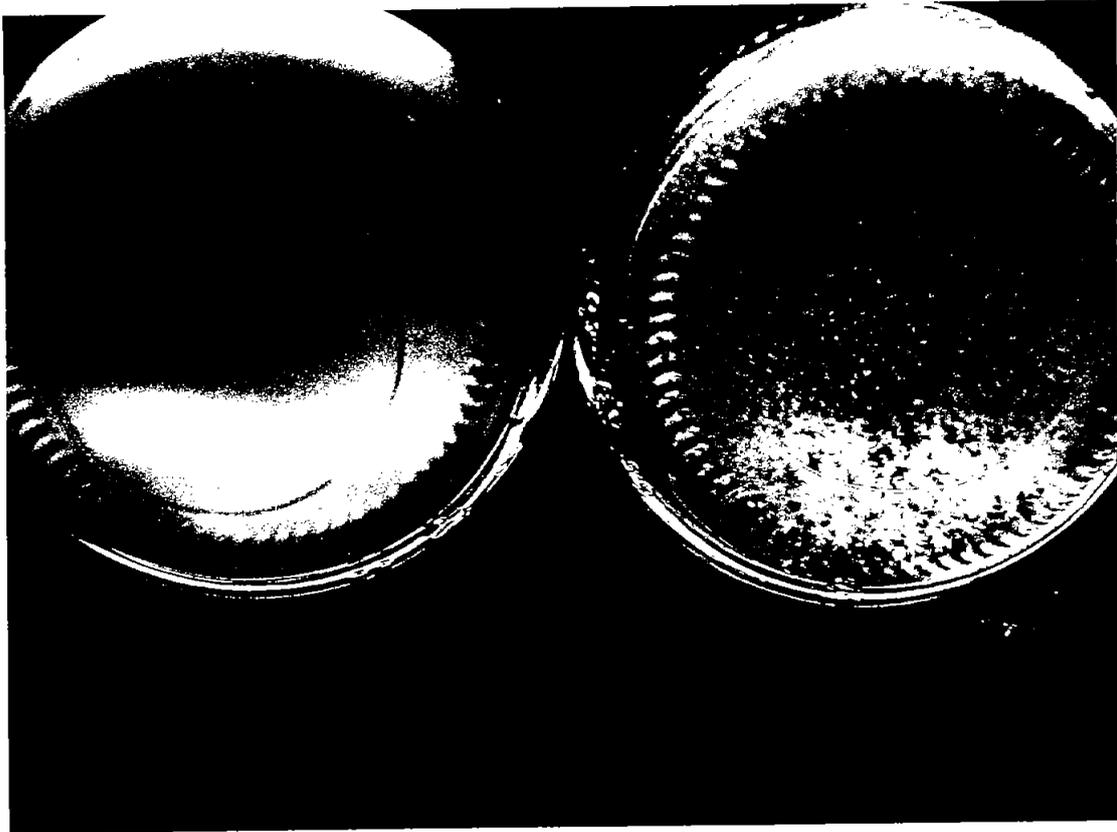


Figura 20

Autoagregación bacteriana de los cultivos de *E. coli* transformada con el pBH7E9 e inducida con IPTG.

Izquierda: Cultivo de *E. coli* transformada con el pBH7E9 sin inducir; Derecha: Mismo cultivo pero inducido con 10 mM de IPTG

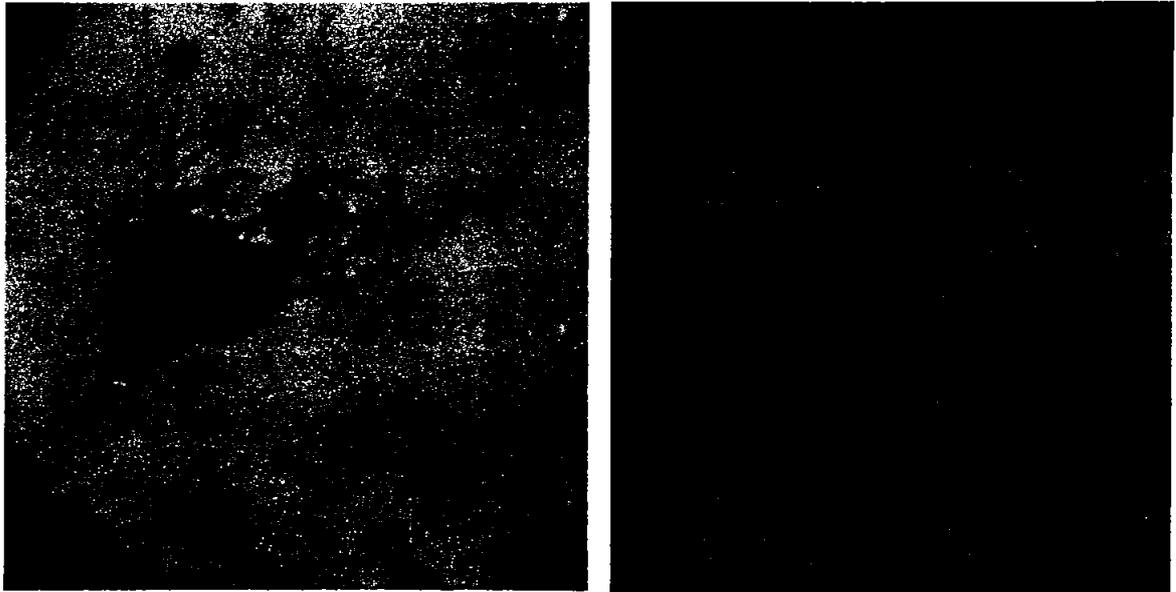


Figura 21.

Micrografías de la autoagregación bacteriana de *E.coli* transformadas con el pBH7E9 inducida con IPTG.

A la izquierda, bacterias inducidas con 10 mM de IPTG, a la derecha, sin inducir.

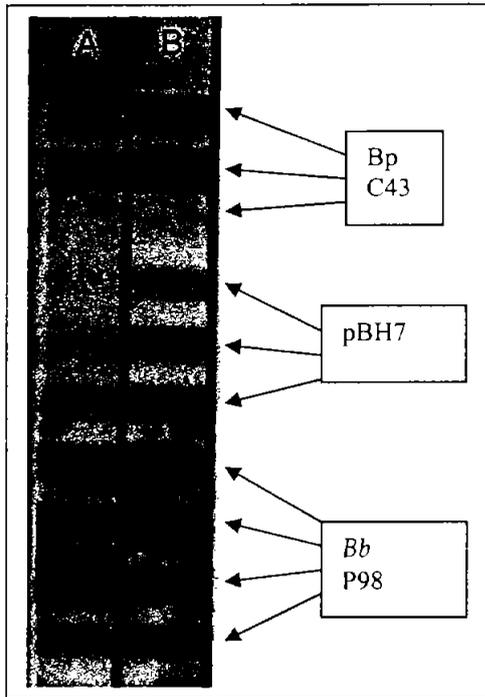


Figura 22:

Inmunoblot con anticuerpos policlonales contra *B. bronchiseptica* y *Bordetella pertussis*. La fotografía muestra la reacción de Inmunoblot con anticuerpos policlonales contra *B. bronchiseptica* en la tira A y contra *Bordetella pertussis* en la tira B de nitrocelulosa. De manera descendente, los tres primeros carriles corresponden a extractos de proteínas de *Bordetella pertussis* cepa C43. Los tres siguientes al extracto obtenido a partir de *E. coli* con el pBH7 y los 4 últimos al extracto de *B. bronchiseptica*. Las diferentes intensidades de las bandas se deben a diluciones de las muestras.

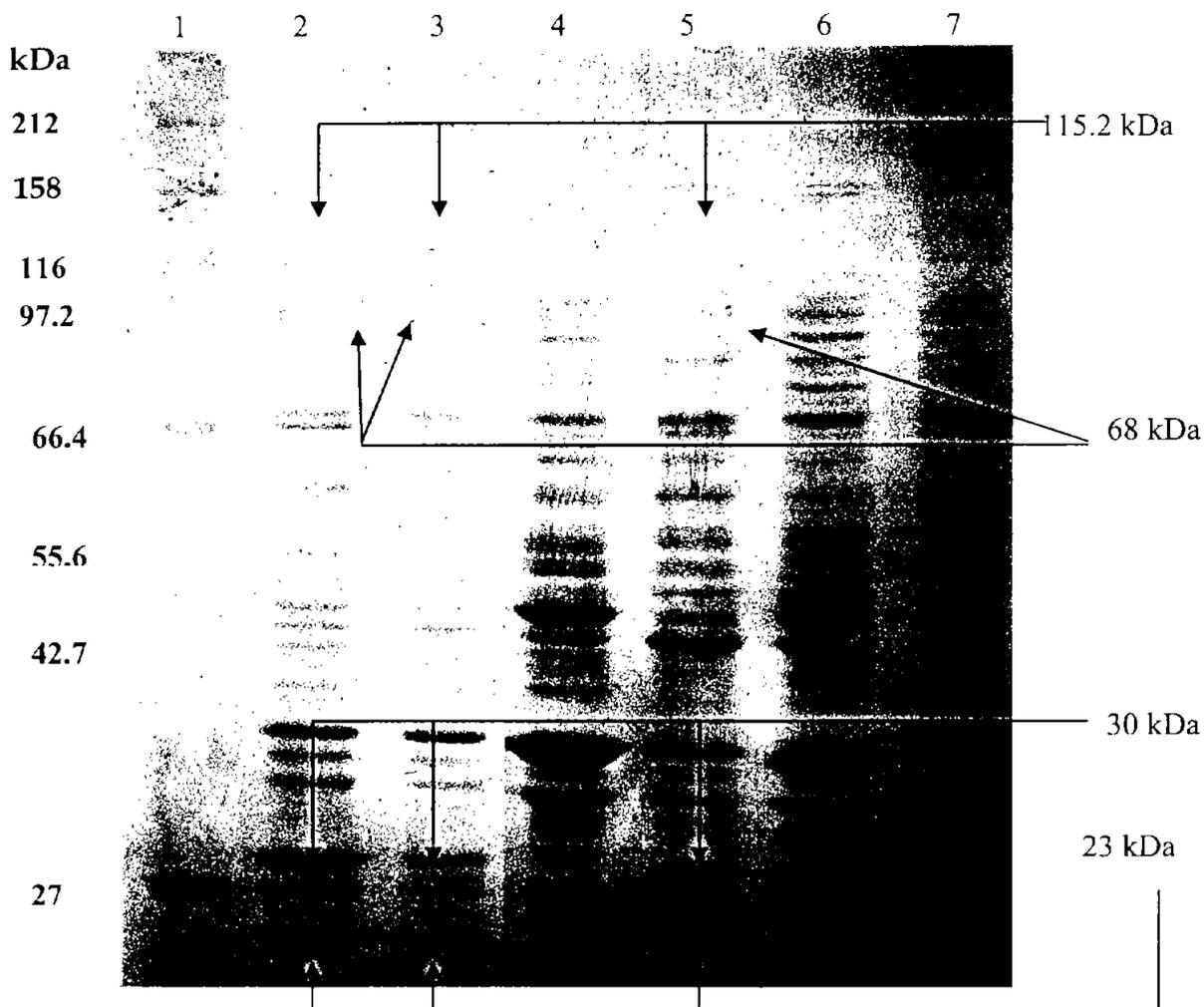


Figura 23.

