



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

CARRERA DE LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE LA GLICOPROTEÍNA
DEL VIRUS RÁBICO EN UN SISTEMA DE CÉLULAS
EUCARIOTAS**

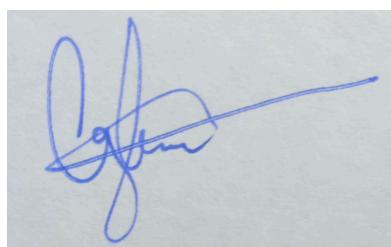
AYLÉN ROCÍO GIORDANO MENDOZA

Directora de Tesis: Dra. María Paula Del Médico Zajac.

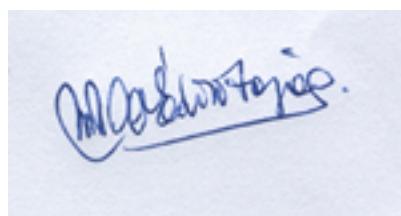
Lugar de trabajo: Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA Castelar.

Marzo, 2024.

FIRMAS



Tesista



Directora

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que hicieron posible la realización de este trabajo de investigación. Sin ellas este camino hubiera sido casi imposible.

A Pau, mi directora, no puedo más que expresar las gracias por haberte conocido. Gracias por tu guía, por tu infinita paciencia y por enseñarme a crecer en el laboratorio. Por lograr cambiar mi opinión (sin darte cuenta jajaja) y hacerme querer continuar dedicándome a la investigación. Por siempre tener la palabra justa y por tu apoyo constante. No puedo iniciar con este trabajo sin decir: a triunfar!

Al Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular de INTA y su personal, especialmente al laboratorio de vacunas vectorizadas por Pox y Adenovirus, por abrirme sus puertas para poder capacitarme en este último tramo de mi carrera. A Gaby, por estar siempre ahí, por ayudarnos cuando aparecían problemas; por tus mates y risas. A Andre por siempre salvarnos y por responder todas nuestras dudas. A Annalies, Alan y Lucho, por siempre estar y ayudarme cuando lo necesité. Qué lindo haber tenido la oportunidad de conocer a tan lindas personas! No puedo olvidarme de Majo, gracias por todo.

Quiero expresar mi agradecimiento a la Comisión de Investigaciones Científicas por otorgarme la Beca de Entrenamiento para Alumnos Universitarios BENTRE23. Esta beca ha sido fundamental al brindarme el apoyo económico necesario para llevar a cabo mi tesis. Estoy profundamente agradecida por esta oportunidad que me han brindado, la cual ha sido de gran ayuda en mi desarrollo académico y profesional.

A Caro y a Juli, las personitas más maravillosas que la facultad pudo haberme regalado. Son más que mis mejores amigas, son mi familia. Las amo chicas. Saben que no soy de muchas palabras, pero quiero darles las gracias por compartir estos años hermosos, por cada risa y cada lágrima que compartimos juntas. Por los chismes, los mates, las cervezas, por nuestras charlas infinitas. Gracias por estar en mis momentos más difíciles, pero sobre todo, gracias por estar ahí en los más felices. Son mágicas. Por fin nos recibimos!!

A mis amigos de toda la vida, Luchu, Agus, Fede, Lea y Gonza.

A Scamp, mi perrito, mi nene.

Sobre todo, quiero agradecer a mis papás. Sin ellos, esta carrera habría sido imposible. Gracias por estar a mi lado en cada paso de este camino. Por pasarme a buscar a la facultad en días lluviosos, aún cuando nos queda más lejos que la Quiaca. Gracias por esos pequeños detalles, por aparecer con un alfajor o chocolate cuando estaba estresada por los parciales. Sus palabras de apoyo y amor han sido mi mayor sostén. Son los mejores padres del mundo y me siento infinitamente agradecida por ser su hija. Agradezco a la vida por haberme dado el regalo de tenerlos. Los amo con todo mi ser.

Millones de gracias a todos!!

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	1
RESUMEN.....	4
ABREVIATURAS.....	8
INTRODUCCIÓN.....	11
1. El concepto de “Una Salud”.....	11
2. La rabia: características y situación mundial.....	11
3. Virus rábico.....	13
3.1 Ciclo de replicación del virus de la rabia.....	15
3.2. Mecanismos de transmisión.....	16
3.3. Patogénesis.....	17
3.4. Inmunidad.....	17
4. Vacunas antirrábicas.....	18
4.1. Detección de anticuerpos inducidos por la vacunación.....	20
5. Glicoproteína del RABV.....	21
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	25
1. Hipótesis del trabajo.....	25
2. Objetivo general.....	25
2.1. Objetivo específico.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
1. Plásmidos.....	27
2. Oligonucleótidos iniciadores o primers.....	28
3. Metodología de ADN recombinante.....	28
3.1. Reacción de amplificación por PCR.....	29
3.2. Electroforesis en geles de agarosa.....	30
3.3. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa.....	30
3.4. Digestión con enzimas de restricción.....	30
3.5. Defosforilación de los extremos 5' fosfato.....	30
3.6. Reacciones de ligación molecular.....	30
3.7. Transformación de bacterias Escherichia coli DH5α.....	31
3.8. Minipreparaciones de ADN plasmídico.....	31
3.9. Preparación de ADN plasmídico de alta calidad.....	32
4. Secuenciación de ADN.....	32
5. Células.....	32
6. Transfección transitoria de células HEK293T.....	32
7. Análisis proteico.....	33
7.1. Precipitación de proteínas con TCA.....	33
7.2. Purificación de proteínas mediante el uso de la resina Ni-NTA.....	34
7.3. Extracción de proteínas en condiciones nativas y desnaturalizantes.....	34
7.4. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.....	34
7.5. Electrotransferencia.....	35
7.6. Detección inmunológica de las proteínas (Western blot).....	35

RESULTADOS.....	37
Amplificación de la secuencia del ectodominio de la glicoproteína del virus rábico.....	37
Clonado de la secuencia del ectodominio en TOPO-TA.....	37
Clonado de la secuencia de RGe en el vector pSecTag2-B.....	38
Análisis de la secuencia del plásmido pSecTag-RG.....	39
Transfección de células HEK293T y expresión de RGe.....	42
Extracción de RGe de la fracción celular.....	45
DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.....	50
1. DISCUSIÓN.....	50
2. CONCLUSIONES.....	54
BIBLIOGRAFÍA.....	56

EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE LA GLICOPROTEÍNA DEL VIRUS RÁBICO EN UN SISTEMA DE CÉLULAS EUCARIOTAS

RESUMEN

La rabia es una enfermedad zoonótica, causada por el virus rágico (RABV) y prevenible por vacunación que debe abordarse desde el concepto de “Una Salud”. Esta enfermedad representa un riesgo mundial para la salud pública por su trascendencia, gravedad e impacto social, ya que conduce inevitablemente a la muerte de las personas expuestas al virus cuando no reciben, de forma oportuna, un tratamiento adecuado.

Para el control de la rabia existen vacunas convencionales basadas en RABV atenuado o inactivado, siendo éstas últimas ampliamente utilizadas en humanos, animales de compañía y de producción. Además, se han desarrollado numerosas vacunas recombinantes diseñadas racionalmente para expresar la glicoproteína del RABV que contiene epítopes reconocidos por las células T CD4+ y CD8+, y es el principal antígeno inductor de anticuerpos seroneutralizantes. Este tipo de vacunas incluyen: vectores virales, plásmidos bacterianos (vacunas génicas) y subunidades proteicas simples o complejas (producidas en el sistema baculovirus-células de insecto, plantas y células de mamíferos). En nuestro laboratorio desarrollamos vacunas antirrábicas basadas en los vectores virales no replicativos en mamíferos como el poxvirus de canario (CNPV), el virus vaccinia Ankara modificado (MVA) y el adenovirus humano tipo 5 ΔE (Ad-5ΔE), que expresan la glicoproteína. La efectividad de una vacuna frente a la infección con RABV está asociada con altos niveles de anticuerpos neutralizantes. Para detectarlos, en nuestro país, solo se realiza el ensayo de seroneutralización *in vivo*, en el cual se utiliza un gran número de animales. Si bien existen ELISA que determinan la presencia y niveles de anticuerpos antirrábicos, éstos son importados, aumentando mucho el costo de las determinaciones. Nuestro grupo de trabajo desarrolló un ELISA *in house* utilizando RABV inactivado y purificado como antígeno, pero observamos gran variabilidad en el rendimiento de las purificaciones de antígeno al utilizar distintos *batchs* de RABV inactivado.

Con el fin de desarrollar un ELISA que permita reemplazar importaciones y que no dependa de la producción de grandes cantidades de virus rágico, nos proponemos expresar la glicoproteína del RABV en células eucariotas y utilizarla como antígeno de tapizado de un ELISA que detecte anticuerpos antirrábicos.

En este contexto, el objetivo de esta Tesis de Licenciatura fue expresar y purificar el ectodominio de la glicoproteína del virus rágico a partir de células eucariotas HEK293T.

Para ello, se seleccionó el vector de expresión eucariota pSecTag2 (pST) que aporta en el extremo N-terminal la secuencia líder de la cadena de Igk murina para la secreción de proteínas y en el extremo C-terminal la secuencia del epítope *c-myc* y seis residuos de histidina en tandem (6xHis) para su detección y purificación. Además, se utilizaron las células HEK293T ya que presentan alta tasa de transfección y son ampliamente utilizadas para la producción de proteínas.

En primer lugar, se amplificó la secuencia del ectodominio de la glicoproteína del RABV (RGe) por PCR utilizando oligonucleótidos específicos, se clonó en el vector TOPO-TA y posteriormente en el vector pSecTag2-B. Se obtuvo el vector pST-RGe y se confirmó su identidad nucleotídica mediante secuenciación.

Posteriormente, se realizaron ensayos de transfección transitoria de células HEK293T y se detectó la proteína RGe utilizando un anticuerpo anti *c-myc* en la fracción intracelular (*pellet*) a las 24, 48 y 72 h post transfección. Basados en el diseño experimental, se esperaba detectar la proteína recombinante en el sobrenadante de las células transfectadas, sin embargo, en las condiciones ensayadas en este trabajo la proteína no se secreta o lo hace en niveles no detectables por las técnicas utilizadas. Finalmente, se determinó que la proteína recombinante puede extraerse del *pellet* en condiciones nativas.

En conclusión, se expresó el ectodominio de la glicoproteína del RABV en la fracción celular de las células HEK293T y se extrajo en condiciones nativas. Dado que el nivel de glicosilación y la estructura de la proteína son fundamentales para el reconocimiento de la misma por los anticuerpos inducidos por la vacunación, consideramos que la RGe obtenida en este trabajo será una herramienta muy útil para desarrollar un ELISA para la detección de anticuerpos antirrábicos.

RECOMBINANT EXPRESSION OF THE RABIES VIRUS GLYCOPROTEIN IN EUKARYOTIC CELL SYSTEM

SUMMARY

The concept of rabies as a zoonotic disease, caused by the rabies virus (RABV), and preventable through vaccination, necessitates an approach grounded in the framework of "One Health." This malady poses a global risk to public health due to its significance, severity, and social impact, invariably leading to the demise of individuals exposed to the virus in the absence of timely and appropriate treatment.

In the field of rabies control, conventional vaccines based on attenuated or inactivated RABV are prevalent, with the latter widely employed in humans, companion animals, and livestock. Furthermore, numerous rationally designed recombinant vaccines have emerged expressing the RABV glycoprotein that contains epitopes recognized by CD4+ and CD8+ T cells, serving as the primary antigen for seroneutralizing antibodies induction. These vaccines encompass various forms, including viral vectors, bacterial plasmids (gene vaccines), and simple or complex protein subunits (produced in baculovirus-insect cell systems, plants, and mammalian cells). In our laboratory, we have developed rabies vaccines based on viral vectors non-replicative in mammals such as canarypox virus (CNPV), modified vaccinia Ankara virus (MVA), and human adenovirus type 5 ΔE (Ad-5ΔE), all expressing the glycoprotein. The efficacy of a vaccine against RABV infection is associated with high levels of neutralizing antibodies. In our country, the detection of these antibodies relies solely on *in vivo* seroneutralization assays, necessitating a large number of animals. Although ELISA assays exist for determining the presence and levels of rabies antibodies, these are imported, significantly increasing the cost of assessments. Our research group has developed an in-house ELISA using inactivated and purified RABV as an antigen; however, we observed considerable variability in antigen purification yields within different RABV batches.

With the aim of developing an ELISA that replace imports and circumvent the need for large-scale rabies virus production, we propose expressing the RABV glycoprotein in eukaryotic cells and utilizing it as an antigen for coating ELISA plates to detect rabies antibodies.

In this context, the aim of this Bachelor's Thesis was to express the ectodomain of rabies virus glycoprotein in HEK293T eukaryotic cells.

To achieve this, we selected the eukaryotic expression vector pSecTag2 (pST), which provides the murine Igk chain leader sequence at the N-terminal end for protein secretion

and a c-myc epitope and six tandem histidine residues (6xHis) at the C-terminal end for detection and purification. Additionally, HEK293T cells were chosen for their high transfection efficiency and widespread use in protein production.

Initially, the ectodomain sequence of the RABV glycoprotein (RGe) was amplified by PCR using specific primers, cloned into the TOPO-TA vector, and subsequently into the pSecTag2-B vector. The sequence identity of the resulting vector, pST-RGe, was confirmed through nucleotide sequencing.

Subsequent transient transfection assays of HEK293T cells revealed RGe protein detection in the intracellular fraction (pellet) at 24, 48, and 72 h post-transfection using an anti-c-myc antibody. According to the experimental design, the recombinant protein was expected to be detected in the supernatant of transfected cells; however, under the conditions tested in this study, the protein either failed to be secreted or did so at levels undetectable by the employed techniques. Finally, it was determined that the recombinant protein could be extracted from the pellet under native conditions.