Polimorfismo electroforético de las diferentes cepas de *E. coli* transformadas con los vectores desarrollados en este trabajo y sin transformar. En el carril 1 se ubica el marcador de peso molecular con sus respectivos valores; en el carril 2 contiene el extracto de proteínas totales de *E. coli* transformada con el pBH7 sin inducir; en el carril 3, la misma cepa pero inducida con 1 mM de IPTG y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de rifampicina; en el carril 4 se muestra la *E. coli* BL21 sin plásmidos; en el carril 5 contiene el extracto de proteínas totales de *E. coli* Rosetta transformada con el pBH7E9 inducida con 10 mM de IPTG y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de rifampicina; en el carril 6 está la *E. coli* Rosetta con el pBH7D46 y en el carril 7 la *E. coli* Rosetta sin plásmidos. Las flechas señalan los pesos moleculares de las bandas de proteína que fueron sintetizadas por la *E. coli* transformada con los plásmidos pBH7, pBH7E9, inducidas con IPTG y rifampicina así como la *E. coli* con el pBH7 sin inducir y que no se observan en las muestras testigo.

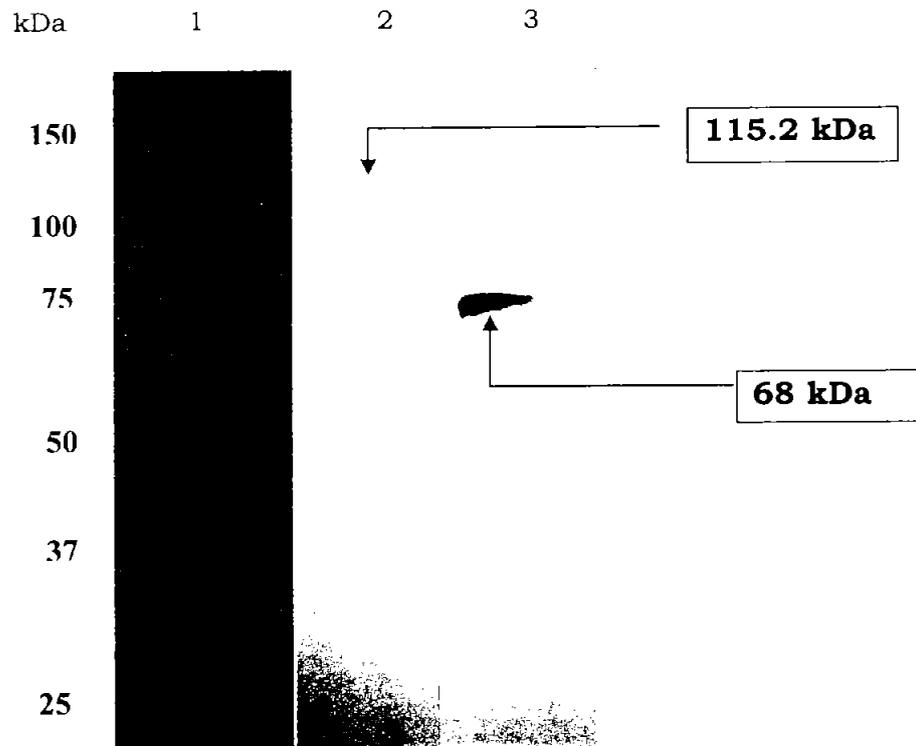


Figura 24.

Detección de la *Prn* recombinante en los cultivos de *E. coli* transformada con el pBH7 y el pBH7E9, mediante una reacción tipo Western blot con suero de ratón contra *B. bronchiseptica* y conjugado anti IgG de ratón.

En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular y sus respectivos valores, En el carril 2 se presenta la reacción con el extracto de proteínas de la *E. coli* transformada con el pBH7; en el carril 3 se encuentra la reacción con el sobrenadante de *E. coli* Rosetta transformada con el pBH7E9 y precipitado con ácido tricloroacético

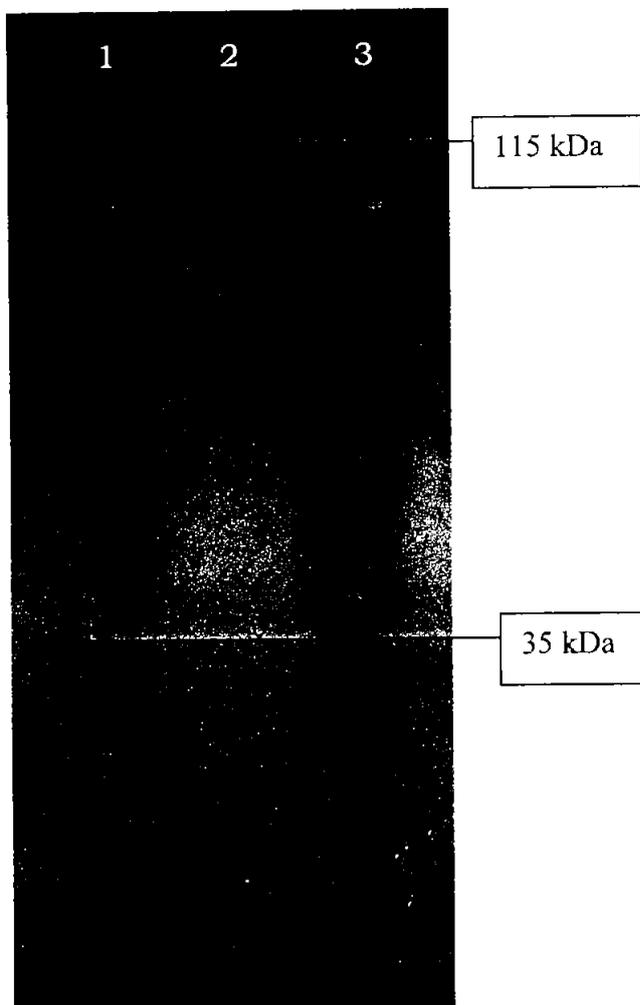


Figura 25

Gel de poliacrilamida al 12.5% con SDS.

En los carriles 1 y 3 se muestran las proteínas obtenidas a partir de los cultivos con células HeLa transfectados con el pBH7D46 mezclado con Carbopol 934 al 1%. Se identificaron 2 bandas de proteína, una de 115 kDa y otra de 35 kDa, las cuales reaccionaron con un suero policlonal contra *B. bronchiseptica* en la prueba de inmunotransferencia tipo *Western blot* (Figura 26). El carril 2 muestra el extracto de proteínas del cultivo testigo negativo.

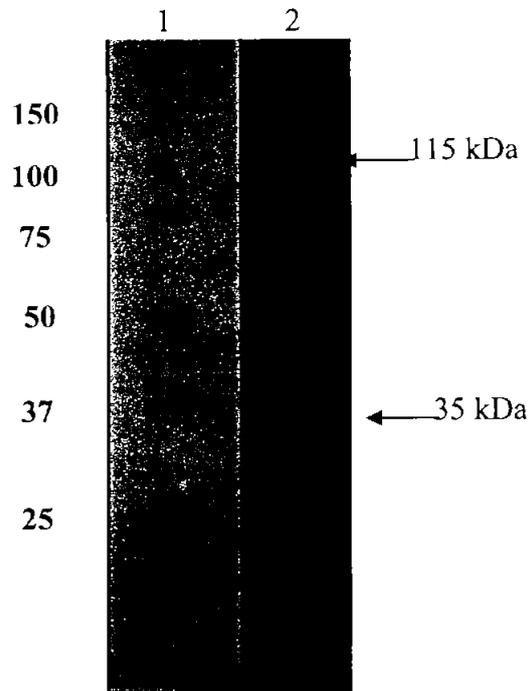


Figura 26

Reacción tipo Western blot con el sobrenadante del cultivo de células HeLa transfectados con el pBH7D46 y que reaccionaron con un antisuero de ratón contra *B. bronchiseptica* y conjugado anti Ig's de ratón.

En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular y sus respectivos valores, En el carril 2 se presenta la reacción con el extracto de proteínas del cultivo de células HeLa transfectado con el pBH7D46 con carbopol al 1%

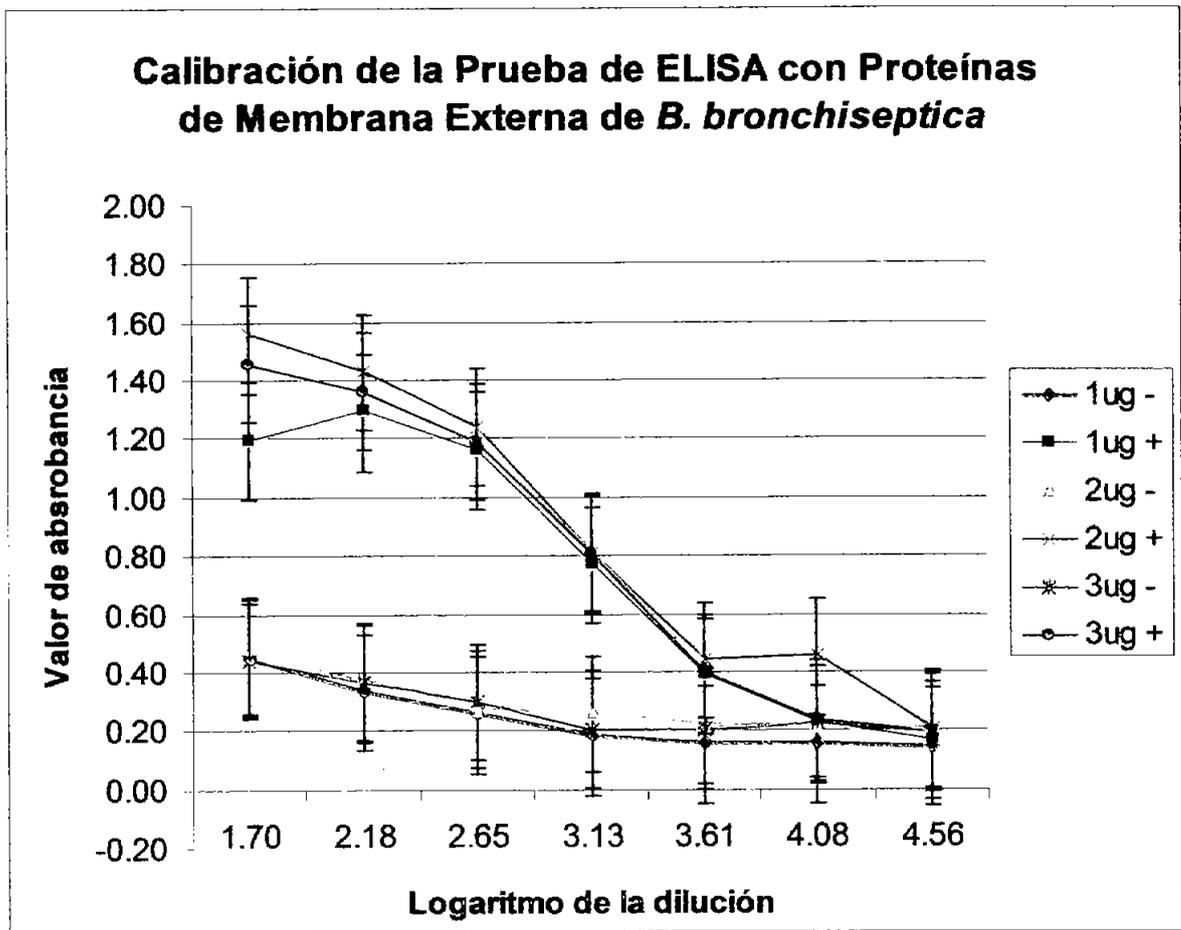


Figura 27.

Comparación de los valores de absorbancia de sueros policlonales anti-*B. bronchiseptica* contra sueros negativos a la misma bacteria, en diluciones desde 1/50 (1.70) hasta 1/36,450 (4.56) los cuales fueron enfrentados con proteínas de membrana externa de *B. bronchiseptica* como antígeno, en concentraciones desde 1 µg por pozo hasta 3 µg.

N=16, n sueros positivos =8; n sueros negativos=8

Calibración de la Prueba de ELISA con Proteínas Totales de *B. bronchiseptica*

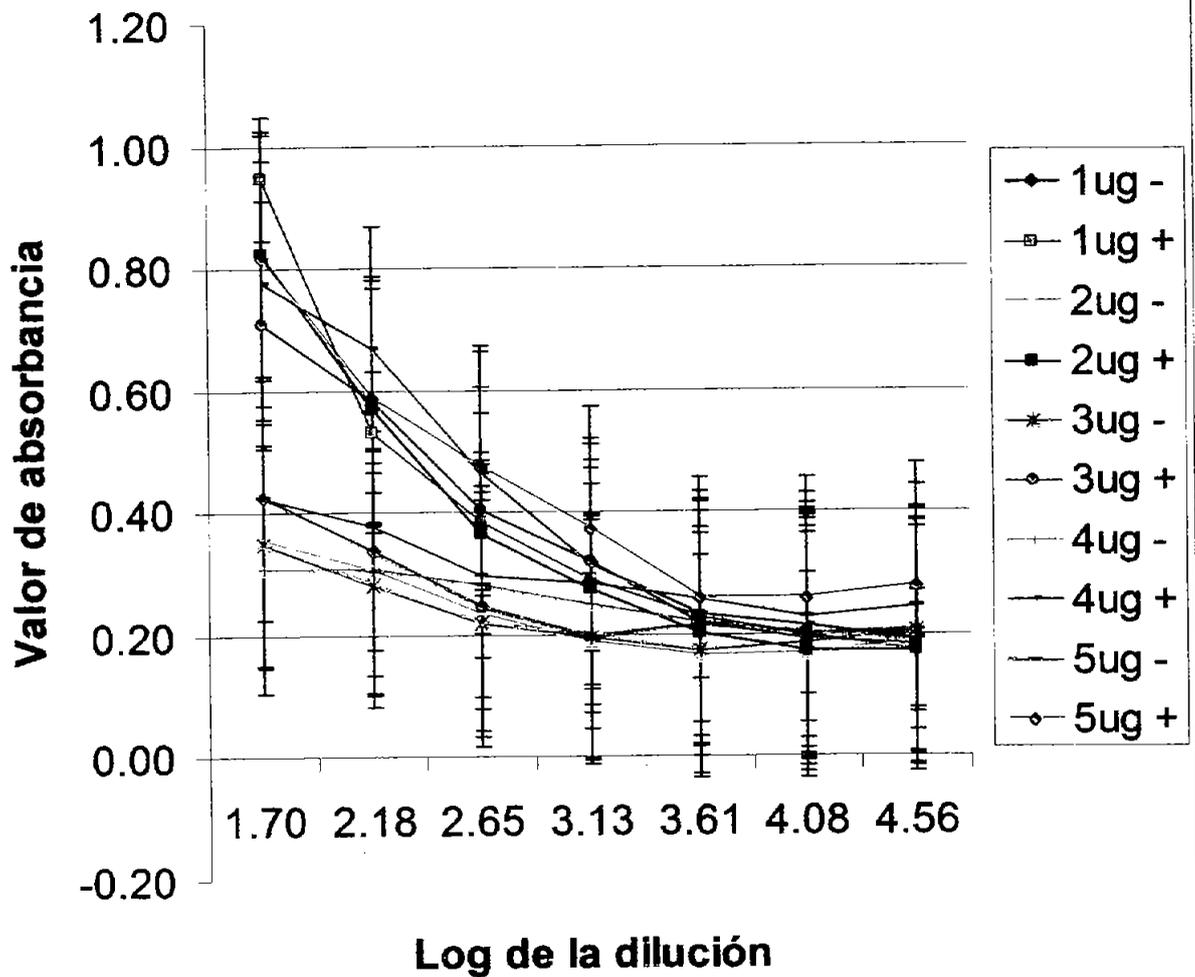
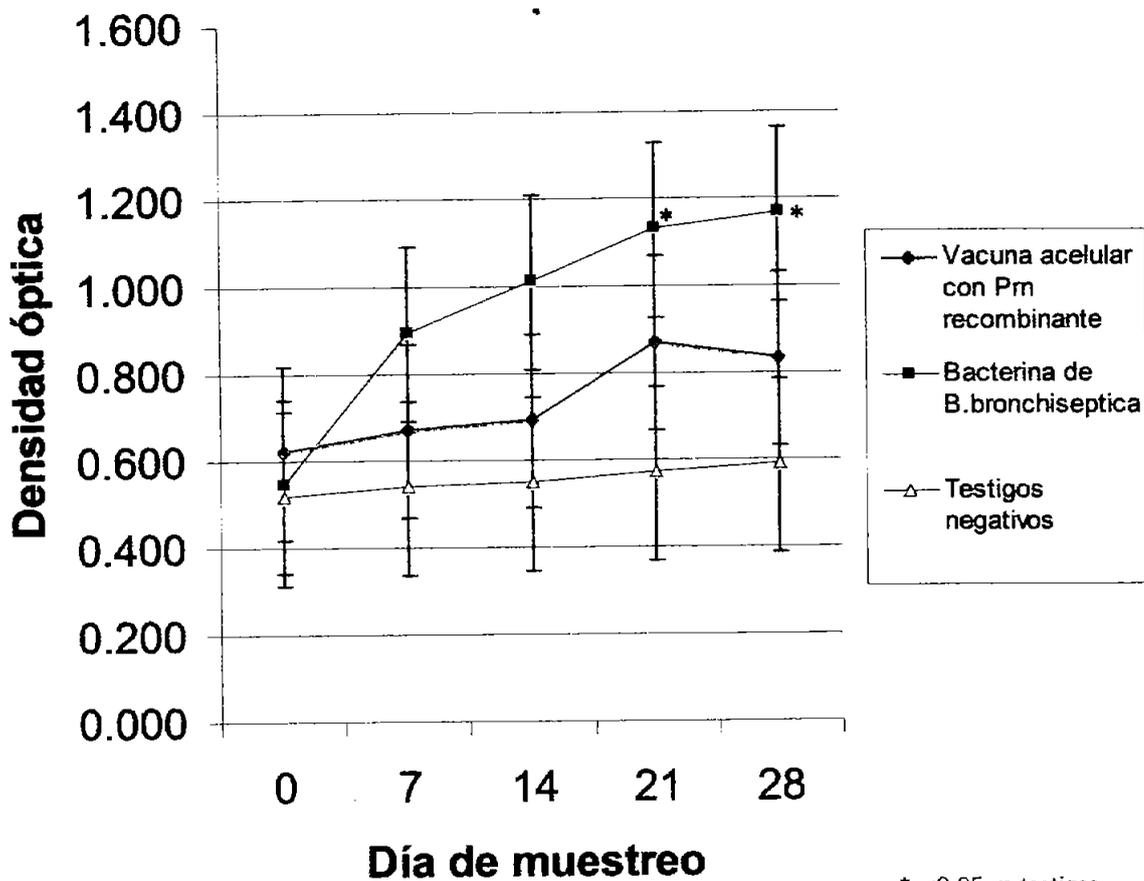


Figura 28.

Comparación de los valores de absorbancia de sueros contra *B. bronchiseptica* contra sueros negativos contra la misma bacteria, en diluciones desde 1/50 (1.70) hasta, 1/36,450 (4.56) los cuales fueron enfrentados con diversas concentraciones de proteínas totales de *B. bronchiseptica* como antígeno (desde 1 µg hasta 5 µg por pozo). Cada serie indica la concentración y suero utilizado (v.gr. 1ug+= 1 µg de proteína por pozo con un suero + contra *B. bronchiseptica*).

N=16, n sueros positivos =8; n sueros negativos=8

Respuesta inmunitaria humoral a la vacunación en ratones



Método de prueba: ELISA.
Ag de captura: PT

* $p < 0.05$ vs testigos negativos

Figura 29

Curva de desarrollo de la respuesta inmunitaria humoral de los ratones vacunados con una bacterina de *B. bronchiseptica* así como con la vacuna acelular con *Pm* recombinante, comparada con ratones inoculados con el vehículo. Se utilizó como antígeno de captura, 2 μ g de proteínas de membrana externa por pozo, asimismo cada suero se trabajó con una dilución de 1/450. Los sueros tuvieron una $n=5$ por cada día de muestreo por grupo de animales. El grupo de ratones inmunizados con la bacterina de *B. bronchiseptica* mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) con relación a los testigos negativos.

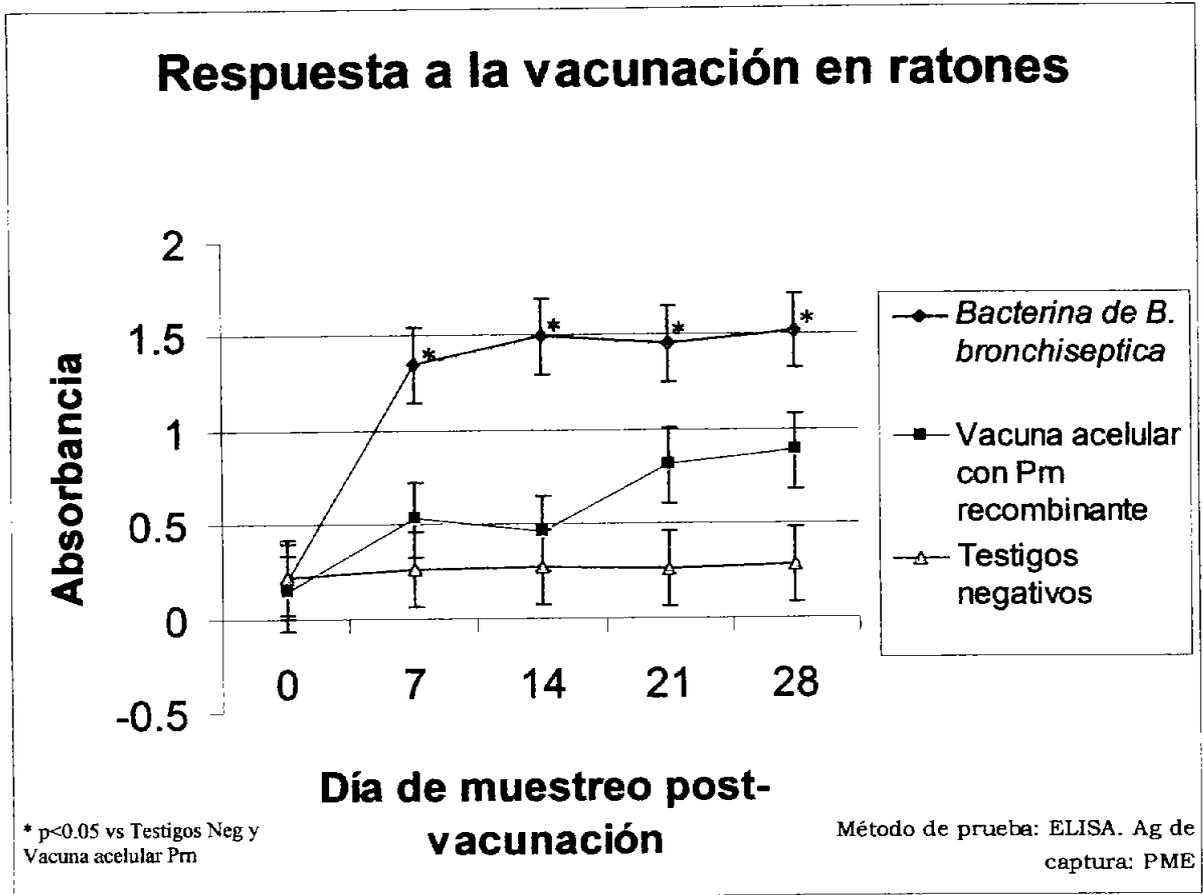


Figura 30.