In conclusion, the ectodomain of the RABV glycoprotein was expressed in the cellular fraction of HEK293T cells and extracted under native conditions. Considering the critical role of glycosylation level and protein structure in antibody recognition induced by vaccination, we anticipate that the RGe obtained in this study will serve as a valuable tool for developing an ELISA for rabies antibody detection.

ABREVIATURAS

Abreviaturas	Significados
°C	Grados centígrados.
6xHis	Etiqueta de seis Histidinas.
Ac	Anticuerpo.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNm	ARN mensajeros.
BCIP	Bromo-cloro-indoil-fosfato
CB	Cracking buffer.
ADNc	ADN copia.
CIP	<i>Calf Intestinal alkaline Phosphatase.</i>
dNTPs	Desoxinucleótidos.
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli.</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.
For	Forward.
h	Horas.
HEK	<i>Human embrionic kidney cells.</i>
his	Histidina.
kDa	Kilo Dalton.
kpb	Kilo pares de bases.
LB	<i>Lysogeny Broth</i> , medio de cultivo utilizado para el crecimiento de bacterias.
M	Molar.
MEM	Medio mínimo esencial.
min	Minutos
mL	Mililitros.
mM	Milimolar.

ABREVIATURAS Y SIGLAS

NBT	Nitro blue tetrazolium
ng	Nanogramo.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
OMSA	Organización Mundial de Sanidad Animal (ex OIE)
nm	nanómetros.
ON	Toda la noche.
pb	Pares de bases.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
pH	Potencial de Hidrogeno.
pST	Vector pSecTag2
RABV	Virus de la rabia.
Rev	Reverse
RGe	Ectodominio de la glicoproteína del virus de la rabia
rpm	Revoluciones por minuto.
SDS	Dodecilsulfato sódico
Seg.	Segundos.
SN	Sobrenadante.
SNC	Sistema Nervioso Central.
TA	Temperatura ambiente.
TAE	Solución amortiguadora formada por Tris-acetato y EDTA.
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano.
U	Unidad de actividad enzimática.
UV	Luz ultravioleta
μg	Microgramo
μL	Microlitro.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. El concepto de “Una Salud”.

El concepto “una salud” fue introducido a comienzos de la década del año 2000, resumiendo una noción conocida desde hace más de un siglo, donde la salud humana y la sanidad animal son interdependientes y están vinculadas a los ecosistemas en los cuales coexisten.

El control de los patógenos zoonóticos (transmisibles del animal al hombre y viceversa) en su origen animal es la solución más eficaz y económica para proteger al hombre. Por consiguiente, la protección de la salud pública debe inscribirse en la elaboración de estrategias mundiales de prevención y control de patógenos, coordinadas en la interfaz animal-hombre-ecosistemas y aplicable a nivel mundial, regional y nacional mediante la implementación de políticas adecuadas (<https://federacionveterinaria.com.ar/una-salud/>).

2. La rabia: características y situación mundial.

La rabia es una zoonosis viral que afecta a todos los mamíferos, sean estos domésticos o salvajes, incluyendo al hombre, y se transmite a través del contacto con la saliva infectada por medio de mordeduras o araños. Esta enfermedad afecta al sistema nervioso y, una vez que aparecen los síntomas clínicos, es mortal en prácticamente todos los casos. La rabia está presente en todos los continentes y afecta a más de 150 países, es una de las enfermedades tropicales desatendidas que afecta principalmente a poblaciones marginadas, pobres y vulnerables (<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/rabies>). En el mundo, la enfermedad es responsable de cerca de 60.000 muertes humanas anualmente y en la gran mayoría de los casos, el perro es la principal fuente de transmisión (<https://www.paho.org/es/temas/rabia>). En África se producen cada año alrededor de 25.000 muertes por rabia, de las cuales el 40 % ocurren en niños menores de 15 años (<https://africacdc.org/news-item/world-rabies-day-2023-campaign-all-for-one-health-for-all/>)

En la rabia se distinguen dos ciclos epidemiológicos diferentes, el ciclo mantenido por mamíferos terrestres (perros, gatos, y algunos carnívoros silvestres como el zorro, el mapache, etc.) y el mantenido por los murciélagos. Aunque el hombre puede adquirir la enfermedad por ambas vías, el primero supone mayor riesgo epidemiológico que el segundo, y en mayor medida cuando afecta a animales domésticos (rabia urbana). La rabia

transmitida por murciélagos no supone un riesgo epidemiológico importante, salvo en ciertas circunstancias como que se manipulen animales afectados o se produzca una mordedura accidental por uno de ellos, hecho altamente infrecuente. En la figura 1 se muestran los reservorios del virus rábico en el mundo.

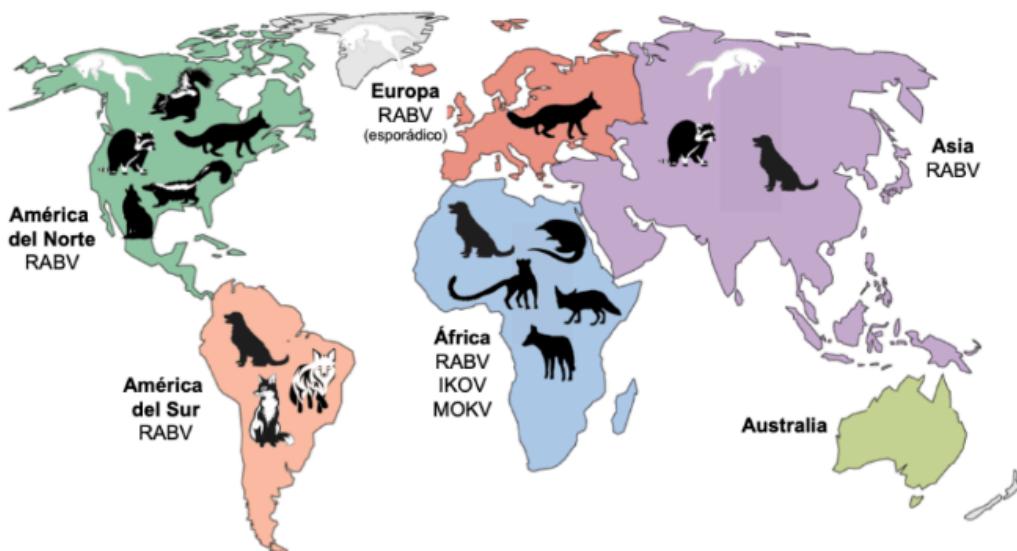


Figura 1: Distribución continental de los reservorios del virus rábico. En América del Norte son el mapache, el zorro gris, el zorro del ártico, el zorrillo, la mofeta y el coyote; en América del sur el perro y dos tipos de zorro; en África el perro, la mangosta, la musaraña, el chacal y el feneco; en Asia el perro, el zorro del ártico y un tipo de mapache. Tomado de Fisher, C. R., et al. (2018) con modificaciones.

El número de casos de rabia humana en América Latina se detalla en la figura 2. Entre 2022 y 2023 se han registrado 17 muertes de personas por rabia ocurridas en México, Venezuela, Haití, Brasil, Perú y Bolivia. Seis de esos fallecimientos fueron por mordeduras de perros y 11 fueron mediadas por el contacto con otras especies (<https://sirvera.panaftosa.org.br/>).

En Argentina, entre los años 2019 y 2023, se reportaron 860 casos de rabia animal en 21 provincias, siendo el 79% de las notificaciones por murciélagos insectívoros, el 19% por animales de producción (bovinos y equinos principalmente), el 1% por gatos y 1% por perros (Ministerio de Salud Argentina, 2024). Si bien no se registran casos de rabia humana transmitida por perros desde 2008, en mayo de 2021 se reportó un caso de rabia humana variante murciélagos transmitida por un gato asilvestrado en la provincia de Buenos Aires (Ministerio de Salud Argentina, 2021). La rabia paresiente es causada por el virus rábico transmitido por el vampiro común (*Desmodus rotundus*) y afecta a bovinos, equinos, otras especies domésticas de producción, animales silvestres y al hombre. Esta forma de la rabia se presenta con síntomas del tipo paralítico (pupilas dilatadas, movimientos anormales en las extremidades posteriores, tendencia a aislarse, lagrimeo, emaciación, temblores musculares, 3 incoordinación, dificultad en la deglución, decúbito y muerte). En Argentina, es

endémica en las regiones del NEA y NOA, y en el norte de las provincias de Santa Fe y Córdoba. Los herbívoros se infectan porque son la principal fuente de alimentación del vampiro y, la mortalidad del ganado puede ser mayor al 50% (Ministerio de Salud Argentina, 2018).

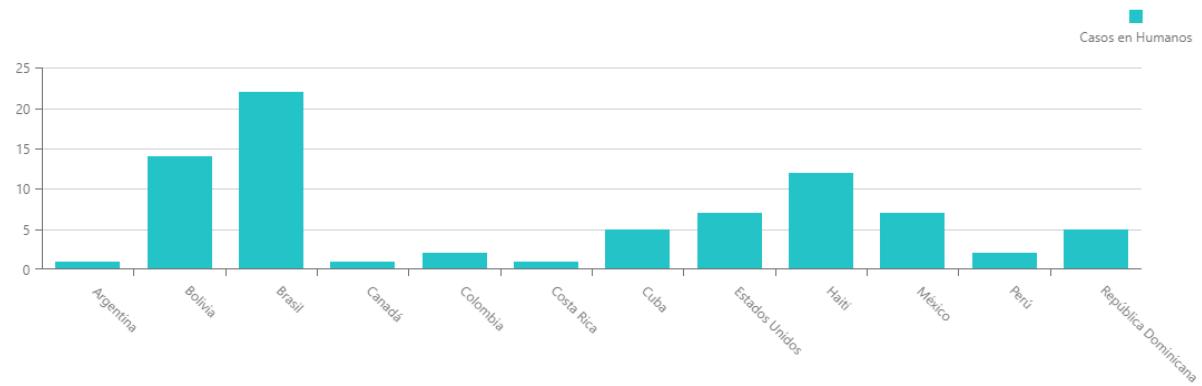


Figura 2: Casos en humanos por país de América en los últimos cinco años (2018-2023). Adaptado de <https://sirvera.panaftosa.org.br/>.

La rabia es una enfermedad prevenible por vacunación y existen vacunas para humanos, animales de compañía, de producción y silvestres. Dado que el 99% de los casos de rabia humana son producidos por mordeduras o rasguños de perros infectados, la mejor estrategia para controlar la rabia en humanos es la vacunación masiva de perros (abordaje “una salud”). Pero también es fundamental la profilaxis pre-exposición (PPRE), es decir, la vacunación de aquellos grupos de personas con alto riesgo de exposición al virus rágico ya sea por motivos laborales o recreacionales. En la Argentina, se implementa un programa de control de la rabia con medidas basadas en campañas de vacunación masiva de perros y gatos, la vacunación intensiva de animales susceptibles ante un brote de la enfermedad, la vigilancia epidemiológica, la educación para la salud, la sanción de legislación específica de control y programas de sensibilización (Ministerio de Salud Argentina, 2024). La vacunación antirrábica en animales de producción no es obligatoria, excepto para algunos emprendimientos ganaderos o actividades recreativas/deportivas dentro del área endémica. Ante la aparición de un brote, se realizan medidas de prevención y control mediante vacunación de animales susceptibles en los establecimientos dentro del área interdictada (establecimiento donde se detectó el brote y los comprendidos en una radio de 10 km) y vigilancia epidemiológica activa (Ministerio de Salud Argentina, 2018).

3. Virus rágico.

El virus rágico es un miembro de la familia Rhabdoviridae, género Lyssavirus, que son virus de ARN cadena sencilla negativa que infecta a las neuronas de los mamíferos. Es

un virus envuelto con forma de bala, tiene una longitud de 180 nm y un ancho de 75 nm. El genoma viral tiene 12.000 pb, es transcripto secuencialmente, desde el extremo 3' terminal, en un ARN líder y cinco ARNm monocistrónicos que codifica para las cinco proteínas constituyentes del virión: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), polimerasa (L), proteína de matriz (M) y glicoproteína (G) (Figura 3).

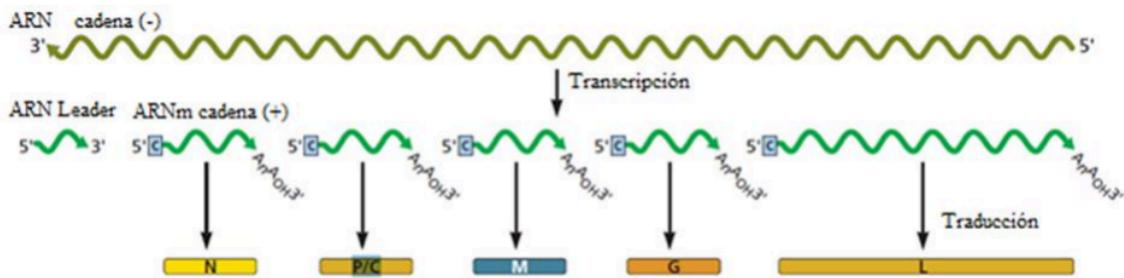


Figura 3. Genoma de la familia de virus Rhabdoviridae. Se observa el ARN cadena negativa a partir del cual se generan ARNs mensajeros subgenómicos con su CAP en el extremo 5' y cola PoliA en el extremo 3' correspondiente. Los mismos dan lugar a las proteínas N, P/C, M, G y L. Adaptado de Principios de Virología (Flint et al., 2015a).

En el virión se distinguen dos unidades estructurales y funcionales: (i) la cubierta lipídica que contiene la glicoproteína (G) transmembrana (involucrada en la unión al receptor celular del huésped y principal antígeno inductor de anticuerpos neutralizantes del virus) y la proteína de la matriz (M) que está localizada sobre la cara interna; y (ii) la nucleocápside central que es transcripcionalmente activa y está compuesta por el ARN genómico siempre asociado con la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P o NS), y la polimerasa (L) (Tordo et al., 1986) (Figura 4).