Cinética de desarrollo de la respuesta inmunitaria humoral contra *B. bronchiseptica* de los ratones vacunados con una bacterina de *B. bronchiseptica* y comparados con los animales inmunizados con el extracto de proteínas de *E. coli* transformada con el pBH7E9. Se tomó una muestra basal antes de la inmunización (día 0) y posteriormente se hicieron muestreos los días 7, 14, 21 y 28. Hubo diferencias significativas a partir del día 7 en los ratones inmunizados con la bacterina de *B. bronchiseptica* contra los vacunados con el inmunógeno acelular y testigos negativos.

Inmunidad humoral contra *Bordetella bronchiseptica* post-desafío en ratones vacunados

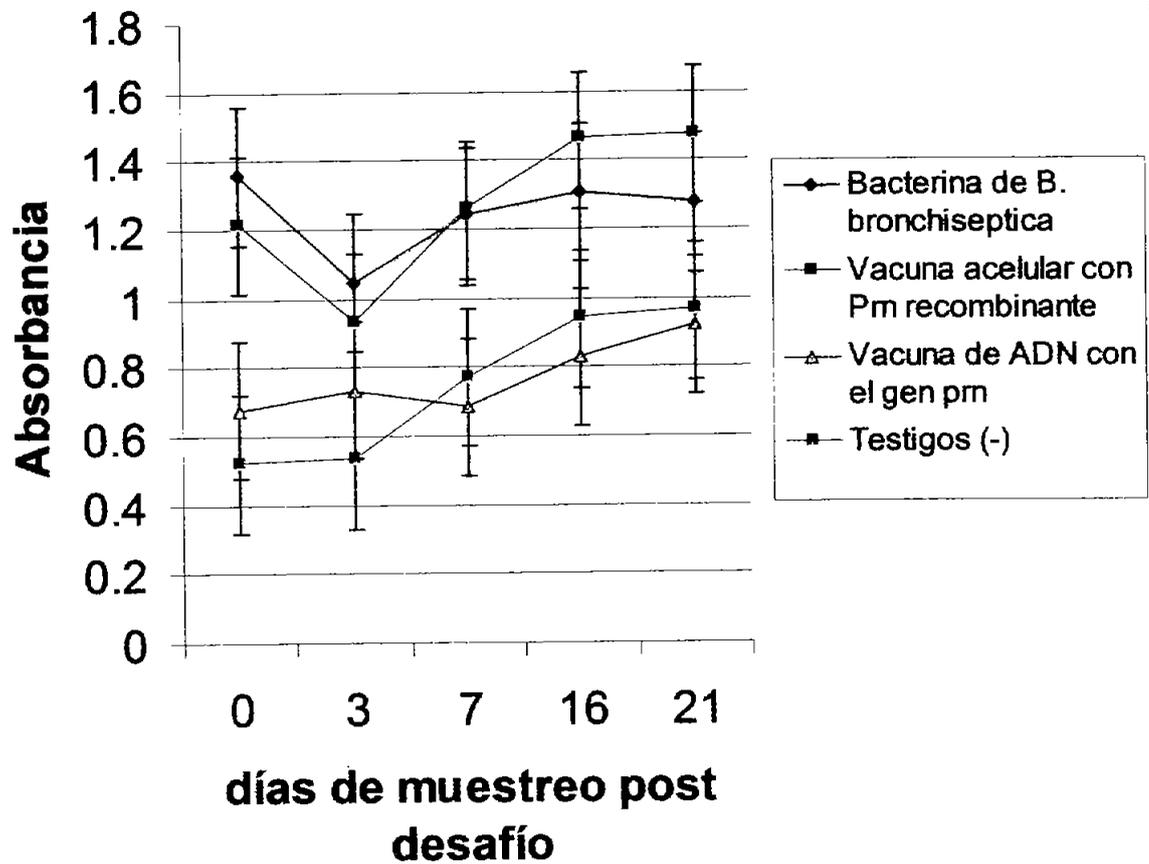


Figura 31

Curvas de respuesta inmunitaria humoral al desafío en ratones vacunados. La evaluación se hizo mediante la técnica de ELISA con 5 μ g de proteínas totales de *B. bronchiseptica* como antígeno. La dilución de trabajo de los sueros fue de 1/450. Se muestrearon tres ratones por cada grupo de animales por día. EL análisis de varianza no mostró diferencias significativas ($p \geq 0.05$)

Inmunidad humoral contra *Bordetella bronchiseptica* post-desafío en ratones vacunados

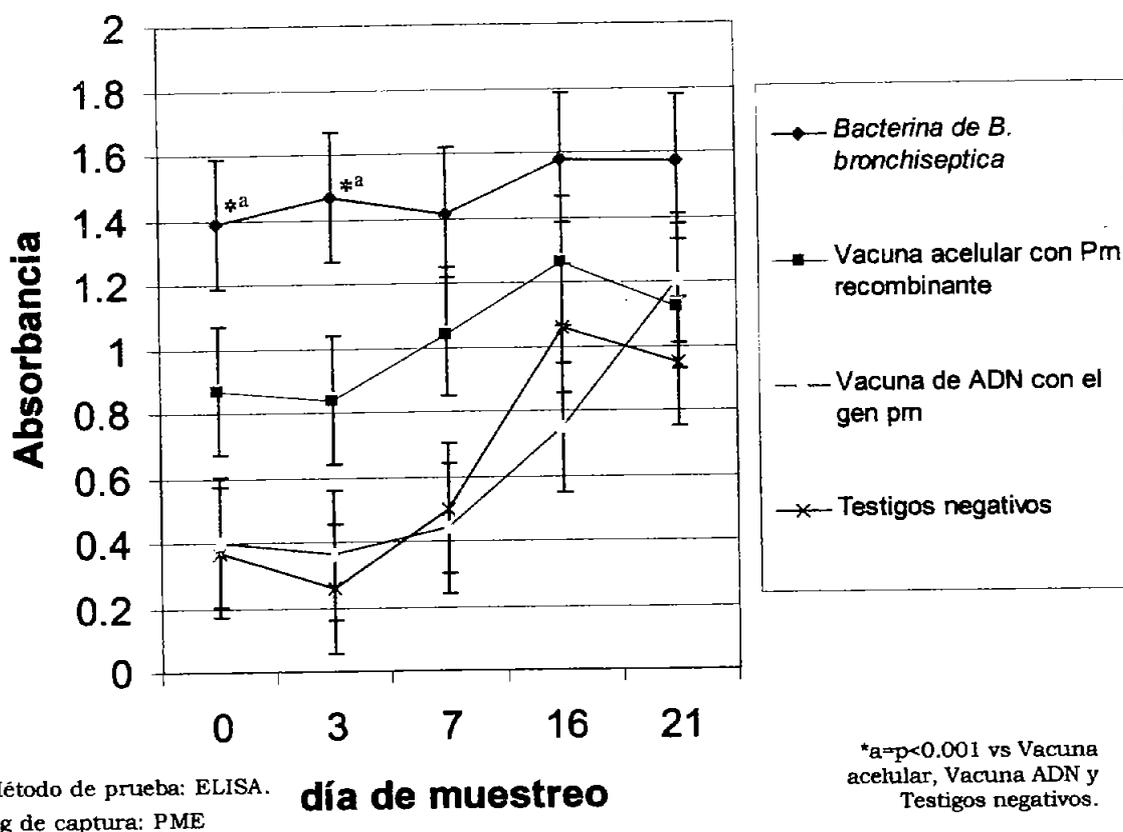


Figura 32.

Cinética de respuesta inmunitaria durante el desafío de los ratones vacunados con los diferentes inmunógenos elaborados en este trabajo. Los sueros fueron evaluados mediante la técnica de ELISA con 2 μ g de proteínas de membrana externa. La dilución de los sueros para la prueba fue de 1/450. Se utilizaron 3 animales por día por grupo. La valoración se hizo tomando como base los valores de absorbancia de las muestras. Las series de los grupos de animales están divididas de acuerdo al inmunógeno empleado.

Cuantificación de las unidades formadoras de colonias en pulmones de ratones vacunados y desafiados

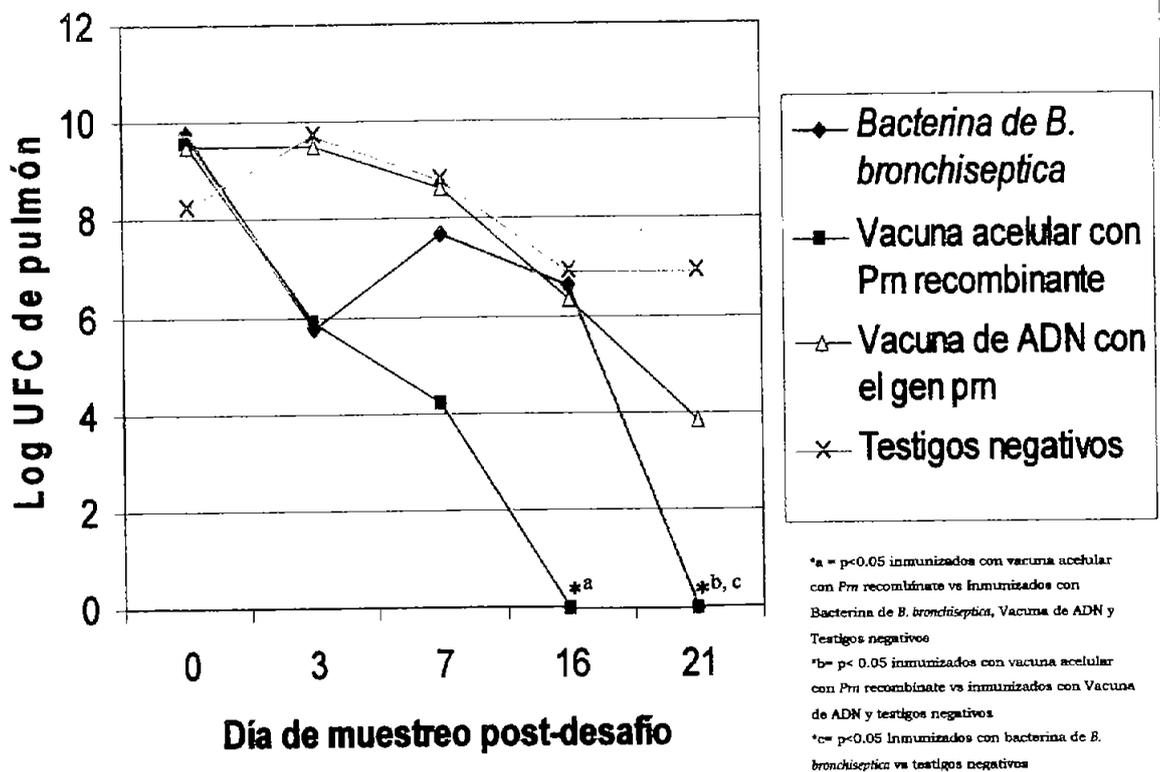
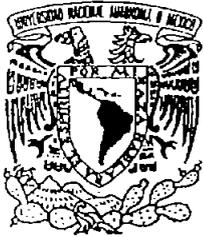


Figura 33.

Logaritmos de los números de unidades formadoras de colonia (UFC) recuperadas de los pulmones de los ratones vacunados y desafiados. Cada uno de los puntos de las curvas corresponde al día de muestreo post-desafío. Se trabajó con una n=3 por cada uno de los lotes por cada día de muestreo. Las series identifican el tipo de inmunógeno empleado en los animales. El análisis de varianza de Kruskal Wallis mostró diferencias significativas $p < 0.05$ de los ratones inmunizados con la vacuna acelular con *Pm* recombinante con relación a los otros grupos de animales inmunizados y los testigos negativos en las muestras trabajadas el día 16 y 21, mientras que los ratones vacunados con la bacterina de *B. bronchiseptica* mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) hasta el día 21 con relación a los testigos negativos. No hubo diferencias significativas entre los animales vacunados con la vacuna de ADN y los testigos negativos.



REVISTA VETERINARIA MEXICO

SR.(ES) DR.(ES)

FRANCISCO JAVIER BASURTO-ALCÁNTARA

RIGOBERTO HERNÁNDEZ-CASTRO

ANTONIO VERDUGO-RODRÍGUEZ

MARÍA EUGENIA ROSALES

JUAN ANTONIO MONTARÁZ CRESPO

Presente

Estimados Doctores:

Informo a usted que su Artículo intitulado "Clonación, secuenciación y expresión del gene *pri* de pertactina de *Bordetella bronchiseptica* de origen canino", ha sido aceptado en principio para su publicación, en la Revista "Veterinaria-México".

Adjuntamos los comentarios que el Comité Editorial hizo a su artículo, el cual agradeceremos a ustedes se sirvan devolver debidamente corregido con un original y dos copias para una revisión final, en caso de no estar de acuerdo con algún comentario, remitir por escrito el motivo.

Sin otro particular y en espera de la devolución de su artículo lo antes posible, reciban un cordial saludo.

Atentamente

Cd Universitaria, DF. 31 de agosto de 2004

DIRECTOR TÉCNICO DE LA REVISTA

MVZ. RAYMUNDO MARTÍNEZ PEÑA

NOTA: FAVOR DE DEVOLVER SU ARTÍCULO REVISADO POR NOSOTROS.

Enviar diskette de 3 ½ en word p/windows de su estudio ya corregido sin ninguna otra información en el disco y notificar en qué programa están los cuadros, gráficas o figuras que existan en el estudio.

Se informa a los autores que a partir del 2002, esta revista será publicada totalmente en versión bilingüe, (español e inglés) por lo que se deberá enviar todo manuscrito primeramente en español, preparado con base en las Instrucciones a los autores, para ser sometidos a consideración del Comité Editorial. El proceso de revisión será como hasta hoy. Los manuscritos ya aceptados deberán ser traducidos al inglés. Vet. Méx. contará con un equipo profesional para este fin, en el que podrán contactar los autores que así lo deseen, quienes cubrirán el costo de este trabajo. Aquellos que decidan enviar las dos versiones (español-inglés), podrán hacerlo una vez que su artículo haya sido aceptado.

C.c.p. Archivo

RMP*lgmm

Anexo I

Metodologías

*“Algo debe haber hecho mal o no sería tan famoso”
Robert Louis Stevenson.*

Transformación por el sistema de CaCl_2

Preparación de células competentes

1. diluir un cultivo de toda la noche en proporción 1/50 en medio LB (10 ml de cultivo para 500 ml de medio)
2. incubar durante 2 horas en agitación a 37 °C
3. colocar el matraz en hielo (es importante que todo el proceso se realice con hielo)
4. centrifugar las células a 4 °C 10 minutos a 8,000 rpm
5. resuspender en 0.2 volúmenes de CaCl_2 50 mM e incubarlo en hielo al menos 10 minutos (8 ml de CaCl_2 si el volumen total de los tubos de centrifuga es de 40 ml) (colocar 0.4 ml de CaCl_2 1M en 7.6 ml de H_2O). Se puede dejar toda la noche en hielo y aumenta en gran manera la competencia de las células.
6. centrifugar las células a 4 °C 10 minutos a 8,000 rpm
7. resuspender en 1/10 del volumen de CaCl_2 50mM/20% glicerol (con 500 ml de medio se usan 12 tubos de 40 ml a cada tubo se le pone 0.8 ml de la solución) (solución: 7.5 ml H_2O , 0.5 ml CaCl_2 1M, 2 ml de glicerol estéril)
8. Alicuotar fracciones de 0.1 ml o incubar 30 minutos en hielo y usar (Por cada 500 ml de medio original salen 96 tubos con 100 μl de células competentes).
9. Para congelar las células se debe hacer lo más rápido posible. Se debe utilizar hielo seco o nitrógeno líquido, sumergir los tubos y almacenarlas en el ultracongelador a -70 °C.

Transformación

1. Añadir 10 μl de DNA y 50 μl de TT a 0.2 ml de células competentes e incubar en hielo 30 minutos
2. dar un pulso de calor de 2 minutos a 37 °C
3. añadir 1 ml de medio SOC e incubar 1-1:30 hrs. a 37 °C
4. plaquear en cajas de LB con el antibacteriano correspondiente

TT: tris 10 mM pH7.5
 CaCl_2 10 mM
 MgCl_2 10 mM

Extracción de Plásmidos Método midiprep (miniprep)

1. Incubar las bacterias en 40 ml (4 ml) de medio **LB** con el antibiótico correspondiente
2. Centrifugar las bacterias en un tubo de teflón.
3. Resuspender el pellet en 1 ml (100 μl) de buffer **Tris 25 mM, EDTA 25 mM pH8** (2.5 ml Tris 1 M, 0.5 ml EDTA 0.5 M, H_2O mQ estéril cbp 100 ml)
4. Incubar 5 minutos en hielo
5. Agregar 2 ml (200 μl) de una solución fresca de **NaOH 0.2N, SDS 1%** (1.76 ml H_2O , 0.040 ml NaOH 10 N, 0.2 ml SDS 10%) Mezclar bien por inversión vigorosa de los tubos hasta que se vea transparente, homogéneo y muy viscoso. Incubar en hielo 10 minutos
6. Añadir 1.5 ml (150 μl) de **acetato de potasio 3M pH 4.8**. mezclar bien hasta que se pierda la viscosidad y se vea un precipitado blanco. Incubar 15 minutos en hielo.
7. Centrifugar a 7,500 rpm/5 minutos y pasar el sobrenadante a un tubo limpio

8. Añadir 4 ml (400 μ l) de **fenol-cloroformo**, agitar 30 segundos en vórtex y centrifugar 2 minutos a 10,000 rpm.
9. Pasar la fase acuosa a otro tubo y añadir 10 ml (1 ml) de **etanol absoluto frío**. Dejar precipitando 5 minutos a temperatura ambiente
10. Centrifugar 10 minutos en la microfuga, eliminar el sobrenadante y dejar secar el pellet
11. Resuspender el pellet en 200 μ l (20-50 μ l) de **agua mQ estéril**
12. Agregar **RNAasa A**, incubar a 37°C una hora.

Fraccionamiento de membranas

1. centrifugar 1.5-3ml de bacterias cultivadas toda la noche
2. lavar el pellet con 1 ml 10 mM Na₂HPO₄ (pH 7.2); centrifugar 2 minutos en la microfuga a 12,000 rpm
3. resuspender el pellet en 500 μ l del mismo amortiguador, agitar en el vortex
4. sonicar hasta aclarar (9 segundos de sonicado por 9 segundos de descanso durante 1 minuto)
5. centrifugar 2 minutos a 12,000 rpm a temperatura ambiente
6. pasar el sobrenadante a otro tubo centrifugar a 12,000 rpm, 30 minutos a 4 °C. guardar el sobrenadante (lisado soluble)
7. resuspender el pellet en 500 μ l del mismo amortiguador y que contenga 2 % de Tritón X-100
8. Incubar a 37 °C por 30 minutos
9. centrifugar a 12,000 rpm a 4 °C. guardar el sobrenadante (membranas internas)
10. resuspender el pellet en amortiguador, centrifugar 30 minutos a 4 °C. descartar el sobrenadante
11. resuspender el pellet en 50 μ l de PBS (membranas externas)
12. Mezclar 10 μ l con un volumen igual de amortiguador de muestra 2X, hervir 5 minutos en baño María y ver en un gel de poliacrilamida al 12.5%

Solución Stock 1M de Na₂HPO₄ (pH 7.2)

Fosfato de sodio dibásico 14.19 g
Agua bidestilada 60 ml
Aforar a 100 ml con agua bidestilada
Ajustar el pH a 7.2

Extracción de DNA cromosómico con tiocianato de guanidina

1. Cultivar 10-20 ml de bacterias.
2. centrifugar a 400 rpm durante 10 minutos (sólo es para bajar las bacterias sin compactarlas demasiado)
3. Agregar 550 μ l de la solución de lisis: mezclar 5-10 minutos con pipeta sin hacer espuma
4. Agregar 250 μ l de acetato de amonio 7.4 M (se debe guardar a -20 °C). Mezclar moviendo el tubo y colocar en hielo por 10 minutos
5. Adicionar 500 μ l de cloroformo-isoamil-alcohol (24:1 V/V) mezclar en el vortex durante 4-5 minutos
6. centrifugar a 10,000 rpm durante 5 minutos. Recoger el sobrenadante y repetir paso anterior 2 veces más. (se recomienda esto para PCR)

7. tomar el sobrenadante y precipitar con 0.7 volúmenes de isopropanol o 1 ml de etanol absoluto
8. extraer el pellet de DNA con una punta de pipeta¹, colocarlo en otro tubo, agregarle 1 ml de etanol absoluto y centrifugarlo
9. lavar el DNA tres veces con etanol al 70%
10. secar el DNA y resuspender en 50-100 µl de agua destilada estéril.

Solución de lisis

Tiocianato de Guanidina 5M
 EDTA 0.1 M
 Sarkosyl 0.5%(P/V)

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación del gene de pertactina

1. Utilizar DNA de *Bordetella bronchiseptica* obtenido mediante la técnica de Tiocianato de guanidina
2. El gene de pertactina se clonó a partir de un producto de PCR. Los iniciadores utilizados se diseñaron con base en la secuencia reportada por Li (80) fueron: 5'-3' **gatgatgctgcgtgtaaca** y para la porción 3'-5' accggtacagctggtaaag y con estos obtener un producto de 2880 pb.
3. La reacción de PCR se ajustó a un volumen final de 50 µl, de los cuales fueron 5 µl de amortiguador 10X [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, estabilizadores, y 50% (v/v) glicerol], 2.5 µM de MgCl, 200 µM de mezcla de dNTP's, 25 pM de iniciadores, solución *Enhancer* de Invitrogen ® con una concentración final de reacción de 3X (15 µl) y Taq Pfx de Invitrogen ® (2.5 U). Los ciclos del termociclador fueron: uno de desnaturalización previa a 94° C durante 4 minutos y posteriormente 33 ciclos con 94° C 0:45segundos, 52° C 0:45segundos, 72° C 2:45segundos. Uno para la extensión final a 72 °C durante 8 minutos.

Ligazón de plásmidos.

Se utiliza el sistema de ligazón rápida "*LigaFast*" de *Promega*.

Se recomienda iniciar con una proporción de 1:2 vector: inserto de DNA cuando la clonación es en un plásmido.

El cálculo de concentraciones de cada uno de los componentes se hace con la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{No. de Kb del inserto}}{\text{No. de Kb de vector}} \times \text{proporción molar de} \frac{\text{Inserto}}{\text{Vector}} = \text{ng de inserto}$$

¹ En caso de que la cantidad de DNA no sea suficiente para tomarlo con la varilla, se debe centrifugar (12,000 rpm durante 10 minutos, desechar el sobrenadante y lavar el pellet de DNA tres veces con etanol al 70%

Ejemplo:

¿Que cantidad de un inserto de 0.5 kb se requiere para ligarlo a 100 ng de un plásmido de 3kb con una proporción de 1:2 vector:inserto?

$$\frac{100 \text{ ng de vector} \times 0.5 \text{ kb de inserto}}{3 \text{ kb de vector}} \times \frac{2}{1} = 33.3 \text{ ng de inserto}$$

Para esta ligazón se utiliza la siguiente reacción:

1. aplicar la siguiente reacción en tubos para microcentrifuga estériles
 - a. DNA del vector 100 ng
 - b. DNA de inserto 33 ng
 - c. Buffer de ligazón 2X 5 μ l
 - d. T4 DNA ligasa 3 U
 - e. Agua bidestilada cbp 10 μ l
2. incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos para terminaciones cohesivas o 15 minutos para terminaciones romas

Preparación de plásmidos para la producción de vacunas de DNA por cromatografía de intercambio iónico para inyección intramuscular

Reactivos:

Columnas Quiagen de intercambio iónico

1X PBS: estéril y libre de endotoxinas.