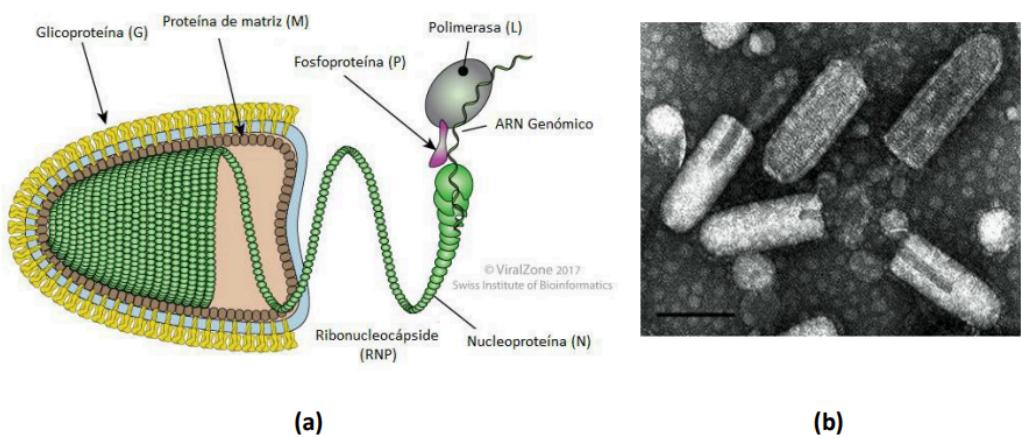


Figura 4: (a) Estructura de los *Lyssavirus*. Adaptado de Viralzone (<https://viralzone.expasy.org/22>). (b) Micrografía electrónica de contraste negativo de viriones en un aislado del virus Vesicular Stomatitis. Extraído de: International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), <https://talk.ictvonline.org/>.

3.1 Ciclo de replicación del virus de la rabia.

En la figura 5 se representa el ciclo de replicación del virus rábico. Brevemente, consta de los siguientes pasos:

1. Adsorción: Es el proceso por el cual inicia la infección a través de la interacción de receptores de la superficie celular y el virus.
2. Penetración: Al entrar en contacto las partículas virales con los receptores de la superficie celular, éstas son endocitadas y llevadas al interior de la célula.
3. Desnudamiento (remoción de la envoltura): Una vez en el interior, la fusión de la membrana endocítica y la membrana endosomal es catalizada por la proteína G y da como resultado la liberación al citoplasma celular de la ribonucleoproteína (RNP) y de manera inmediata la proteína M se disocia de la RNP, por lo que la macrocápside se desintegra.
4. Transcripción: El primer evento de síntesis realizado por la célula es la transcripción del ARNm viral del complejo L-P polimerasa. En este punto ocurre una transcripción primaria en ausencia de síntesis de proteínas.
5. Traducción: Durante esta fase, la polimerasa responde a señales que resultan en síntesis del ARN líder y de los ARN mensajeros. Además, se sintetiza el ARN genómico de polaridad positiva que servirá de templado para generar el ARN genómico de polaridad negativa.
6. Procesamiento: La etapa de encapsulación del genoma viral por parte de la proteína N está íntimamente ligado con el proceso de la replicación del virus y ocurre mientras el ARN genómico es sintetizado y es regulado por el estado de fosforilación de la proteína N.
7. Ensamble y liberación: El proceso del ensamblaje se divide en tres fases diferentes: a) encapsidación por la proteína N del ARN recién sintetizado, b) condensación simultánea, dada por la proteína M, de la ribonucleocápside y la asociación con la membrana plasmática y c) partículas virales maduras y liberadas. Posteriormente, la estructura final se libera de la célula para propagarse nuevamente a la célula más cercana y continuar su avance de la misma forma.

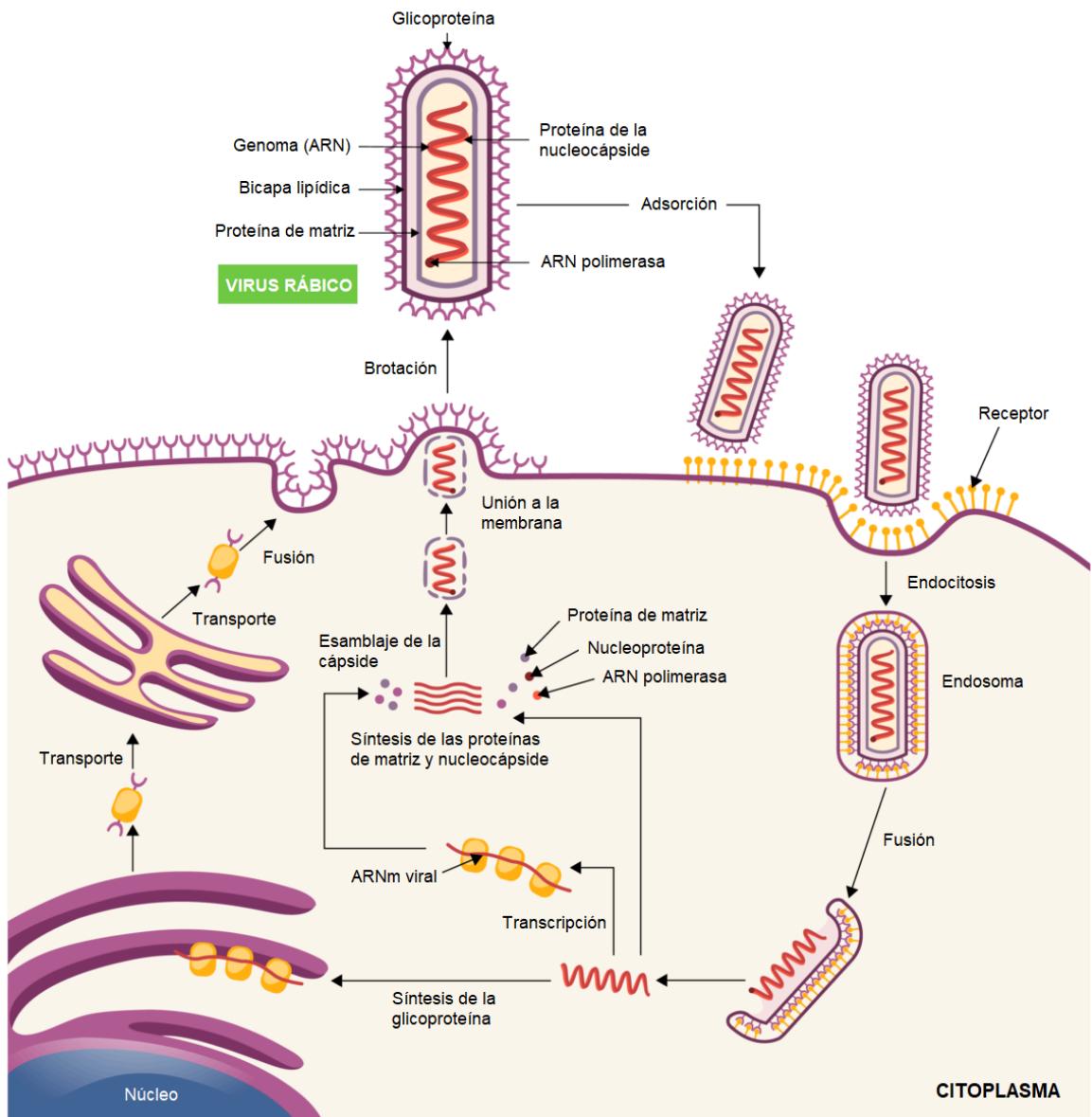


Figura 5: Ciclo de replicación del virus de la rabia. Adaptado de <https://app.lecturio.com/#/article/3309>.

3.2. Mecanismos de transmisión.

La rabia puede transmitirse de un individuo infectado a otro sano, principalmente a través de la saliva de los animales infectados (el contacto con la saliva puede producirse por mordedura siendo el mecanismo de transmisión más común), y por predación (forma más importante de transmisión en el gato) (Ministerio de Salud Argentina, 2018).

Otras formas de transmisión:

- Por trasplante de córnea, órganos sólidos o tejido vascular provenientes de donantes que estaban infectados con el virus rágico.

- Por aerosoles: no está totalmente documentada. Se la postula como una forma posible de transmisión de rabia dentro de una colonia de murciélagos y también como forma de transmisión al humano que visita las cuevas donde habitan dichos animales. Asimismo, sería la forma de contagio en personas que trabajan en laboratorios donde se manipula el virus rágico.

3.3. Patogénesis.

Una vez que penetra al organismo animal o humano, el virus permanece en el sitio de inoculación o entrada durante un período de tiempo muy variable y allí se multiplica. Pasado este período, el virus ingresa al sistema nervioso periférico. Se propaga al sistema nervioso central (SNC) y se multiplica sin producir modificaciones neuropatológicas significativas, lo que apoya la idea de que la sintomatología de la enfermedad se debería más a un proceso de disfunción que de muerte neuronal. A partir del SNC el virus se difunde hacia las glándulas salivales y otros órganos. Una vez que aparece el virus en la saliva, el individuo puede transmitir la rabia a través de la misma (Ministerio de Salud Argentina, 2018).

El período de incubación de rabia, como se mencionó anteriormente, es variable. En humanos va desde menos de dos semanas hasta más de un año, con un promedio de 2 a 4 meses. Los parámetros más importantes que determinan esta variabilidad son: el tiempo en que el virus permanece en el sitio de entrada, la riqueza en terminaciones nerviosas de ese sitio, la distancia entre el sitio de entrada y el SNC, la velocidad del transporte axonal, la profundidad de la herida, la patogenicidad del genotipo/variante viral, la especie animal, la carga viral inoculada y el estado inmunitario del individuo (Ministerio de Salud Argentina, 2018).

3.4. Inmunidad.

Los mecanismos de respuesta inmunitaria a la infección del virus rágico, a pesar de ser ampliamente investigados, aún no se dilucidan. Se desconocen las causas por las cuales el sistema inmunitario es incapaz de producir una respuesta efectiva que resuelva la infección o reduzca su gravedad. Sin embargo, tanto la inmunización activa (aplicación de vacunas) como la pasiva (aplicación de gammaglobulinas antirrábicas) son altamente efectivas para proteger contra la enfermedad.

La respuesta inmunitaria antirrábica comienza inmediatamente luego de que el virus ingresa a la piel o al músculo por una mordedura o rasguño. La inmunidad innata se desencadena con el reconocimiento del ARN viral, tanto en la periferia como en el SNC. En

cambio, la respuesta inflamatoria desencadenada en el SNC es limitada para preservar la integridad de la red neuronal y la vida de la célula huésped. En consecuencia, el virus llega al tronco encefálico y a las glándulas salivales antes de la muerte del hospedador infectado (Lafon, 2013).

En cuanto a la inmunidad adaptativa, se ha determinado que la respuesta celular es crucial para una respuesta inmunitaria eficaz del hospedador contra la infección por virus rábico. El reclutamiento de células T CD8+, CD4+ y B desde la periferia hacia el SNC es necesario para contener al virus, aunque pueda producir daño tisular (Katz *et al.*, 2017). El trabajo de Lafon (Lafon, 2013) afirma que las células T CD8+ contribuyen con la eliminación del virus rábico al aumentar la producción de INF- γ . Las células Th1 ayudan a impulsar la expansión clonal de las células T CD8+ activadas (a través de la secreción de INF- γ e IL-2) e inducen el switch de clase de los anticuerpos producidos por las células B (Katz *et al.*, 2017).

Los anticuerpos específicos juegan un papel esencial en la eliminación del virus rábico libre y de las células infectadas. La mayoría de los anticuerpos antirrábicos se dirigen contra epítopos de la proteína G, aunque algunos pueden reconocer específicamente la proteína N. Si bien los anticuerpos neutralizantes del virus rábico juegan un papel muy importante en la eliminación del virus, aún no se comprende completamente cómo dichos anticuerpos neutralizan al virus (Katz *et al.*, 2017). La glicoproteína G del virus rábico es la proteína de superficie del virión y es capaz de inducir anticuerpos neutralizantes que protegen contra la infección. Además, induce respuesta celular ya que contiene epítopos reconocidos por las células T CD4+ y CD8+ (Cox *et al.*, 1977; Wiktor *et al.*, 1984). Por ello, es el antígeno de elección para el desarrollo de vacunas recombinantes o de tercera generación (Ertl, 2020).

4. Vacunas antirrábicas.

Las vacunas antirrábicas pueden ser de primera, segunda y tercera generación. Las de primera generación se producen utilizando animales como sustrato de replicación del virus y la inactivación del virus se realiza por medios físicos (UV) o químicos (β -propiolactona, etilenimina, acetil etilendiamina o bromoetilénimina). Un ejemplo de este tipo de vacunas es la denominada CRL (cerebro de ratón lactante) o Fuenzalida-Palacios, que utiliza como sustrato para el crecimiento viral el encéfalo de ratones lactantes.

Las vacunas de segunda generación se caracterizan por ser producidas en cultivos celulares, pueden ser formuladas con virus inactivado o atenuado y son las que se utilizan

actualmente en humanos y en veterinaria. Las líneas celulares utilizadas para producir el virus son BHK-21 (*baby hamster kidney*), NIL2s (embrión total de hámster) o Vero (riñón de mono verde africano). Por tratarse de líneas celulares continuas, pueden subcultivarse un gran número de pasajes y permiten una producción a gran escala y a menor costo. Otro de los sustratos utilizados es el cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo (FEP). En las vacunas inactivadas, la inactivación viral se efectúa por métodos químicos con β -propiolactona, etilenimina, acetiletilénimina o bromoetilénimina. Estas vacunas son muy seguras pero su composición química es indefinida debido al proceso de inactivación. Inducen una respuesta inmunitaria fundamentalmente asociada a linfocitos T CD4+ y producción de anticuerpos. Actualmente, en nuestro país, las vacunas antirrábicas de uso humano y veterinario, tanto comerciales como las provistas por el Ministerio de Salud de la Nación, son producidas en cultivos celulares e inactivadas (Ministerio de Salud Argentina, 2018).