100X TE: estéril y libre de endotoxinas

Comentarios generales:

- Usar medio LB y no "*Terrific Broth*";
- Usar la cepa de bacterias recomendadas para el plásmido (ejemplo: DH5 α)
- No sobrecargar la columna. Preparar el volumen de medio de cultivo indicado para el tamaño de la columna. En caso de requerir una mayor cantidad de plásmido usar megacolumnas
- Usar las soluciones amortiguadoras del kit de purificación de plásmidos.

Protocolo

1. El DNA es eluido en una columna Qiagen (El procedimiento es llevado a cabo siguiendo el protocolo y usando los reactivos y amortiguadores proveidos por Qiagen). Después de la precipitación con isopropanol, lavado con etanol y secado, el DNA es resuspendido en TE 1X (Sigma). Es recomendable dejar toda la noche disolviendo el DNA. Si es necesario, se puede disolver rápidamente.

1bis. El DNA obtenido con gradiente de centrifugación con CsCl debe ser dializado extensamente con 1X TE.

2. Agregar NaCl a la solución DNA-TE a una concentración final de 0.1M.

3. Agregar 2 volúmenes de etanol absoluto. Precipitar a -20 °C por 30 minutos y recobrar el pellet por centrifugación.

4. Lavar una vez con etanol al 70% en agua (sin EDTA) y recobrar por centrifugación.

4bis. Si el DNA tiene que ser enviado, envíese como precipitado de etanol o en solución con etanol al 70%.

5. Seque el pellet, y resuspenda en 1X de una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) estéril y libre de endotoxinas (Sigma). Dependiendo del tamaño de la columna Qiagen usada, uno puede estimar la cantidad de DNA que será recobrado. Agregar la cantidad de PBS necesaria para dejar una concentración final de 1.5 a 2 mg/ ml de DNA. En este punto es mejor dejar disolver la solución DNA-PBS toda la noche. Es útil colocar el precipitado seco en un tubo de fondo redondo de 15 ml para incrementar el contacto DNA-PBS. Si es necesario se puede calentar la mezcla a 37 °C para acelerar la disolución.

6. Leer en un espectrofotómetro con una densidad óptica de 260 y 280 nm; la proporción 260/280 deberá ser > 1.7 para una buena preparación de DNA. Diluir el DNA a una concentración de 1 mg/ml (o a la concentración apropiada). Si es necesario, almacene a -20 °C o más frío

7. El DNA está listo para ser inyectado.

Obtención de un extracto crudo de proteínas de *Bordetella bronchiseptica*

1. Elaborar un cultivo de *Bordetella bronchiseptica* en 100 ml caldo BHI durante 23 horas con agitación (200 rpm)
2. se cosechan las bacterias mediante centrifugación a 1500 xg durante 15 minutos
3. el paquete celular se resuspende en 5 ml de solución salina amortiguadora de fosfatos(SSAF) pH 7.2 estéril
4. Las bacterias se lavan una vez con 5 ml SSAF pH 7.2 estéril
5. La suspensión bacteriana se coloca en baño de hielo y se sonicán a 90 hertz, 45 ° de amplitud con pulsos de 1 minuto hasta clarificar.
6. el producto del sonicado se centrifuga a 1500 xg durante 20 minutos.
7. se recupera el sobrenadante y se precipita con 5 volúmenes de acetona fría. Se deja precipitar en refrigeración 5 minutos.
8. el precipitado se resuspende en 1 ml de SSAF estéril, se cuantifican las proteínas con el método de Bradford y se observan las proteínas en un gel al 12.5% de poliacrilamida-SDS para confirmar la presencia de la pertactina y se ajusta la concentración a 10 µg/ml se mantiene en congelación a -20 °C hasta su utilización.

Método de Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) para la cuantificación de anticuerpos contra *Bordetella bronchiseptica*.

1. Preparación del antígeno

Se utilizan como antígenos las proteínas de membrana externa (PME) de *Bordetella bronchiseptica* mediante la técnica modificada de Matsuyama (1) así como un extracto crudo de proteínas de *Bordetella bronchiseptica* descrita por Montaraz (2) con las siguientes metodologías.

2. Desnaturalización parcial de los antígenos

El tratamiento se realizó tanto en las proteínas de membrana externa como en el extracto crudo. Se sigue la metodología descrita por Verdugo (4)

1. una alícuota de 50 μ l se le adicionan 1 μ l de β mercapto-etanol, 10 μ l de SDS al 10% y 39 μ l de una solución con inhibidores de proteasas (SIP)
2. se calienta la mezcla por 5 minutos en baño maría a 96 °C
3. se hacen las diluciones correspondientes con PBS pH7.2 para ajustar la concentración final para fijar las proteínas a las placas

3. Unión del antígeno a la fase sólida

Se utilizaron placas de poliestireno de 96 posos de fondo plano, para lectura colorimétrica. Se hacen diluciones con SSAF pH 7.2 del antígeno desnaturalizado y sin desnaturalizar para ajustar la concentración en 1, 2, 3, 4, y 5 μ g/ml. Se colocan 100 μ l de antígeno según la concentración y se deja incubar a temperatura ambiente durante toda la noche. Al día siguiente se lavan los posos con 250 μ l/poso de SSAF-Tween (10mM pH 7.2, 0.05% de Tween 20). La placa es bloqueada con 100 μ l de albúmina sérica bovina (ASB) al 1% y se deja incubar a temperatura ambiente durante dos horas, posteriormente se lava la placa tres veces con SSAF-Tween. Las placas se tapan con mica autoadherible y se guardan en refrigeración a 4 °C hasta su utilización.

4. Titulación del suero control positivo y normalización de la técnica de ELISA

Se utiliza un suero hiperinmune contra *Bordetella bronchiseptica* como control positivo así como los sueros de los ratones inmunizados con la bacteriana de *Bordetella bronchiseptica* con y sin desafío, mientras que, como control negativo se utilizan sueros de ratones libres de *Bordetella bronchiseptica* así como los inmunizados con PBS.

1. Se hacen diluciones triples seriadas de los sueros, desde 1/50 hasta 1/12150.
2. Cada dilución se coloca sobre los posos previamente sensibilizados y bloqueados.
3. Se cubre la placa con mica autoadhesiva y se deja incubar a 37 °C durante 1 hora.
4. Se hacen tres lavados con 250 μ l de SSAF-Tween por cada poso en un lavador de microplacas.
5. Se agregan 100 μ l de conjugado anti IgG de ratón diluido 1/5000 en cada poso.
6. Se cubre la placa con mica autoadhesiva y se deja incubar a 37 °C durante 1 hora
7. durante la incubación se prepara el sustrato con 5 μ l de H₂O₂ en 120 μ l de H₂O y también se prepara la solución de cromógeno con 1.5 mg de Ácido 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic (ABTS) en 10 ml de solución de citrato (0.2M de Fosfato de sodio, 0.1M ácido cítrico). Se mezclan 10 ml de la solución de cromógeno con 3.8 μ l de la solución de sustrato, la cual se emplea inmediatamente después de prepararse.
8. después de la incubación con el conjugado se lava tres veces la placa con 250 μ l de SSAF-Tween en un lavador de microplacas.
9. Se agregan 100 μ l de la mezcla sustrato-cromógeno en cada poso mediante la utilización de una micropipeta multicanal y se incuba la reacción a temperatura ambiente durante 15, 25 y 35 minutos.
10. se determinó la densidad óptica (DO) con un lector de microplacas a una longitud de onda (λ) de 405 nm para cada uno de los tiempos de incubación
11. las lecturas de la DO se grafican y se calcula el cociente. Se selecciona la dilución de suero donde haya una mayor diferencia entre el control positivo y el negativo

5. Metodología de la prueba de ELISA

Se sigue el procedimiento descrito en el punto anterior pero con las siguientes diferencias.

1. se utiliza una dilución por suero
2. la dilución del suero utilizada será en la que hubo mayor diferencia entre los positivos y los negativos.
3. las evaluaciones de los sueros se hace por duplicado para cada uno de los antígenos utilizados
4. en cada placa debe haber un control positivo y uno negativo

Literatura

- (1) S Matsuyama, K Inokuchi, S Mizushima. Promoter exchange between ompF and ompC, genes for osmoregulated major outer membrane proteins of Escherichia coli K-12. J Bacteriology 1984; 158(3):1041-1047.
- (2) Montaraz J.A, Novotny P, Ivanyi J. Identification of a 68-kilodalton protective protein antigen from Bordetella bronchiseptica. Infect Immun 1985; 47(3):744-751.
- (3) Marion M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 1976; 72:248-254.
- (4) Verdugo-Rodríguez A, Calva E. Denaturing treatment of Salmonella typhi outer membrane protein preparations for improved immunodiagnosis of typhoid fever. Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology 1993; 1(1):113-116.

Immunotransferencia tipo *Western blot*

Esta metodología se aplica después de haber realizado la electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

Las proteínas impresas en el gel serán transferidas a membranas de nylon o nitrocelulosa, según se requiera, mediante el empleo de una cámara de transferencia.

El tiempo de la transferencia varía según el voltaje aplicado el cual puede ser:

- 100 volts durante 1 hora,
- 75 volts durante 2 horas,
- 60 volts durante 3 horas o
- 30 volts durante 16 horas (overnight)

1. Cortar la membrana de nitrocelulosa al tamaño del gel
2. sumergir la membrana de nitrocelulosa en el amortiguador de transferencia durante unos minutos antes de poner en contacto con el gel
- 2'. Sumergir la membrana de nylon en metanol absoluto durante 30 segundos y posteriormente equilibrar la membrana sumergiéndola en la solución amortiguadora de transferencia
3. cortar dos pedazos de papel filtro de un tamaño mayor que el gel pero que no exceda las dimensiones de la cámara de transferencia y sumergirlos varios minutos en el amortiguador de transferencia
4. antes de ensamblar el gel, éste deberá ser lavado dos veces durante 5 minutos c/u, en el amortiguador de transferencia.
5. Ensamblado de la cámara de transferencia:

Tapa transparente

Esponja
Papel filtro
Membrana
Gel
Papel filtro
Esponja
Tapa negra*

*La tapa negra debe quedar del lado del polo negativo en la cámara de transferencia

6. Una vez ensamblada la cámara de transferencia se introduce en el depósito con hielo, se conectan los electrodos y se inicia el proceso.

Detección de las proteínas transferidas mediante reacción con anticuerpos

1. la membrana puede ser trabajada de inmediato o ser conservada a -20° C.
2. bloquear la membrana con la solución TBS-T con 5% de leche descremada durante 20 a 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave sobre un agitador orbital
3. Agregar el anticuerpo primario diluido a la concentración requerida en TBS-T con 5% de leche descremada. Se deja incubar a temperatura ambiente con agitación orbital durante toda la noche o a 37° C durante 2 horas.
4. Lavar la membrana 4 veces (5 minutos cada lavada) con TBS-T con 5% de leche descremada a temperatura ambiente con agitación orbital suave.
5. Agregar el conjugado a la dilución recomendada por el fabricante en TBS-T con 5% de leche descremada. Se deja incubar a 37° C durante 2 horas con agitación orbital suave.
6. Lavar la membrana 4 veces (5 minutos cada lavada) con TBS-T con 5% de leche descremada a temperatura ambiente con agitación orbital suave.
7. Lavar la membrana con TBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. El TBS se desecha.
8. Agregar al recipiente donde está la membrana 100 ml de TBS.
9. en un tubo separado, mezclar 60 mg de 4-1-cloro-naftol con 20 ml de metanol frío. Mezclarlos perfectamente y añadir de inmediato al recipiente que contiene el TBS y la membrana.
10. Añadir al contenedor donde está la membrana, 60 μ l de peróxido de hidrógeno al 30 %, mantener el contenedor con la membrana, en agitación a temperatura ambiente en **oscuridad** hasta que aparezcan las señales de reacción positivas en color morado (de 10 a 30 minutos).
11. Una vez que aparece la reacción, la membrana se lava con agua fría para evitar que disminuya la intensidad de la reacción.
12. Se le toma una fotografía a la membrana y se realiza el análisis de la reacción.