Por su parte, en las vacunas atenuadas el RABV conserva su capacidad de multiplicación, pero su patogenicidad está reducida al punto de no provocar enfermedad en el organismo inmunizado. La atenuación de la patogenicidad puede ser empírica (cepas SAD-B19, SAD-Bern, entre otras, atenuadas por pasajes en cultivos celulares) o dirigida (cepas SAG1 y SAG2, mutantes por delección en la cepa SAD), siendo estas últimas más inocuas. Estas Vacunas pueden ser administradas por vía oral, razón por la cual se utilizan en Europa y en Estados Unidos para la vacunación de animales silvestres mediante la distribución de cebos que la contienen (no disponibles en nuestro país) (Ministerio de Salud Argentina, 2018).

Las vacunas de tercera generación o recombinantes se diseñan racionalmente para expresar la glicoproteína del RABV (RG) que contiene epítopes reconocidos por las células T CD4+ y CD8+, y es el principal antígeno inductor de anticuerpos seroneutralización (Ertl, 2020). Estas Vacunas poseen composición antigénica definida y son muy seguras en su producción ya que no se manipula el agente infeccioso. Este tipo de vacunas incluyen: vectores virales, plásmidos bacterianos (vacunas génicas) y subunidades proteicas simples o complejas (producidas en el sistema baculovirus-células de insecto, plantas y células de mamíferos). De acuerdo con el sistema de expresión recombinante, estas vacunas inducen respuestas inmunitarias humorales y/o celulares que son protectoras frente a RABV. En el caso de las vacunas recombinantes vectorizadas por virus, estas pueden ser replicativas o no según si producen progenie viral en el organismo blanco. Si bien existen numerosos desarrollos de vacunas antirrábicas vectorizadas por virus (Del Médico Zajac *et al.*, 2019), solo existen registradas la vacuna Raboral V-RG® y ONRAB® (basadas en virus Vaccinia y

Adenovirus humano 5, respectivamente), ambas replicativas, que se usan en cebos para fauna silvestre en EEUU y Canadá. Como ejemplo de no replicativa existe la vacuna PUREVAX®, basada en un poxvirus de canario (CNPV), que se aplica a gatos. En nuestro país, recientemente se ha aprobado una vacuna antirrábica recombinante para ser aplicada en perros, gatos y ganado (<https://www.motivar.com.ar/2022/12/se-aprobo-el-primer-lote-comercial-de-rhabdo-like-recombinante-vlps>). Esta vacuna es a subunidad proteica y está compuesta por partículas semejantes a virus (del inglés *virus-like particles*, VLPs) generadas por la glicoproteína del RABV expresada en una línea estable de células HEK293 (Fontana *et al.*, 2015).

En nuestro laboratorio de Vacunas Vectorizadas por Pox y Adenovirus del Instituto de Biotecnología de INTA, en colaboración con el Servicio de Vacuna Antirrábica (SVAR) del ANLIS-Malbrán, desarrollamos vacunas antirrábicas basadas en los vectores virales no replicativos en mamíferos: poxvirus de canario (CNPV), virus vaccinia Ankara modificado (MVA) y adenovirus humano tipo 5 ΔE (Ad-5ΔE), que expresan la glicoproteína del RABV (Garanzini *et al.*, 2023; Garanzini, 2021; Zanetti *et al.*, 2012).

4.1. Detección de anticuerpos inducidos por la vacunación.

Los anticuerpos neutralizantes son el indicador más fiable de una vacunación exitosa y garantizan una protección satisfactoria contra la rabia. La OMS y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) consideran que el título de anticuerpos neutralizantes debe ser de al menos 0,5 UI/mL en el suero de seres humanos y animales vacunados. En la actualidad, se recomienda la utilización de dos pruebas de neutralización *in vitro*: la prueba de neutralización del virus con anticuerpos fluorescentes (FAVN) o la prueba rápida de inhibición del foco fluorescente (RFFIT). Sin embargo, en nuestro país, solo se realiza el ensayo de seroneutralización *in vivo*, en el cual se utiliza un gran número de animales. Si bien estos métodos son los recomendados para evaluar la respuesta inducida por las vacunas contra la rabia, tienen como desventajas que consumen mucho tiempo, son caros y requieren técnicos altamente capacitados, así como instalaciones de laboratorio especiales debido a la necesidad de tomar precauciones estrictas al manipular el virus rágico vivo.

Por esto, se han desarrollado diversas técnicas destinadas a reemplazar las pruebas de neutralización. En la actualidad, el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) se utiliza con frecuencia para el diagnóstico serológico de numerosas enfermedades infecciosas. Esta metodología presenta diversas ventajas: requiere menos tiempo y es de fácil aplicación, no demanda la presencia de personal altamente especializado ni la manipulación de virus vivos, lo que elimina la necesidad de contar con laboratorios

especializados para contención. Varias adaptaciones de la técnica ELISA se han desarrollado como posibles alternativas para las pruebas de neutralización del virus rábico. En particular, existen *kits* comerciales de ELISA para la detección de anticuerpos contra la rabia en animales domésticos siendo opciones más simples y que consumen menos tiempo. Sin embargo, para capturar anticuerpos específicos contra la rabia, las placas se recubren con virus inactivados o glicoproteína del virus purificada, dependiendo de la manipulación del virus en entornos de alta bioseguridad para obtener el antígeno. Al mismo tiempo, algunos de los ELISA son específicos de cada especie, lo que impone una limitación para la vigilancia de una enfermedad que afecta a una amplia gama de animales (Organización Mundial de la Salud, 2013). Además, solo algunos de dichos *kits* están disponibles en nuestro país y al ser importados implican un gasto elevado para los programas de control de vacunación.

Nuestro grupo de trabajo sumado al SVAR del ANLIS-Malbrán, implementó un ELISA *in house* utilizando RABV inactivado y purificado como antígeno, que nos permitió evaluar la presencia de anticuerpos antirrábicos en sueros de ratones inmunizados con los candidatos vacunales MVA-RG y Ad-RG (Del Médico *et al.*, 2018, Garanzini, 2021). Sin embargo, observamos gran variabilidad en el rendimiento de las purificaciones de antígeno al utilizar distintos *batchs* de RABV inactivado.

En este contexto, la expresión recombinante de la glicoproteína del virus rábico permitiría superar los inconvenientes detallados anteriormente, simplificando los procesos de producción de antígeno, ya que no se necesitarían instalaciones con alto nivel de bioseguridad, y aumentando la reproducibilidad en la producción del mismo.

5. Glicoproteína del RABV.

Como se mencionó previamente, la glicoproteína del RABV es el único antígeno capaz de conferir protección total contra la rabia y está presente en todas las vacunas antirrábicas recombinantes. Cuando está plegada y glicosilada adecuadamente, la molécula es completamente inmunogénica y contiene epítopes para respuestas inmunes humorales y mediadas por células (Astray *et al.*, 2017 y Targovnik *et al.*, 2019).

La glicoproteína (G) es una proteína transmembrana que emerge como microprotuberancias superficiales triméricas (*spikes*) y está involucrada en la unión al receptor celular del huésped (Kuzmin & Rupprecht, 2008). Es un antígeno de superficie capaz de inducir y reaccionar con anticuerpos neutralizantes del virus. La glicoproteína

posee un péptido señal de 19 aminoácidos (aa) que es eliminado después de la traducción. La proteína G madura tiene 505 aa, es la única proteína viral glicosilada y posee un peso molecular de 62 - 67 kDa. En su estructura se definen tres dominios: el ectodominio N-terminal (aprox 440 aa), el dominio transmembrana de 22 aa y el dominio citoplasmático C-terminal de 44 aa (Kuzmin & Rupprecht, 2008) (Figura 6).

El estado de oligomerización del ectodominio es responsable de la fijación del virus a través de la interacción con los receptores de membrana objetivo y, hasta cierto punto, de la inducción de anticuerpos neutralizantes que conducen a la protección contra la infección por el virus de la rabia (Astray *et al.*, 2017).

Los picos son capaces de unirse al menos a tres receptores diferentes, permitiendo la endocitosis del virus: el receptor de neurotrofina (p75NTR), el receptor de nicotinicacetylcolina y la molécula de adhesión de células neurales. Esto los hace relevantes para la patogénesis viral. Además, estos receptores son responsables de la fusión de la envoltura viral con la membrana celular inducida por un pH bajo, lo que promueve la propagación viral transináptica al sistema nervioso central. También pueden actuar como blanco de las células T colaboradoras y citotóxicas (Astray *et al.*, 2017).

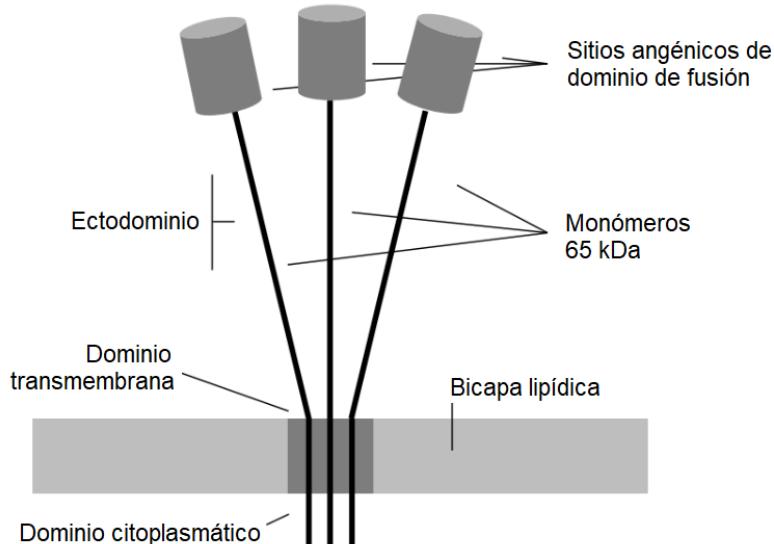


Figura 6: Dominios de la glicoproteína. Adaptado de Astray *et al.*, 2017.

Como proteína viral importante, la glicoproteína ha sido evaluada para el desarrollo de vacunas antirrábicas a subunidad proteica y se utiliza como antígeno de referencia para la determinación de los anticuerpos inducidos por las vacunas antirrábicas por ELISA. Existen numerosos trabajos sobre la expresión recombinante de la glicoproteína en sistemas tanto procariotas como eucariotas (Astray *et al.*, 2017). En particular, los sistemas eucarióticos son los más apropiados para su expresión, ya que se ha reportado que solo la proteína N-glicosilada se transporta desde el complejo de Golgi a la membrana celular y que

sus patrones de plegamiento y glicosilación son importantes para su inmunogenicidad (Astray *et al.*, 2017). Sin embargo, algunos sistemas de expresión presentan limitaciones, por ejemplo, la expresión de la glicoproteína en *Saccharomyces cerevisiae* no fue capaz de proteger a los ratones contra el desafío letal debido a que estaba hiperglicosilada y plegada incorrectamente (Klepfer *et al.*, 1993). Por otro lado, si bien se logró la expresión de la glicoproteína completa en el sistema de vector de expresión de baculovirus (BEVS), con el plegamiento correcto y propiedades biológicas similares a las de la proteína nativa, la expresión de proteínas transmembrana en BEVS es difícil y produce bajos rendimientos (van Oers 2011). Por otra parte, existen pocos informes de expresión estable de la glicoproteína en células de mamíferos. Una razón posible es el patrón de glicosilación que podría ser crítico en estos sistemas. Como ocurre con muchas otras proteínas recombinantes, depende del tipo de célula utilizada y las condiciones de cultivo (Astray *et al.*, 2017).

La solubilización y extracción de proteínas transmembrana constituyen un cuello de botella en todos los sistemas de expresión, porque la estructura proteica suele perderse durante la purificación. Para evitar este inconveniente se ha utilizado la estrategia de expresión del ectodominio de la glicoproteína. Esta forma soluble de la glicoproteína se ha expresado en células de mamíferos, células Sf21 de insectos y células de levadura (Gupta *et al.* 2005, Sissoëf *et al.* 2005, Qian *et al.* 2013; Picotto *et al.* 2017). En todos los casos, la proteína soluble expresada fue antigénica e inmunogénica y podría usarse para detectar el estado inmunológico de los huéspedes vacunados.

En este contexto, surge como línea de trabajo de nuestro laboratorio expresar y purificar el ectodominio de la glicoproteína del virus rábico a partir de células eucariotas y evaluar su utilidad como antígeno de tapizado de un ELISA indirecto que permita determinar la presencia de anticuerpos antirrábicos en sueros murinos.

Los resultados de este trabajo serán fundamentales para, a futuro, diseñar y validar, utilizando estándares internacionales, un ELISA para determinar la presencia de anticuerpos antirrábicos en sueros de distintas especies, de producción nacional y que permita reemplazar importaciones.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis del trabajo.

La hipótesis de esta Tesis de Licenciatura (TL) es:

La glicoproteína del RABV expresada en forma recombinante en células eucariotas es reconocida por anticuerpos anti-RABV.

2. Objetivo general.

Expresar y purificar la glicoproteína del virus rábico a partir de células eucariotas y evaluar su utilidad como antígeno de tapizado de un ELISA indirecto que permita determinar la presencia de anticuerpos antirrábicos en sueros murinos.

2.1. Objetivo específico.

Expresar el ectodominio de la glicoproteína de RABV (RGe) en células eucariotas.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Plásmidos.

Invitrogen™ TOPO™ TA cloning (Thermo Fisher Scientific): diseñados para clonar productos de PCR amplificados por la ADN polimerasa Taq. En este vector se clonó la secuencia codificante del ectodominio de la glicoproteína (RGe) amplificada por PCR para su posterior inserción en el vector de expresión.

pSecTag2-B expression vectors (Invitrogen): vector diseñado para una expresión estable y transitoria de proteínas en células de mamíferos. Las proteínas recombinantes se fusionan en el extremo N-terminal con la secuencia líder de la cadena de Igk murina para la secreción de proteínas y en el extremo C-terminal con un péptido que contiene el epítope *c-myc* y seis residuos de histidina en tandem (6xHis) para su detección y purificación.

pCI-RG: vector pCI-Neo, para expresión de proteínas en células de mamífero, que porta la secuencia completa de la glicoproteína del RABV. Obtenido previamente en nuestro laboratorio, para ser evaluado como vacuna génica antirrábica (D Garanzini, 2015)

pcDNA-GFP: vector para expresión de proteínas en células de mamífero diseñado para expresar proteínas etiquetadas con *c-myc* y 6xHis en el extremo C-terminal. Usado como control de transfección y traducción, cedido por Luciano Prieto.

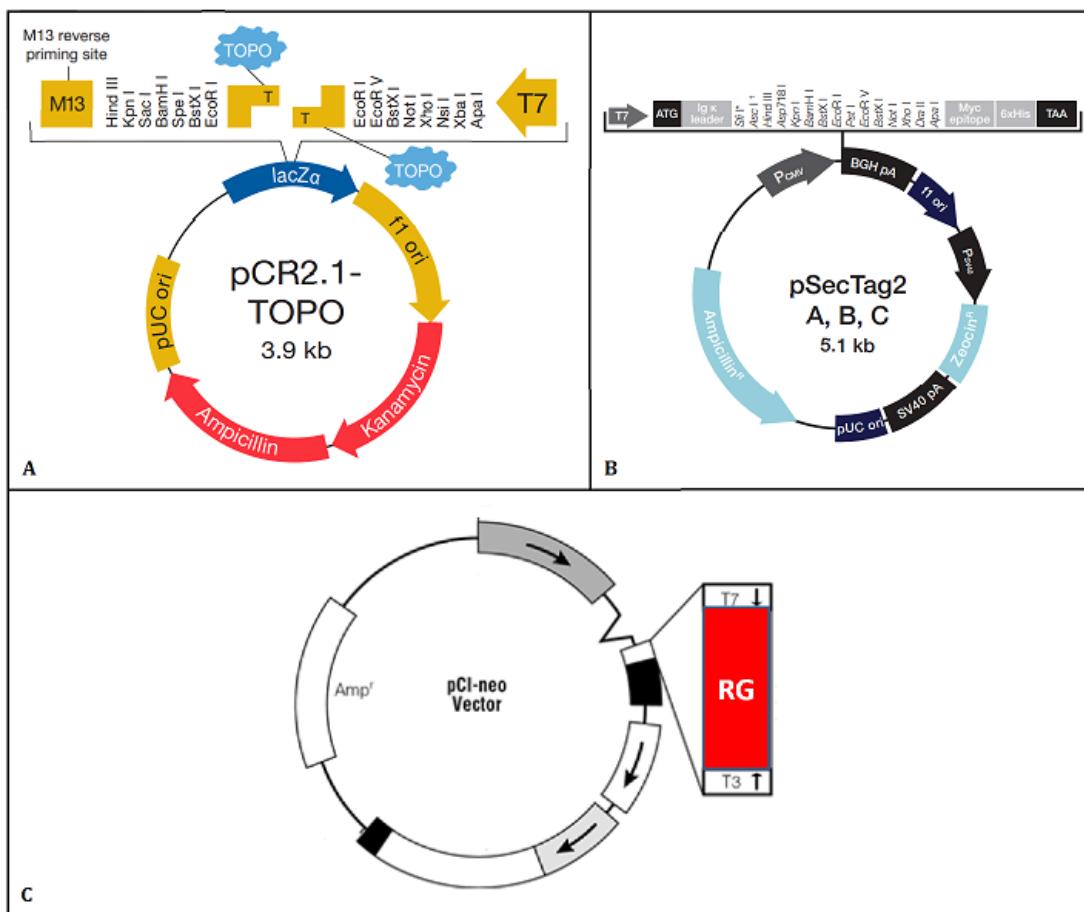


Figura 7: Esquema de los vectores utilizados. (A) TOPO™ TA cloning, (B) pSecTag-B, (C) pCI-RG.

2. Oligonucleótidos iniciadores o primers.

En la Tabla 1 se indican las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo de TL:

Primers	Secuencia nucleotídica (5' - 3')	Tf	Sr
RG11_ED_mF	<u>AAGCTT</u> GGAGCCCGATTGAC	60	<i>HindIII</i>
RG12_ED_mR	GAATT <u>CCCC</u> CAGTTGGGGAGAC	60	<i>EcoR I</i>

Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados en esta Tesis. Tf: temperatura de fusión, expresada en °C. Sr: sitios de restricción. Las bases subrayadas indican el sitio de reconocimiento de la enzima *HindIII* y *EcoR I* (primers For y Rev respectivamente).

3. Metodología de ADN recombinante.

Todas las técnicas de ADN recombinante se realizaron de acuerdo a las ya descritas (Maniatis, Fritsch, and Sambrook 1982). Se utilizaron enzimas de restricción, enzimas

modificantes, enzima y buffer T4 ADN ligasa (Promega), enzima Taq ADN polimerasa (Thermo Fisher Scientific) y dNTPs (Desoxirribonucleótidos trifosfato) (Promega). Todos los reactivos se utilizaron según las especificaciones de sus fabricantes.

3.1. Reacción de amplificación por PCR.

La amplificación por PCR se realizó en un volumen final de 12,5 µL con las siguientes cantidades:

DNA molde	1 µL
go-Taq	0.2 µL
Buffer 10x	1.25 µL
Oligonucleótido sentido (15 µM)	0.5 µL
Oligonucleótido antisentido (15 µM)	0.5 µL
dNTPs (10 mM)	0.5 µL
Agua	8.55 µL
Volumen total	12.5 µL

Tabla 2: Reactivos utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa

Las condiciones de ciclado para amplificar el fragmento correspondiente al ectodominio de la glicoproteína fueron las siguientes:

Ciclado		
	Desnaturalización inicial	94 °C 5 min
35 ciclos	Desnaturalización	94 °C 5 min
	Hibridación	60 °C 1 min
	Elongación	72 °C 30 seg
	Elongación final	72 °C 10 min

Tabla 3: Condiciones de las distintas etapas del ciclado de la reacción de PCR

La temperatura de fusión (T_f) para la hibridación de ácidos nucleicos se estimó según la siguiente fórmula:

$$T_f = 4^\circ\text{C} \times n^\circ (\text{G+C}) + 2^\circ\text{C} \times n^\circ (\text{A+T})$$

3.2. Electroforesis en geles de agarosa.

Se utilizaron geles de agarosa de concentración 1%. La electroforesis se realizó utilizando *buffer* TAE (Tris-acetato 10 mM, EDTA 1 mM) a 100 V a temperatura ambiente (TA). Para la visualización de las bandas de ADN se utilizó bromuro de etidio en una concentración de 0,5 µg/mL de gel y un transiluminador de luz UV.

Para sembrar las muestras se utilizó *buffer* de siembra de concentración 10X (glicerol 50%, TAE 5X, azul de bromofenol 1%).

Los geles se fotografiaron utilizando un transiluminador de luz ultravioleta y se digitalizaron utilizando el equipo Gbox (Syngene) y el software G:Boca Chemi XX6 GENE Sys (V. 1.5.4.0) provisto por el fabricante.

3.3. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa.

Los fragmentos de ADN resueltos mediante electroforesis en gel de agarosa fueron escindidos del gel con bisturí y purificados utilizando el kit EasyPure Quick gel (Trans) según el protocolo recomendado por el fabricante. El ADN obtenido se eluyó en 30 µL de H₂O ultrapura a 65°C.

3.4. Digestión con enzimas de restricción.

Las digestiones de los diferentes plásmidos se realizaron en un volumen final de 15 µL y se utilizaron 2 - 3 µL del ADN plasmídico, 1-2 U de enzima de restricción y el *buffer* 10X correspondiente. Las reacciones se incubaron de 2 a 3 h a 37°C.

3.5. Defosforilación de los extremos 5' fosfato.

La reacción de remoción de los grupos fosfato de los extremos 5' del plásmido pSecTag2-B digerido se realizó utilizando 5 U de la enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIP, New England Biolabs) agregadas directamente al volumen de reacción de digestión. La reacción se incubó por 15 min a 37°C. Luego de la reacción la enzima se inactivó por calor a 65°C por 15 min y se purificó el ADN plasmídico a partir de geles de agarosa (ver apartado 3.1.2).

3.6. Reacciones de ligación molecular.

Para el ligado molecular del inserto y el plásmido correspondiente, se utilizaron 50 ng de vector y diferentes cantidades de inserto según las relaciones molares de vector:inserto (V:I) 1:1 y 1:3. Las reacciones de ligación se llevaron a cabo utilizando la enzima T4 ligasa

(Promega), buffer 10X y H₂O hasta alcanzar un volumen final de 10 µL. La reacción se incubó *over night* (o.n.) a 16°C. Se incluyó un control de ligación con vector y sin inserto.

3.7. Transformación de bacterias *Escherichia coli* DH5α.

Las bacterias se hicieron competentes para la transformación mediante el método de Hanahan (Hanahan 1985) y se guardaron congeladas a -70°C hasta su uso.

Las bacterias competentes se descongelaron y se mantuvieron en hielo por 10 min. A 50 µL de bacterias se le agregaron 5 µL del producto de las reacciones de ligado, se mezclaron por pipeteo e incubaron en hielo durante 30 - 45 min. Posteriormente, se incubó a 42°C durante 1,5 min (choque térmico) y se dejó en hielo durante 2 min adicionales. Luego, se agregaron 800 µL de medio Luria-Bertani (LB: triptona 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L) y se incubó durante 60 min con agitación suave a 37°C. A continuación, se centrifugó a velocidad máxima durante 1 min. Una vez concluida la centrifugación, se descartaron 800 µL de sobrenadante, las bacterias se resuspendieron en el sobrenadante remanente y se distribuyeron en placas de LB agar (agar 1,5 g /100 mL) conteniendo ampicilina (100 µg/mL). Las placas se incubaron a 37°C toda la noche.

Las colonias obtenidas se picaron al día siguiente y se inocularon en tubos de ensayo conteniendo 3 - 5 mL de LB/antibiótico, a 37°C con agitación durante toda la noche. Una alícuota de estos cultivos se mezcló en una relación 1:1 con glicerol 50% para su conservación a -70°C. El resto del cultivo bacteriano se utilizó para extraer el ADN plasmídico para el análisis por digestión con enzimas de restricción.

3.8. Minipreparaciones de ADN plasmídico.

Se utilizó el método denominado de lisis alcalina (modificado de Birnboim and Doly 1979). Se partió de 1,5 - 3 mL de cultivo de bacterias crecidas durante toda la noche a 37°C en medio de cultivo LB conteniendo el antibiótico correspondiente. El cultivo bacteriano se cosechó por centrifugación a 10.000 x g en una microcentrífuga durante 2 min a TA y se descartó el sobrenadante. El pellet de bacterias se resuspendió en 200 µL de Solución I (Tris-HCl 25 mM pH=8, EDTA 10 mM, glucosa 50 mM). Luego se agregaron 200 µL de Solución II (NaOH 0,2 N, SDS 1%) para lisar. Se mezcló suavemente por inversión y se incubó 5 min a TA. Finalmente se agregaron 200µl de Solución III (acetato de potasio 3 M) y se mezcló por inversión. Se centrifugó el floculado a 10.000 x g durante 10 min. Se tomó el sobrenadante libre de floculado y se traspasó a un tubo de microcentrífuga limpia donde se precipitó el ADN plasmídico por el agregado de 600 µL de isopropanol y centrifugación a 10.000 x g durante 20 min. Se lavó el precipitado con etanol 70 %, se centrifugó a 10.000 x g durante 5 min, luego se incubó a 37°C hasta evaporar el etanol y se resuspendió en 50µl de

solución de agua + RNAase A (50µl + 2 µl respectivamente) recuperando sólo el ADN plasmídico.

3.9. Preparación de ADN plasmídico de alta calidad.

Para la obtención de ADN plasmídico de alta calidad para secuenciación y para las transfecciones, se utilizaron los kits comerciales Easy Plasmid Miniprep kit" (Transgene) y ZymoPURE™ II Plasmid Midiprep kit (Zymo Research) según especificaciones del fabricante. Las preparaciones del ADN se resuspendieron en 50-250 µL de agua ultrapura dependiendo del volumen de cultivo inicial (1,5 ó 50 mL, respectivamente). El rendimiento promedio fue de 150 ó 1400 ng/µL, respectivamente. La concentración de ADN se determinó a 260 nm utilizando el equipo NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

4. Secuenciación de ADN.

Con el fin de corroborar si los insertos clonados en el vector pSecTag2-B tienen las secuencias y el marco de lectura correcto, se seleccionó el clon 2 y fue enviado al Servicio de secuenciación de Macrogen (Corea). La secuenciación se realizó utilizando los oligonucleótidos universales T7for y BGHrev por la metodología de Sanger.

Las secuencias se analizaron usando el programa BioEdit v.7.2.5 (12/11/2013) y la herramienta ClustalW Multiple Alignement.

5. Células.

En este trabajo se utilizaron las células HEK293T, originalmente denominadas 293tsA1609neo, son células de riñón embrionario humano altamente transfectables que contienen el antígeno T SV40. Esta línea celular es ampliamente utilizada para la producción retroviral, la expresión genética y la producción de proteínas.

Estas células fueron provistas por el Sector de Cultivo de Tejidos del Instituto de Virología, Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA), INTA. Luego fueron mantenidas en el sector de cabinas para células de vertebrados del Instituto de Biotecnología. El medio de cultivo utilizado fue medio esencial mínimo Dulbecco (MEM-D) con 10 % de suero fetal bovino (SFB, Internegocios) y suplementado con antibiótico/antimicótico 1X (100 U/mL de penicilina, 100 ug/mL de estreptomicina y 0,25 µg/mL de antimicótico Fungizone®, Gibco, Thermo Fisher Scientific).