Adsorción de sueros con *E. coli*⁽¹⁾

1. sembrar una colonia de la cepa respectiva en 400 ml de caldo LB.
2. incubar a 37° C durante toda la noche con agitación vigorosa
3. al día siguiente separar el cultivo en dos partes de 200 ml c/u
4. una parte se autoclavea durante 1 hora a 121° C y se deja enfriar a temperatura ambiente.

5. la otra parte del cultivo se le agrega formaldehído a una concentración final de 0.5% y se incuba a 37° C durante 2 horas con agitación vigorosa.
6. ambas suspensiones bacterianas se mezclan y centrifugan a 5000x g durante 10 minutos
7. el pellet se lava con 200 ml de PBS.
8. separar las bacterias lavadas en 8 tubos y centrifugarlas
9. el pellet puede ser almacenado a -20° C durante varios meses.
10. el suero a ser adsorbido se diluye 1:50 en 15 ml de PBS con 1% de albúmina sérica bovina.
11. El pellet es resuspendido en los 15 ml del suero diluido 1:50, se incuba durante 2 horas a 4° C con agitación media.
12. La mezcla suero-bacterias se centrifuga y se repite el proceso con otro pellet de bacterias.
13. Se evalúa la calidad del suero mediante una inmunotransferencia tipo Western blot.

Bibliografía

- (1) Graber A, Zingales B. Alternative method to remove antibacterial antibodies from antisera used for screening of expression libraries. *Biotechniques* 19, 28-30. 1985.
Ref Type: Journal (Full)

Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético

1. agregar un volumen igual de ácido tricloroacético al 20% a la muestra de proteínas.
2. Incubar 30 minutos en hielo
3. Centrifugar en una microfuga a 4° C durante 15 minutos
4. remover el sobrenadante con mucho cuidado
5. marcar con un marcador indeleble el sitio donde se forme el pellet
6. agregar 300 µl de acetona fría
7. colocar en la misma posición el tubo en la centrifuga. Tomar como referencia la marca.
8. centrifugar en la microfuga durante 5 minutos a 4° C.
9. remover el sobrenadante y dejar secar el pellet
10. resuspender la muestra en buffer de carga para geles de poliacrilamida y cargar un gel para visualizar las proteínas.

Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

1. preparar con albúmina sérica bovina (ASB) la curva patrón conforme a la siguiente tabla

Tubo	1	2	3	4	5	6	7
ASB 1 µg/µl	0 µl	2 µl	4 µl	6 µl	8 µl	10 µl	12 µl
PBS pH 7.2	1000 µl	98 µl	96 µl	94 µl	92 µl	90 µl	88 µl
Reactivo de Bradford	0	900 µl					

Leer en un espectrofotómetro a 595 nm y graficar en papel milimétrico la Densidad óptica contra la concentración de albúmina.

2. dependiendo de la concentración esperada de proteínas, realizar diluciones de la muestra para que la lectura quede dentro de los valores de la curva patrón
3. para muestras de proteínas de membrana externa, utilizar 5 µl de muestra, 95 µl de PBS y 900 µl de reactivo de Bradford.

Preparación del reactivo de Bradford:

Disolver en el 50% del volumen final
100 mg de Azul de Coomasie
50 ml de etanol al 95%
100 ml de ácido fosfórico al 85%
Agua bidestilada estéril cbp 1000 ml

Conservar en frascos ámbar¹ en refrigeración

Preparación de la solución base de Albúmina Sérica Bovina (ASB)

Pesar 100 mg de ASB y colocarla en un tubo eppendorff de 1.5 ml
Disolver en 100 ml de PBS estéril
Fraccionar en volúmenes de 1ml y congelar a -20° C

Obtención de proteínas totales de *Bordetella bronchiseptica* mediante precipitación con acetona fría

1. Se sembró la semilla maestra de *Bordetella bronchiseptica* en agar BHI y se dejó en incubación a 37°C durante 24 horas. Al día siguiente se tomaron 5-10 colonias y se sembraron en un tubo con 10 ml de caldo BHI y se incubaron durante toda la noche. Al día siguiente se sembraron 200 µl de cultivo en 50 ml de caldo BHI y se dejó incubar durante 23 horas a 37°C con agitación a 200 rpm.
2. se cosecharon las bacterias mediante centrifugación a 1500 x g (≈4,000 rpm) durante 15 minutos
3. el paquete celular se resuspendió en 5 ml de solución salina amortiguadora de fosfatos(SSAF) pH 7.2 estéril
4. Las bacterias se lavaron una vez con 5 ml SSAF pH 7.2 estéril
5. La suspensión bacteriana se colocó en baño de hielo y se sonicaron a 90 hertz, 45 ° de amplitud con pulsos de 1 minuto hasta clarificar.

¹ El frasco deberá haber sido lavado y esterilizado previamente, ya que cualquier residuo de proteína puede inutilizar al reactivo

6. el producto del sonicado se centrifugó a 1535x g (\approx 4,200 rpm) durante 20 minutos.
7. se recuperó el sobrenadante y se precipitó con 5 volúmenes de acetona fría
8. el precipitado se resuspende en 1 ml de SSAF estéril, se cuantifican las proteínas con el método de Bradford, se observaron las proteínas en un gel de poliacrilamida-SDS para confirmar la presencia de la **Pertactina** y se ajustó la concentración a 10 μ g/ml se mantuvo en congelación a -20 °C hasta su utilización como antígeno para la prueba de ELISA.

Evaluación de los inmunógenos

A. Día 0. Muestreo basal de los animales. Sangrado.

B. Día 0 Inmunización de animales día 0

Grupo	Inmunógeno	volumen	vía
1	Bacterina de <i>B. bronchiseptica</i> + Sulfato de aluminio y potasio	0.5 ml	SC
2	Bacterina de <i>E. coli</i> pBH7 + Sulfato de aluminio y potasio	0.5 ml	SC
3	Lisado de <i>E. coli</i> pBH7 1.5 μ g de proteína + Carbopol	0.1 ml	SC
4	Lisado de <i>E. coli</i> pBH7 3 μ g de proteína + Carbopol	0.1 ml	SC
5	Lisado de <i>E. coli</i> pBH7 5 μ g de proteína + Carbopol	0.1 ml	SC
6	pBH7D46 150 μ g de ADN	0.1 ml	IM
7	pBH7D46 150 μ g de ADN + Carbopol	0.15 ml	IM
8	pVAX1 150 μ g de ADN	0.1 ml	IM
9	Bacterina de <i>E. coli</i> BL21	0.5 ml	SC
10	PBS	0.5 ml	SC
11	Negativo absoluto	-	-

C. Días 0, 3, 5, 7, 9, 11, 13 Pesado de animales

D. Día 14 Muestreo post vacunal. Sangrado.

E. Día 14 Revacunación

Grupo	Inmunógeno	volumen	vía
1	Bacterina de <i>B. bronchiseptica</i> + Sulfato de aluminio y potasio	0.5 ml	SC
2	Bacterina de <i>E. coli</i> pBH7 + Sulfato de aluminio y potasio	0.5 ml	SC
3	Lisado de <i>E. coli</i> pBH7 1.5 μ g de proteína + Carbopol	0.1 ml	SC
4	Lisado de <i>E. coli</i> pBH7 3 μ g de proteína + Carbopol	0.1 ml	SC
5	Lisado de <i>E. coli</i> pBH7 5 μ g de proteína + Carbopol	0.1 ml	SC
6	pBH7D46 150 μ g de ADN	0.1 ml	IM
7	pBH7D46 300 μ g de ADN	0.2 ml	IM
8	pBH7D46 150 μ g de ADN + Carbopol	0.15 ml	IM
9	pVAX1 150 μ g de ADN	0.1 ml	IM
10	Bacterina de <i>E. coli</i> BL21	0.5 ml	SC
11	PBS	0.5 ml	SC
12	Negativo absoluto	-	-

F. Días 15, 17, 19, 21, 23 y 25 Pesado de animales

G. Día 25. Muestra de sangre

H. Día 25 Desafío

I. Día 25 Muestra de pulmón

J. Días 28, 32, 40, 47 Pesado de animales

K. Día 28 muestra de sangre y muestra de pulmón

L. Día 32 muestra de sangre y muestra de pulmón

M. Día 40 muestra de sangre y muestra de pulmón

N. Día 47 muestra de sangre y muestra de pulmón

Preparación de Bacterina

1. Sembrar la semilla maestra de *B. bronchiseptica* en agar BHI (*E. coli* en agar LB con el antibiótico correspondiente)
2. Incubar a 37°C durante 24 horas.
3. Al día siguiente re-sembrar 5-10 colonias en un tubo con 10 ml de caldo BHI y se deja incubar durante toda la noche a 37° C. (*E. coli* en caldo LB con el antibiótico correspondiente)
4. Al día siguiente re-sembrar 2 ml de cultivo en 500 ml de caldo BHI (o LB con antibiótico) y se deja incubar durante 19 horas a 37°C.
5. Las bacterias se cosechan mediante centrifugación a 5000 g/min. durante 15 minutos.
6. Se lavan una vez con SSAF pH 7.2 estéril.
7. Las bacterias fueron resuspendidas en 50 ml de SSAF y se mantuvieron en refrigeración hasta su uso.
8. La suspensión de bacterias se ajusta al tubo número 2 del nefelómetro de McFarland.
9. Se agrega solución de Sulfato de Aluminio y potasio a una concentración final del %.
10. Las bacterias se inactivan con formaldehído a una concentración final de 0.05% y se dejaron en incubación a 37 °C durante 24 horas.
11. Se comprueba la esterilidad de la bacterina al sembrar 100 µl en una placa de agar sangre y se deja incubar durante 3 días.
12. Con el producto terminado y libre de bacterias vivas, se puede inocular en los ratones

Anexo II

Medios de cultivo

*“La improvisación es la verdadera piedra de toque del ingenio”
Jean-Baptiste Poquelin Molière.*

Medio de cultivo Luria Bertani (LB)

Reactivo	1000 ml	500 ml	300 ml	100ml
Bacto triptona	10g	5g	3g	1g
Extracto de levadura	5g	2.5g	1.5g	0.5g
NaCl	5g	2.5g	1.5g	0.5g
1N NaOH	1ml	0.5ml	0.3ml	0.1ml
Bacto agar (en caso necesario)	10 a 15g	5 a 7.5g	3 a 4.5g	1 a 1.5g

Modo de preparación:

Disolver en agua deionizada cada uno de los componentes en el 80% del volumen final. Agitar hasta disolver totalmente todos los componentes y aforar al volumen final con agua deionizada.

Esterilizar en autoclave a 15 lbs. 15 minutos.

Nota: 1 litro de agar LB rinde de 35 a 40 cajas de Petri de 100mm

Medio SOC

950 ml agua deionizada

20 g Bacto triptona

5g Extracto de levadura

0.5g NaCl

20 ml glucosa 1M (disolver 18 g de glucosa en 90 ml agua destilada y después aforar a 100 ml)

Disolver en el agua la Bacto triptona, el Extracto de levadura y el NaCl. Esterilizar en autoclave 20 minutos a 15 libras de presión.

Agregar la glucosa

Filtrar a través de un filtro de 0.22 μ m

Medio SOB

Es igual al medio SOC pero sin la glucosa.

Medio YT 2X

Para preparar un litro

900 ml de agua deionizada

16 g bacto-triptona

10 g extracto de levadura

5 g NaCl

Agitar hasta que se disuelvan los componentes.

Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 5N.

Ajustar el volumen a 1 litro con agua deionizada.

Esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 15 libras de presión

Anexo III

Soluciones y

reactivos

*“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la
energía atómica: la voluntad”
Albert Einstein*

Preparación de geles de poliacrilamida (Laemmli)

Acrilamida/bis Acrilamida (30% T, 2.67% C)

Acrilamida	146.0g
N,N'-Methylene-bis Acrilamida	4.0 g
Agua destilada cbp	500 ml
Filtrar y almacenar a 4 °C.	

1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

Tris Base	54.45g
Agua destilada	150 ml
Ajustar el pH a 8.8 con HCl	
Aforar a	300 ml
Almacenar a 4 °C	

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

Tris base	6.00 g
Agua destilada	60 ml
Ajustar el pH a 6.8 con HCl y aforar a	100 ml

SDS al 10%

Disolver 10 g de SDS en 60 ml de agua destilada, agitar suavemente y aforar a 100 ml

Persulfato de amonio al 10%

Disolver 100 mg de Persulfato de amonio en 1 ml de agua bidestilada. Se pueden preparar 10 ml, hacer alícuotas de 500 µl y guardarlo a -20° C hasta su uso. Nota: adquirir el producto en frascos con la menor cantidad ya que se caduca rápidamente.

Solución amortiguadora de muestra

(Solución Amortiguadora SDS reductor: 62.5 mM Tris-HCl, pH6.8, 20% glicerol, 2% SDS, 5% β-Mercaptoethanol)

Agua destilada	3.0 ml
0.5 M tris-HCl, pH 6.8	1.0 ml
Glicerol	1.6 ml
10% SDS	1.6 ml
β-Mercaptoethanol	0.4 ml
0.5% azul de bromofenol en agua	0.4 ml
Diluir la muestra en proporción 1:4 con la solución amortiguadora de muestra. Calentar a 95 °C durante 4 minutos	

5X Solución amortiguadora para electrodos (Tanque)

Tris base	45.0 g
Glicina	216 g
SDS	15.0 g
Agua destilada cbp	3000 ml
Almacenar a 4 °C. Calentar a 37 °C si se precipita. Solución de trabajo: diluir 300 ml en 1.2 litros de agua para una corrida	

Gel de poliacrilamida

	Gel de separación			Gel de empacamiento	
	12.5%	12.5%	7.5%	4.0%	4.0%
Acrilamida/bis Acrilamida (30% T, 2.67% C)	6.0 ml	4.0 ml	2.5 ml	937.5µl	625 µl
Agua destilada	5.025ml	3.35ml	4.85 ml	4.57 ml	3.05ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	3.75ml	2.5 ml	2.5 ml	-	-
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	-	-	-	1.87ml	1.25ml
SDS al 10%	150 µl	100 µl	100 µl	75 µl	50 µl
Persulfato de amonio al 10%	75 µl	50 µl	50 µl	37.5 µl	25 µl
TEMED	7.5 µl	5 µl	5 µl	7.5 µl	5 µl
Volumen total de monómero	15 ml	10 ml	10 ml	7.5 ml	5 ml

Preparar los geles mediante la mezcla de los componentes excepto el persulfato de amonio y el TEMED. Desgasificar al vacío y agregar los dos catalizadores

Mayores concentraciones de TEMED favorecen una polimerización más rápida. Lo cual llega a evitar la acción inhibitoria del oxígeno atmosférico asociado al peine

Teñido de geles con azul de Coomassie

Solución teñidora

Metanol Absoluto	500 ml	200 ml	100 ml
Ácido Acético	100 ml	40 ml	20 ml
Agua bidestilada	500 ml	200 ml	100 ml
Azul de Coomassie	0.55 g	0.22 g	0.11 g

Método 1:

Dejar el gel sumergido en la solución teñidora toda la noche

Método 2

Sumergir el gel en la solución teñidora y calentar en el microondas a máxima potencia. Dar varios pulsos de 10 segundos hasta que hierva la solución.

Desteñido de geles de poliacrilamida

Solución desteñidora

Metanol Absoluto	40%
Ácido Acético	10%
Agua	60%

Quitar la solución teñidora y agregar la solución desteñidora hasta cubrir el gel y colocar en agitación constante. Hacer los cambios necesarios hasta aclarar el gel y que se vean adecuadamente las bandas del marcador de peso molecular.

Conservación de geles de poliacrilamida

Método 1: Colocar el gel sobre papel celofán dulce y cubrirlo con el mismo. Quitar las burbujas de agua y ponerlo entre dos cristales, los cuales se sujetan con pinzas y esperar a que se seque el gel. Para facilitar la colocación del papel celofán y quitar las burbujas se

recomienda mojar el papel con agua bidestilada y mojarse los dedos para facilitar la acción.

Método 2: Igual que el anterior pero se coloca en un solo cristal y el papel se mantiene estirado con cinta adhesiva.

Método 3: Se coloca el gel sobre papel filtro Whatman, se le coloca una capa de papel celofán dulce y se mete a la secadora de geles por vacío a 50 °C durante 45 minutos.

Solución de Acetato de potasio para lisis alcalina

1. Preparar 60 ml de acetato de potasio 5M,
2. agregar 11.5 ml de ácido acético glacial y
3. 28.5 ml de agua bidestilada.

Esta solución tiene 3 M de potasio y 5 M de acetato.

Solución de Acetato de Sodio 4M pH6

En un vaso de precipitado colocar 15 ml de agua mQ, agregar 6.563g de Acetato de sodio. Ajustar el pH a 6 con ácido Acético Glacial.

Aforar a 20 ml con agua mQ.

Nota: se recomienda utilizar una bala magnética para disolver el Acetato de sodio

Solución de IPTG (Isopropylthio- β -D-galactosidasa)

Disolver 2 g de IPTG (PM= 238.3) en 8 ml de agua destilada. Ajustar el volumen final a 10 ml con agua destilada. Esterilizar por filtración con filtros de 0.22 μ m. Hacer alícuotas de 1 ml y conservar en congelación a -20° C.

Solución de X-Gal (5-Bromo-4-Cloro-3-indolyl- β -D-Galactosidasa)

Solución Stock: disolver X-Gal en dimetilformamida para hacer una solución de 20 mg/ml. Se pueden utilizar tubos de cristal o de polipropileno. Hacer alícuotas de 100 μ l en tubos cubiertos con papel aluminio y almacenar a -20°C. No es necesario esterilizar por filtración.

Solución de 0.5M de EDTA (etilenediaminotetraacetato de sodio) (pH8.0)

1. agregar 18.61 g de EDTA en 80 ml de agua bidestilada. Agitar vigorosamente con una bala magnética.
2. ajustar el pH a 8.0 durante la agitación con pellets de NaOH (aprox. 20 g de pellets de NaOH)
3. Esterilizar en autoclave.

Solución 1M de Tris

1. Disolver 121.1 g de tris base en 800 ml de agua bidestilada. Ajuste el pH con HCl según el pH deseado.

pH	HCL
7.4	70 ml
7.6	60 ml
8.0	42 ml

Nota: es importante considerar la temperatura de la solución para hacer el ajuste de pH.

2. Dejar reposar la solución durante la noche y hacer un nuevo ajuste de pH.
3. Ajustar el volumen a 1 litro
4. Alicuotar en frascos con 100 ml y
5. Esterilizar por autoclave

Solución Stock de TAE 50X

60.5 g Tris
14.27 ml de Ácido acético glacial
25 ml de EDTA 0.5M
Agua destilada cbp 250 ml

Solución TAE de trabajo

20 ml de la solución TAE 50X
aforar a 1 litro con agua destilada

Solución de "Paro" para digestiones de ADN con enzimas de restricción

10 mM de Tris-HCl pH7.5
20% de Glicerol
0.1% SDS
0.1% Azul de Bromofenol

Amortiguador de carga para digestiones de ADN bacteriano

38% de Sucrosa (1.9 g)
0.1% de Azul de Bromofenol (5 mg)
67mM de EDTA (0.124 g)
Agua bidestilada 5 ml

Amortiguador de carga con dos colorantes para geles de agarosa

0.25% Azul de Bromofenol
0.25% Xyleno Cianol FF
30% de glicerol en agua

Amortiguador de carga con un colorante 6X para geles de agarosa

0.25% Azul de Bromofenol
40% Sacarosa en Agua

En un tubo Falcón de 15 ml colocar 4 g de Sacarosa, agregar 2.5 ml de Azul de Bromofenol al 1% y aforar a 10 ml con agua destilada

Soluciones Amortiguadoras para la purificación de proteínas recombinantes

Solución de lisis

13.8 g NaH_2PO_4 (100 mM)
1.2 g Tris Base (10 mM)
480.5 g Urea (8 M)
Ajustar el pH a 8 con NaOH.

Solución amortiguadora de lavado

13.8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (100 mM)
1.2 g Tris base (10 mM Tris.Cl)
480.5 g Urea (8M)
Ajustar el pH a 6.3 con HCl

Solución Salina Amortiguadora de Fosfatos 10 mM pH7.2

0.23 g NaH_2PO_4 (anhidro) (1.9 mM) (0.26 g si es monohidratado)
1.15 g Na_2HPO_4 (anhidro) (8.1 mM)
9.0 g NaCl (154 mM)

Agregar 900 ml de H_2O Bidestilada, ajustar el pH a 7.2 con NaOH 1M o HCl 1M
Aforar a 1000 ml, esterilizar y guardar en refrigeración

Solución Amortiguadora de Fosfatos 10X

2.3 g NaH_2PO_4 (anhidro) (19 mM)
11.5 g Na_2HPO_4 (anhidro) (81 mM)

El NaCl se agrega hasta que se tenga una solución 1X y por cada litro se usan 9 g.

Para preparar SSAF-Tween se agregan 0.5 ml por cada litro

Solución Amortiguadora de Citratos 0.05 M, pH 4.0

Solución A: 11.48 g Ácido Cítrico monohidratado
aforar en 500 ml de H_2O bidestilada

Solución B: 14.7 g Citrato sódico tribásico dihidratado
Aforar a 500 ml en H_2O bidestilada

Mezclar 330 ml de Sol. A con 235 ml de Sol. B y aforar a 1000 ml de H_2O bidestilada.

Conservar en refrigeración

Soluciones para Inmunotransferencia tipo Western blot

Solución amortiguadora de transferencia

3.023 g Tris (25 mM)
14.4 g Glycina (192 mM)
200 ml Metanol (20%)
0.037% SDS
pH a 8.3
H₂O cbp 1000 ml.

Colocar en un matraz con 700 ml de agua bidestilada el tris y la glicina. Agitar hasta que se disuelvan completamente las sales, ajustar el pH con NaOH 10 N y aforar a 800 ml. Guardar en refrigeración hasta su uso. Antes de colocar la solución en el tanque para la transferencia, se agregan 200 ml de metanol frío.

Amortiguador salino de tris [*Tris Buffered saline (TBS)*]

100 mM Tris HCl, pH 7.5
0.9% NaCl
Almacenar a 4° C

Amortiguador salino de tris-Tween 20 (TBS-T)

100 mM Tris HCl, pH 7.5
0.9% NaCl
0.05% de Tween 20
Almacenar a 4° C

Solución de revelado

100 ml TBS pH 8.0
20 ml de Metanol helado (-20° C) al cual se le agregan 60 mg de 4-1-cloro naftol
60 µl de peróxido de hidrógeno