6. Transfección transitoria de células HEK293T.

La transfección de células HEK293T se realizó en placas de 12 pocillos y botellas T25 y se utilizó el clon 2 del plásmido pSecTag2-B-RGe (que contiene el fragmento del gen que codifica para el ectodominio de la glicoproteína, denominado pST-RGe a lo largo de esta TL). Para realizar la transfección, se incubaron distintas cantidades de ADN con el agente

lipofectante PolyAr87 (FFyB, UBA), se mezcló suavemente y se incubó a TA durante 8 min. Se incluyó como control de transfección el ADN del plásmido pcDNA-GFP que expresa la proteína fluorescente verde fusionada a las etiquetas *c-myc* y 6XHis y como control negativo un pocillo o botella con el agente lipofectante y sin ADN. A continuación, se retiró el medio de crecimiento de las células, se lavaron con PBS 1X y se les agregó MEM-D sin suero y la mezcla de transfección (ver tabla 4). Las células se incubaron 4 h a 37°C en estufa con 5% CO₂. Finalizado ese tiempo, se agregó el volumen correspondiente de MEM-D suplementado con 5% SFB. Se realizaron 3 ensayos de transfección.

Recipiente de cultivo celular	Placa de 12 pocillos	Botella T25
Superficie (cm ²)	4	25
Cantidad de células	3,6/5,4x10 ⁵	2,2x10 ⁶
ADN (ug)	1,5	8,4/11,2
PolyAr87 (uL)	2	12
MEM-D sin suero (uL)	347	990
MEM-D con SFB 5% (mL)	1,5	4

Tabla 4: Cantidadas utilizadas de cada reactivo en los ensayos de transfección.

Para determinar la expresión de la proteína recombinante se colectaron por separado *pellet* y sobrenadante a las 24, 48 y 72 h post transfección. Los sobrenadantes fueron tratados como se describe en las secciones 7.1 y 7.2 y los pellets se cosecharon en 50-120 uL de agua o PBS 1X. Ambas muestras fueron conservadas a -20°C hasta su utilización.

7. Análisis proteico.

7.1. Precipitación de proteínas con TCA.

Una fracción de los sobrenadantes de las células transfectadas fueron sometidos a precipitación mediante ácido tricloroacético (TCA) puro, alcanzando una dilución final de 1/10. La muestra se mantuvo en hielo durante 30 min, resuspendiendo vigorosamente con *vortex* cada 10 min para asegurar una homogeneización adecuada. Luego, se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se obtuvo un precipitado enriquecido en proteínas. Al *pellet* resultante se le añadieron entre 50-80 µL de agua ultrapura y se incubó a 90 °C durante 10 min. Finalmente, se resuspendió el *pellet* con pipeta o *vortex*, se adicionó 10-12 µL de *cracking buffer* (CB) 5X (SDS 10%, DTT 500mM, Glicerol 50%, Tris-HCl 250mM y 0.5% colorante azul de bromofenol, pH 6.8) y se neutralizó con 1-2 µL de NaOH 10 N para obtener una solución con pH neutro. Se conservó a -20°C hasta su utilización.

7.2. Purificación de proteínas mediante el uso de la resina Ni-NTA.

Otra fracción del sobrenadante de transfección fue tratada con resina Ni-NTA agarosa (Qiagen®) en *batch*, para purificar las proteínas recombinantes.

Para una muestra de 800 μ L, se equilibraron 112 μ L de resina con un volumen de Buffer Nativo 1X (NaH_2PO_4 50 mM, pH 8.0, NaCl 500 mM) a un pH de 8. Se mezcló por inversión, se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se adicionó un volumen del Buffer Nativo 1X sobre la resina y se agregaron los 800 μ L del sobrenadante celular. Se incubó durante 1 hora y 30 min con agitación constante.

Luego, se centrifugó la mezcla a 2.000 rpm durante 5 min, se colectó el sobrenadante (percolado) y al *pellet* se le añadieron 200 μ L del Buffer Nativo 1X, se mezcló suavemente y se centrifugó a 2.000 rpm durante 5 min, separando el sobrenadante (lavado 1) del *pellet*. Se repitió este paso de lavado una vez más (lavado 2). Para la elución final se agregó 50 μ L EDTA 0.5 M, se mezcló y se centrifugó a 2.000 rpm durante 5 min. Se tomó el sobrenadante y se agregaron 12 μ L de CB 5X.

7.3. Extracción de proteínas en condiciones nativas y desnaturalizantes.

Para evaluar si la proteína recombinante detectada en el *pellet* podía ser extraída en condiciones nativas o desnaturalizantes se realizó una transfección en células HEK293T en placas de 12 pocillos y se cosecharon los pellets a las 24, 48 y 72 h. El pellet de las células transfectadas con pcDNA-GFP fueron resuspendidas en 20 μ L de PBS 1X y 5 μ L de CB 5X. Las células transfectadas con pST-RGe fueron resuspendidas en 120 μ L de PBS 1X y divididas en tres microtubos para realizar distintas condiciones de extracción, 20 μ L fueron el control sin tratar, 50 μ L fueron tratadas con 200 μ L de buffer nativo 1X y 50 μ L con 200 μ L de buffer desnaturalizante (Urea 8 M, fosfato de sodio 20 mM, pH 7.8; NaCl 500 mM). Para la extracción se realizaron dos ciclos de congelado (-20°C) y descongelado (45°C), luego se centrifugó a 10.000 rpm por 5 min. Se separaron los sobrenadantes y se tomó una muestra a la que se le agregó CB 5X. Por otro lado, los pellets se resuspendieron en 40 μ L de agua más 10 μ L de CB 5X. Las muestras se resolvieron en un SDS-PAGE 12% y *Western blot*.

7.4. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.

Se utilizaron geles desnaturalizantes de poliacrilamida de concentración 12%. Se utilizó un grado de entrecruzamiento acrilamida-bisacrilamida de 29:1. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 120 V, en buffer Tris-glicina-SDS (Tris-HCl 25 mM pH 8.8, glicina 190 mM, SDS 0,1%).

Para preparar las muestras, a los extractos proteicos se les agregó CB 2X ó 5X y se hirvieron durante 5 min. Una vez finalizada la corrida electroforética, se desmontaron los geles y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para los ensayos de *Western blot*.

7.5. Electrotransferencia.

Luego de efectuada la electroforesis, se cortó un rectángulo de membrana de nitrocelulosa (S&S BA 0,45 m, Schleicher&Schuell) de tamaño algo mayor que el del gel y se hidrató 5 min en buffer de transferencia (Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 190 mM, metanol 20 %). Se dispuso sobre la cara del *cassette* de transferencia correspondiente al electrodo negativo (Bio-Rad): una esponja de tipo ScotchBrite (Bio-Rad), un papel de filtro Whatmann 3 mm, el gel de poliacrilamida, el filtro de nitrocelulosa, un papel de filtro Whatmann 3 mm y una esponja del tipo ScotchBrite. El *cassette* se montó dentro de la cuba de transferencia (Bio-Rad), se llenó con *buffer* de transferencia y se transfirieron las proteínas del gel al filtro de nitrocelulosa aplicando una corriente constante de 200 mA durante 1 h, en frío. La correcta transferencia de proteínas a la nitrocelulosa se verificó por tinción con Rojo Ponceau 0,1% (en ácido acético 5%).

7.6. Detección inmunológica de las proteínas (*Western blot*).

Luego de la transferencia, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C en la solución de bloqueo TBS-T-leche (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%, leche descremada 5%). Luego del bloqueo, se lavaron con la solución de lavado TBS-T (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%) y se incubaron con diluciones apropiadas de los anticuerpos específicos en *buffer* de dilución TBS-T-leche. Luego de 1,5-2 h de incubación a TA con agitación suave, se recuperó la dilución del anticuerpo y las membranas se lavaron 3 veces con solución de lavado TBS-T por 5 min cada vez. Posteriormente, las membranas se incubaron durante 1 h a TA con agitación suave, con una dilución del segundo anticuerpo conjugado con la enzima fosfatasa alcalina. Luego de la incubación se recuperó la dilución del segundo anticuerpo y las membranas se lavaron 3 veces con solución de lavado TBS-T por 5 min cada vez. Se agregaron finalmente 5 mL de solución de revelado (10 ml de *buffer* de revelado (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM), 66 µL de Nitro blue tetrazolium (NBT, 50 mg/mL en dimetilformamida 70%, Promega) y 33 µL de bromo-cloro-indoil-fosfato (BCIP, 50 mg/mL en dimetilformamida 100%, Promega). Se incubó con agitación suave por 1 a 40 min con luz tenue, hasta visualizar las bandas de interés. La reacción de revelado se detuvo por lavados con H₂O y las membranas se secaron al aire y se guardaron.

RESULTADOS

RESULTADOS

Amplificación de la secuencia del ectodominio de la glicoproteína del virus rábico.

La secuencia del ectodominio de la glicoproteína (denominada RGe a lo largo de esta TL) comprende desde el nt 88 al 1374 del gen completo. Utilizando los oligonucleótidos RG11_ED_mF y RG12_ED_mR y como templado el vector pCI-RG (plásmido disponible en nuestro laboratorio que posee la secuencia completa del gen que codifica para la glicoproteína del virus rábico), se amplificó por PCR un fragmento de 1272 pb (nt 98 a 1368) y se clonó en el vector TOPO-TA cloning (Figura 8.B). Los oligonucleótidos sentido (*forward*) y antisentido (*reverse*) utilizados poseen la secuencia de las enzimas de restricción *Hind*III y *Eco*R I, respectivamente, que permitirán luego el subclonado dirigido del inserto en el vector pSeqTag2-B (pST).

En la figura 8.A, se muestra un esquema de la secuencia de la glicoproteína y el lugar de hibridación de los oligonucleótidos.

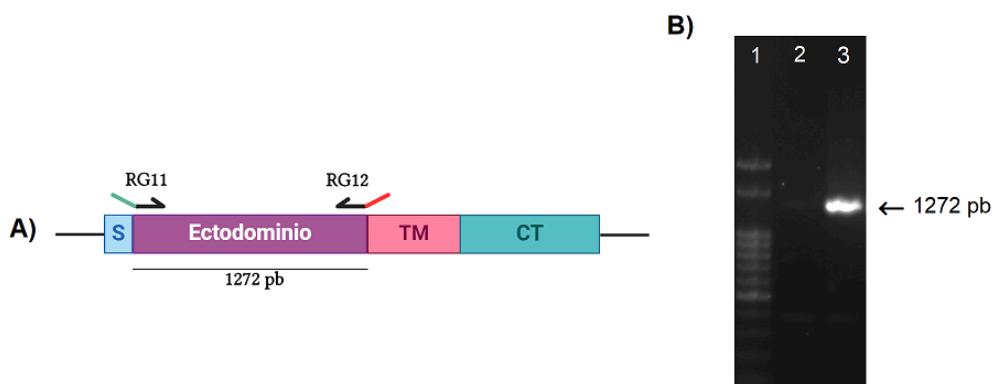


Figura 8: A) Representación esquemática de la organización del gen de la glicoproteína del virus rábico (RG): (S) secuencia señal, ectodominio, dominio transmembrana (TM) y citoplasmático (CT). B) Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la reacción de PCR. Calle 1: marcador de peso molecular de 100 pb (Inbio Highway); calle 2: reacción de PCR utilizando pCI como templado para la reacción (control negativo); calle 3: producto de PCR obtenidos con pCI-RG como templado.

En la calle 2 se observa un producto del tamaño esperado. El mismo se escindió del gel con bisturí y se purificó utilizando un *kit* comercial. Posteriormente se cuantificó por nanodrop y se obtuvo una concentración de 15 ng/ μ L.

Clonado de la secuencia del ectodominio en TOPO-TA.

El inserto purificado se ligó en el plásmido TOPO-TA y se transformaron bacterias *E. coli* DH5-alfa competentes con la ligación. Luego, se realizaron minipreparaciones de ADN a partir de 10 colonias elegidas al azar de todas las resultantes en la transformación y se trataron con la enzima de restricción *Hind*III, con el objeto de determinar qué clones poseían el inserto y en qué orientación. Luego de la digestión, los vectores que posean inserto

liberarán un fragmento de 1400 pb (que contiene las 1272 pb de la secuencia de RGe y algunos nucleótidos del vector TOPO-TA) o se observará una banda de 5,2 kpb aproximadamente (correspondientes al vector más el inserto), según la orientación en la que se haya ligado el inserto.

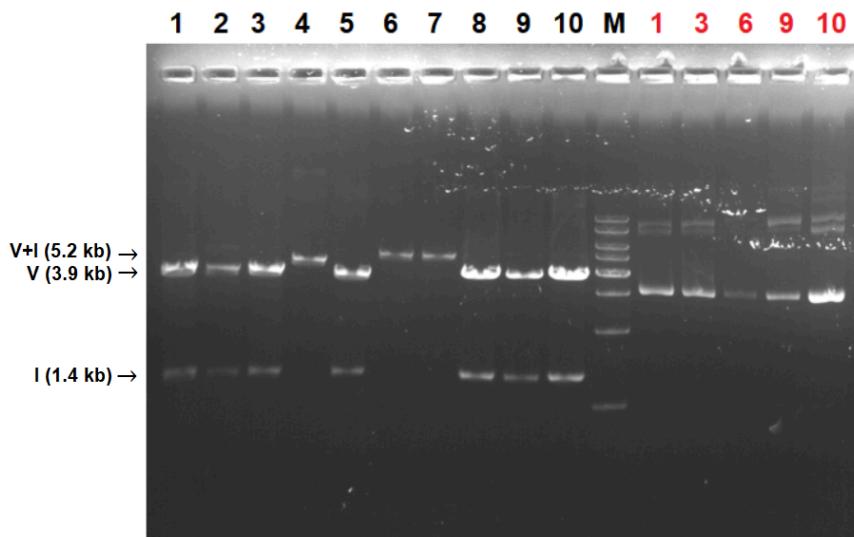


Figura 9: Análisis de los clones TOPO-RGe recombinantes por restricción. A la izquierda del marcador se encuentran los clones digeridos con la enzima de restricción *Hind*III y a la derecha se sembraron los clones sin digerir como control. M: 1 Kb DNA Ladder (Promega). Los productos de la reacción de restricción se resolvieron en geles de agarosa 1% teñidos con bromuro de etidio.

En la Figura 9 se puede observar que todos los clones analizados poseen el inserto (RGe). Los plásmidos recombinantes obtenidos se denominaron TOPO-RGe.

Clonado de la secuencia de RGe en el vector pSecTag2-B.

Para continuar con la construcción del vector de expresión, se eligió el vector “B” del pSecTag2 para mantener el marco de lectura de la secuencia RGe con la secuencia señal (N-terminal) y con las etiquetas *c-myc* y 6xHis (C-terminal). Por otro lado, se eligió al azar el clón recombinante N° 8 del plásmido TOPO-RGe.

El plásmido TOPO-RGe fue digerido en forma secuencial con las enzimas de restricción *Hind*III y *Eco*R I, y el inserto liberado se subclonó direccionalmente en el plásmido pST previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. Antes de realizar la ligación, se trató a este último con la enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIP) para eliminar los grupos fosfato de los extremos 5' y evitar el religado del mismo. Los productos de la restricción se resolvieron por geles de agarosa, se escindieron las bandas correspondientes a vector e inserto, se purificaron por *kit* y se cuantificaron previo a la ligación.

Con los productos de ligación se transformaron bacterias competentes y se sembraron en tres placas de la siguiente manera: 1) relación V:I 1:3, 2) relación V:I 1:1 y 3) vector sin inserto (control negativo). Se obtuvo 1 colonia en la placa (1), 2 colonias en la placa (2) y

ninguna en la placa control. Se picaron las tres colonias, de las cuales se extrajo el ADN plasmídico y se analizaron mediante restricción con la enzima *EcoR* I, con el fin de identificar los clones que incorporaron la secuencia de interés.

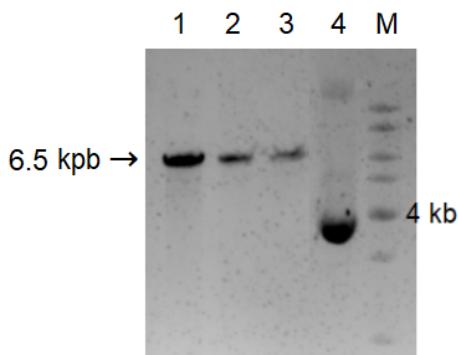


Figura 10: Análisis por restricción de los clones pST-RGe recombinantes. Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de digestión con *EcoR* I de los clones 1, 2 y 3 (filas 1, 2 y 3, respectivamente) de pST-RGe. Fila 4: clon 1 sin digerir. M: marcador de peso molecular 1 Kb (Trans).

Tal como se observa en la Figura 10, todos los clones analizados contenían el inserto ya que se obtuvo un producto de aproximadamente 6.4 kpb correspondientes al tamaño del vector (5,1 kpb) con inserto (1,3 kpb). Estos vectores se denominaron pST-RGe y se eligió al azar el clon 2 para continuar el trabajo.

Análisis de la secuencia del plásmido pSecTag-RG.

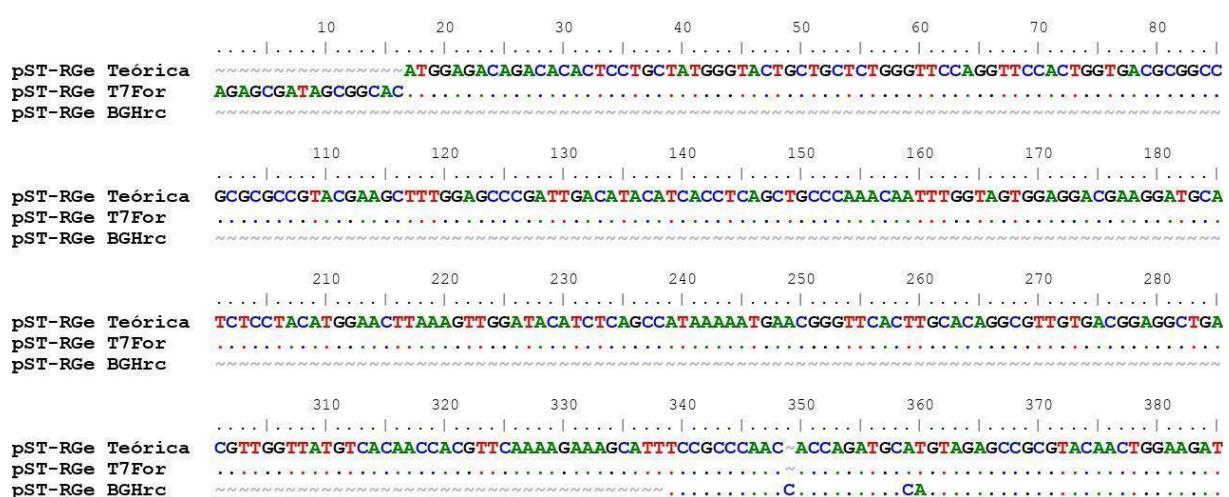
El vector pST-RGe clon 2 fue secuenciado por el método de Sanger en la empresa Macrogen.

Para analizar la secuencia obtenida, primero se construyó manualmente una secuencia teórica del pST-RGe incluyendo aquellas aportadas por el vector (ATG, secuencia señal, sitios de restricción, etiquetas *c-myc* y 6xHis, codón stop) y la del ectodominio de la glicoproteína (Figura 11).

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGTACTGCTGCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGAC
 CGGGCCCAGCCGCCAGGCAGCGCGCCGTACGAAGCTTGGAGCCCATTGACATACATCA
 CCTCAGCTGCCAAACAATTGGTAGTGGAGGACGAAGGATGCACCAACCTGTCAGGGTTCTC
 CTACATGGAACCTAAAGTTGATACTCATCTCAGCCATAAAAATGAACGGGTTCACTTGACAGG
 CGTTGTGACGGAGGCTGAAACCTACACTAACTCGTTGGTATGTCACAACCACGTTCAAAG
 AAAGCATTCCGCCAACACCCAGATGCATGTAGAGCCGCTACAACGGAAAGATGGCCGGTG
 ACCCCAGATATGAAGAGTCTCTACACAATCCGTACCCGACTACCAACTGGCTCGAACTGTAA
 AAACCACCAAGGAGTCTCGTTATCATATCTCAAAGTGTGGCAGATTGGACCCATATGACA
 GATCCCTTCACTCGAGGGCTTCCCTGGCGGGAAAGTGCTCAGGAGTAGCGGTGTCTTACCT
 ACTGCTCCACTAACACGATTACACCATTGGATGCCGAGAATCCGAGACTAGGGATGTCTT
 GTGACATTTTACCAATAGTAGAGGGAAAGAGAGCATCCAAAGGGAGTGAGACTTGCGGCTTTG
 TAGATGAAGGAGGCCTATATAAGTCTTAAAAGGAGCATGCAAACATCAAATGAAACCAAATGGT
 TCGGACTTAGACTTATGGATGGAACATGGTCTCGATGCAAACATCAAATGAAACCAAATGGT
 GCCCTCCCGGTAGTTGGTAAGAGAGAGAGCATGGTCTCGACTACAGAAATTGAGCACCTGTTG
 AGAGGAGTTGGTCAAGAAGAGAGAGAGCATGGTCTGGATGCATTAGAGTCCATCATGACCACCA
 AGTCAGTGAGTTTCAGACGTCTCAGCCATTAAAGAAAACCTGTCCTGGTTGGAAAAGCAT
 ATACCATATTCAACAAGACCTTGATGGAAGGCCATGCTCACTACAAGTCAGTCAGAAACTTGG
 ATGAGATCATCCCTCAAAAGGGTCTTAAGAGTTGGGGGGAGGTGTCATCTCATGTAAC
 GGGTATTTCAATGGTATAATTAGGACCTGACGGCAATGTCTTAATCCCAGAGATGCAATC
 ATCCCTCCAGCAACATGGAGTTGGTATCCTCGTTATCCCCCTATGCAACCCCTG
 GCAGACCGCTTACCGTTCAAGAACGGTACGGAGGCTGAGGATTTGTCGAAGTTCACCT
 CCCGATGTGCACGAACGGATCTCAGGAGTTGACTGGTCTCCCGAACTGGG**GAATTCTGCA**
GATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCTCGAGGAGGGCCGAACAAAAACTCATCTCAGAAGAG
GATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCATATTGA

Figura 11: Secuencia teórica del cassette de expresión del ectodominio de la glicoproteína. Se detallan las secuencias aportadas por vector: ATG, secuencia señal (color verde), región conectora (negro), sitio de clonado multiple, sitio de restricción de la enzima *Hind*III y *Eco*R I (rosa) y las etiquetas *c-myc* y 6xHis en color celeste y naranja, respectivamente. En color violeta se indican los nucleótidos del ectodominio de la glicoproteína.

Luego, esta secuencia se alineó con las secuencias obtenidas con el vector pST-RGe clon 2 con los oligonucleótidos T7 forward (T7For) y BHG reverse (BHGrc).



RESULTADOS

pST-RGe Teórica	410	420	430	440	450	460	470	480
pST-RGe T7For
pST-RGe BGHrc
ATATGAAGAGTCTACACAATCCGTACCCCTGACTACCAC TGGCTTCGA ACTGT AAAAAACCAAGGAGTCTCTCGTTATCATA								
pST-RGe Teórica	510	520	530	540	550	560	570	580
pST-RGe T7For
pST-RGe BGHrc
GATTGGACCATATGACAGATCCCTTACTCGAGGGTCTTCCC TGGGGGAAGTGCTCAGGAGTAGCGGTGCTTCTACCTACT								
pST-RGe Teórica	610	620	630	640	650	660	670	680
pST-RGe T7For
pST-RGe BGHrc
ATTACACCATTGGATGCCGAGAATCCGAGACTAGGGATGCTTGTGAC TTTTACCAATAGTAGAGGGAAAGAGACATCCAA								
pST-RGe Teórica	710	720	730	740	750	760	770	780
pST-RGe T7For
pST-RGe BGHrc
CGGCCTTGTAGATGAAGGAGGCC TATATAAGTCTTAAAGGAGCATGCAA ACTCCAGTTATGTGGATTCTCGGACTTAGACT								
pST-RGe Teórica	810	820	830	840	850	860	870	880
pST-RGe T7For
pST-RGe BGHrc
GTCTCGATGCAAACATCAAATGAAACAAATGGTCCCC TCCCGGTCAAGTTGGTAATTGCACGACTTCGCTCAGACGAAATTG								
pST-RGe Teórica	910	920	930	940	950	960	970	980
pST-RGe T7For
pST-RGe BGHrc
AGGAGTTGGTCAAGAAGAGAGGAGTGTCTGGATGCATTAGAGTCATCATGACCACCAAGTCAGTAGTTAGTCAGACGTTAGCTCAG								
pST-RGe Teórica	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080
pST-RGe T7For
pST-RGe BGHrc
TGTCCCTGGGTTGGAAAAGCATATACCAATTCAACAAGACCTTGATGGAAAGCCATGCTCACTACAAGTCAGTCAGAACTTGG								
pST-RGe Teórica	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180
pST-RGe T7For
pST-RGe BGHrc
TCAAAAGGGTGTAAAGAGTGGGGGGAGGAGTCATCCTCATGTAACGGGTA TTTTCAATGGTATAATATTAGGACCT								
pST-RGe Teórica	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280
pST-RGe T7For
pST-RGe BGHrc
ATCCCAGAGATGCAATCATCCCTCCTCCAGAACATATGGAGTTGGTATCCTCGGTTATCCCCCTTATGCACCCCCCTGGCA								
pST-RGe Teórica	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380
pST-RGe T7For
pST-RGe BGHrc
TTCAAGAACGGTGACGAGGCTGAGGATTGTCACCTTCCCAGTGTGACCGAACGGATCTCAGGAGTTGACTTGGGT								
pST-RGe Teórica	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480
pST-RGe T7For
pST-RGe BGHrc
TTCTGCAGATATCCAGCACGTGGCGCCGCTCGAGGAGGGCCGAACAAAAACTCATCTCGAAGAGGATCTGAATAGCGCGT								
pST-RGe Teórica	1510							
pST-RGe T7For
pST-RGe BGHrc
TCATCATTTGA								
pST-RGe Teórica								
pST-RGe T7For
pST-RGe BGHrc
GAGTACCAAGCTC								

Figura 12: Alineamiento de la secuencia teórica de pST-RGe con las secuencias obtenidas con los oligonucleótidos T7For y BGHrev del clon 2 utilizando el programa BioEdit.

Como se observa en la figura 12, la secuenciación con ambos oligonucleótidos cubre la secuencia completa del fragmento del ectodomínio y mostró una alta homología con la secuencia teórica. Además, se observa un solapamiento entre las lecturas de ambos oligonucleótidos que asegura la exactitud de la secuencia en esa zona.

Por otra parte, se verificó que la secuencia amplificada de RGe tiene el marco de lectura correcto, se verifica que no existen inserciones ni delecciones de bases en la secuencia codificante y se observa la presencia de las secuencias de corte, secuencia señal y los epitopes.

Transfección de células HEK293T y expresión de RGe.

Se realizó una primera transfección de células HEK293T utilizando los plásmidos pST-RGe y pcDNA-GFP en placa de 12 pocillos. El vector pcDNA-GFP se utilizó como control de transfección y de expresión de las proteínas recombinantes ya que la proteína GFP está fusionada a las etiquetas *c-myc* y 6xHis.

A las 24 h post transfección se visualizaron las células con microscopio de fluorescencia y se corroboró la eficiencia de la transfección (figura 13) donde casi la totalidad de las células presentaban coloración verde otorgada por la expresión de GFP.

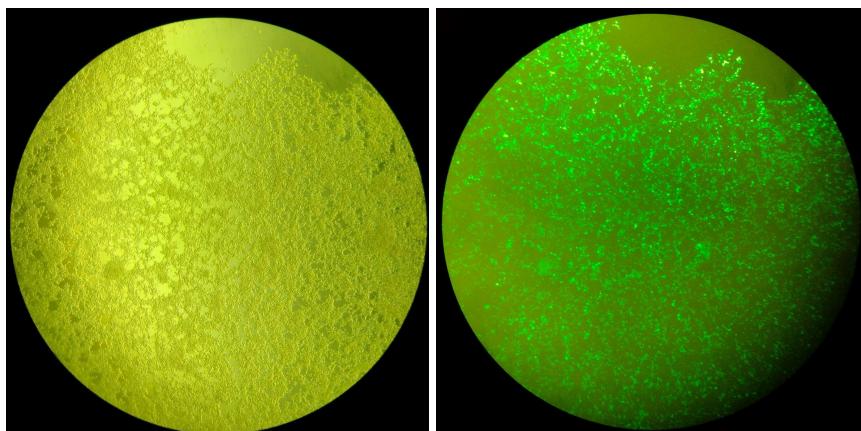


Figura 13: Control de eficiencia de transfección de células HEK 293T con el vector pcDNA-GFP. A la izquierda se observan las células con luz blanca y a la derecha, el mismo campo, con luz UV. Aumento 100X.

A las 48 y 72 h se colectaron por separado *pellet* y sobrenadante de las células transfectadas, los extractos proteicos se sometieron a electroforesis SDS-PAGE y transferencia a membrana de nitrocelulosa con el fin de detectar en un ensayo de *Western blot* las proteínas recombinantes utilizando un anticuerpo comercial que reconoce la etiqueta 6xHis.

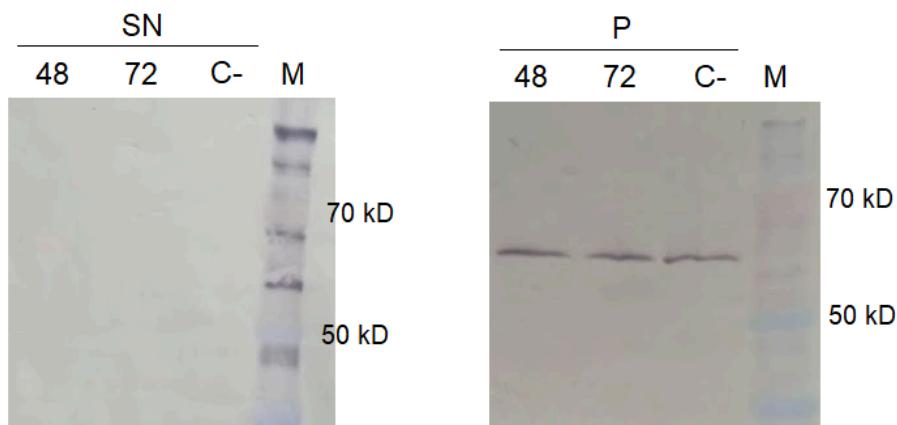


Figura 14: Análisis mediante Western blot del sobrenadante de transfección y del pellet celular utilizando anticuerpos anti-His. Se presentan los resultados para las muestras cosechadas a las 48 h y 72 h, el marcador de peso molecular (M) y el control negativo (células sin transfectar, C-). Las calles SN corresponden a las muestras del sobrenadante, mientras que las calles P indican las muestras del pellet. Ensayo realizado utilizando un anticuerpo anti-histidina, Pharmingen). M = 10-250 kDa (Inbio Highway).

En este primer análisis no se detectaron proteínas en los sobrenadantes de 48 y 72 h post transfección (figura 14). Por otro lado, se observó reacción inespecífica del Ac anti his contra proteínas celulares en las muestras del *pellet* del control sin transfectar. Por esto, se decidió evaluar la presencia de la proteína recombinante en las mismas muestras utilizando un Ac anti c-myc.

Al utilizar el anticuerpo anti *c-myc*, se identificó una banda del peso molecular esperado de la proteína RGe (aproximadamente 50 kDa) en las muestras de *pellet* de las células transfectadas con pST-RGe cosechadas a las 48 y 72 h (Figura 15). De acuerdo al vector de expresión utilizado, se esperaba que la proteína recombinante fuera secretada por las células transfectadas. Sin embargo, no se detectó la proteína RGe en el sobrenadante.

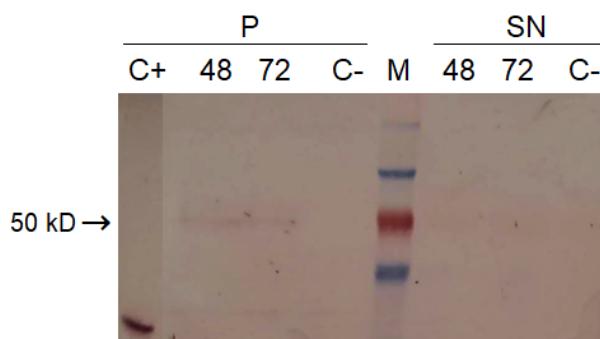


Figura 15: Análisis mediante Western blot del sobrenadante de transfección y del pellet celular utilizando anticuerpo anti c-myc. Se presentan los resultados para las muestras cosechadas a las 48 y 72 h, el marcador de peso molecular (M) y el control negativo (C-). Las calles SN corresponden a las muestras del sobrenadante, mientras que las calles P indican las muestras del pellet. C+: proteína control GFP-His (aprox. 27kDa). Ensayo realizado utilizando un anticuerpo anti c-myc (Invitrogen). M = Blue Plus 14-100 kDa (TransGen Biotech).

Dado que no se detectó la proteína RGe en el sobrenadante de las células HEK transfectadas con pST-RGe, y que la señal detectada en el pellet era muy débil, se llevaron a cabo dos procedimientos con los sobrenadantes para concentrar las muestra y así lograr visualizar la proteína de interés. El sobrenadante cosechado a las 48 y 72 h fue tratado con TCA, con el fin de concentrar las proteínas totales, o se utilizó resina Ni-NTA, para purificar las proteínas recombinantes que contienen la etiqueta 6xHis.

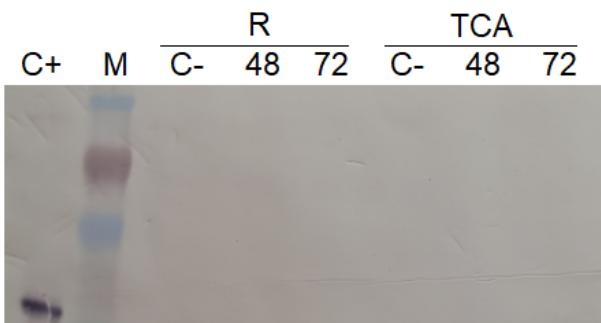


Figura 16: Análisis mediante *Western blot* del sobrenadante tratado con TCA o purificado con Ni-NTA utilizando anticuerpos anti c-myc. Se presentan las muestras cosechadas a las 48 y 72 h, el marcador de peso molecular (M) y el control negativo y positivo (C- y C+ -aprox. 27kDa-). Las calles R corresponden a las muestras purificadas con resina, mientras que las calles TCA indican las muestras tratadas con TCA. Ensayo realizado utilizando un anticuerpo anti c-myc (Invitrogen). M = Blue Plus 14-100 kDa (TransGen Biotech).

Al revelar la membrana con Ac anti *c-myc*, no se observó la presencia de la proteína RGe en ninguno de los SN tratados con TCA o purificados con resina Ni-NTA. Esto podría indicar que la proteína queda retenida en las células a pesar de tener el péptido señal, o que el nivel de expresión es demasiado bajo como para detectarla. Por lo tanto, se decidió repetir la transfección utilizando botellas T25 que contenían 6.25 veces más de células que los pocillos de las placas de 12 pocillos y se cosecharon pellet y SN a las 72 h.

Tal como se observa en la Figura 17, se confirmó la presencia de una banda del tamaño esperado (50 kDa) en la calle correspondiente al *pellet* de las células transfectadas con pST-RGe, mientras que no se visualizó reacción específica en el sobrenadante recolectado y tratado con TCA o resina Ni-NTA.

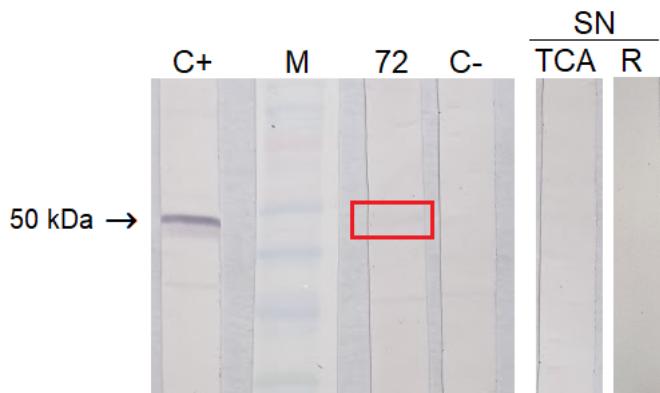


Figura 17: Análisis mediante *Western blot* de las muestras obtenidas de T25 utilizando anticuerpo anti *c-myc*. Se presentan los resultados para la muestra cosechada a las 72 h, el marcador de peso molecular (M), el control negativo (C-) y proteína recombinante fusionada a *c-myc* (C+) y los sobrenadantes de transfección tratados con TCA y con resina (R). Ensayo realizado utilizando un anticuerpo anti *c-myc* (Invitrogen). M = 10-250 kDa (Inbio Highway).

Extracción de RGe de la fracción celular.

Dado que la proteína de interés no se secreta o lo hace en cantidades mínimas, se llevó a cabo un ensayo para determinar las condiciones óptimas para la extracción de la proteína recombinante del *pellet* celular. Para ello, se realizó una nueva transfección de células HEK293T con el plásmido pST-RGe en placas de 12 pocillos (con 5.4×10^5 células/pocillo). Se incluyeron pocillos transfectados con el vector pcDNA-GFP como control de transfección y de expresión.

A las 24, 48 y 72 h post transfección se observaron las células transfectadas con pcDNA-GFP al microscopio de fluorescencia para verificar la eficiencia de la transfección (Figura 18) y se colectaron y trataron las muestras de *pellet* celular transfectado con pST-RGe como se detalla en la sección 7.3. de Materiales y Métodos.

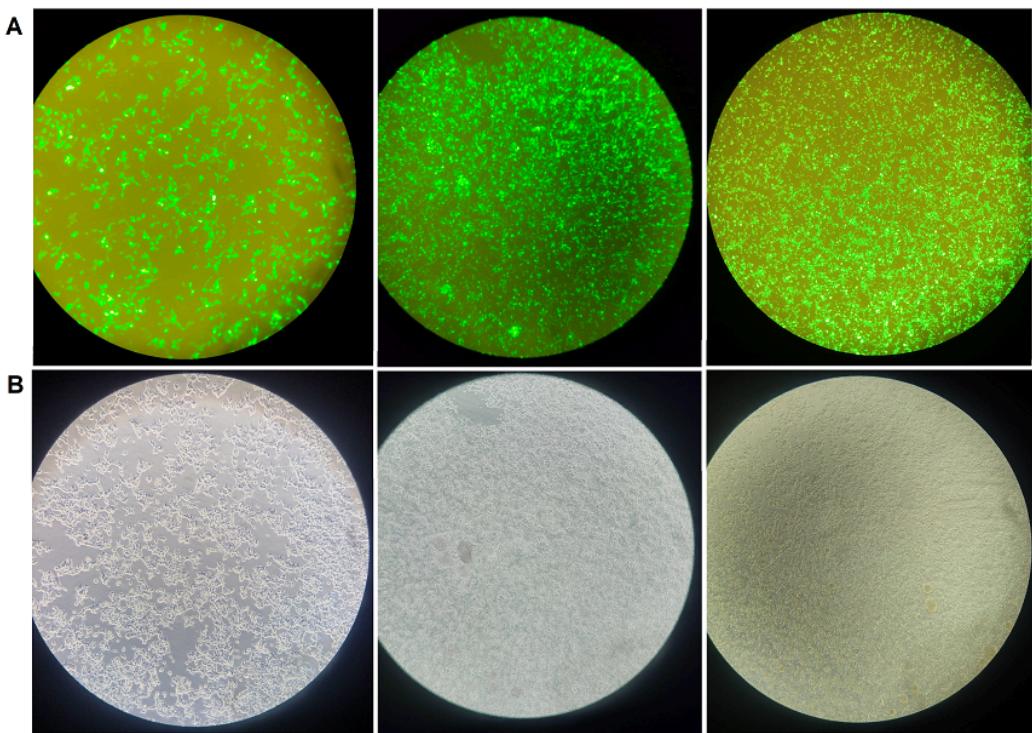


Figura 18: Control de eficiencia de transfección de células HEK 293T con el vector pcDNA-GFP. A) De izquierda a derecha se observan las células con luz UV a las 24, 48 y 72 h. B) De izquierda a derecha se observan las células con luz blanca a las 24, 48 y 72 h. Aumento 100X

En el *Western blot* de la figura 19 (panel B) se observa la presencia de una banda del peso molecular esperado para RGe (aproximadamente 50 kDa) en las muestras correspondientes a las células transfectadas con el plásmido pST-RGe y cosechadas a las 24 y 48 h (calles 1 y 2, respectivamente). Sin embargo, esta banda no se detecta a las 72 h (calle 3). Este resultado puede deberse a la masa total de proteínas sembradas en la calle 3. Efectivamente, al visualizar las proteínas totales de cada muestra utilizando tinción con rojoponceau (Figura 19 panel A), la cantidad de proteínas sembradas en la calle 3 es significativamente menor que en las primeras dos calles. Esta diferencia en la masa proteica total podría explicar la ausencia de detección de la RGe en la calle 3. De acuerdo con lo esperado, no se observa reacción específica en la calle de las células sin transfectar (calle 4).

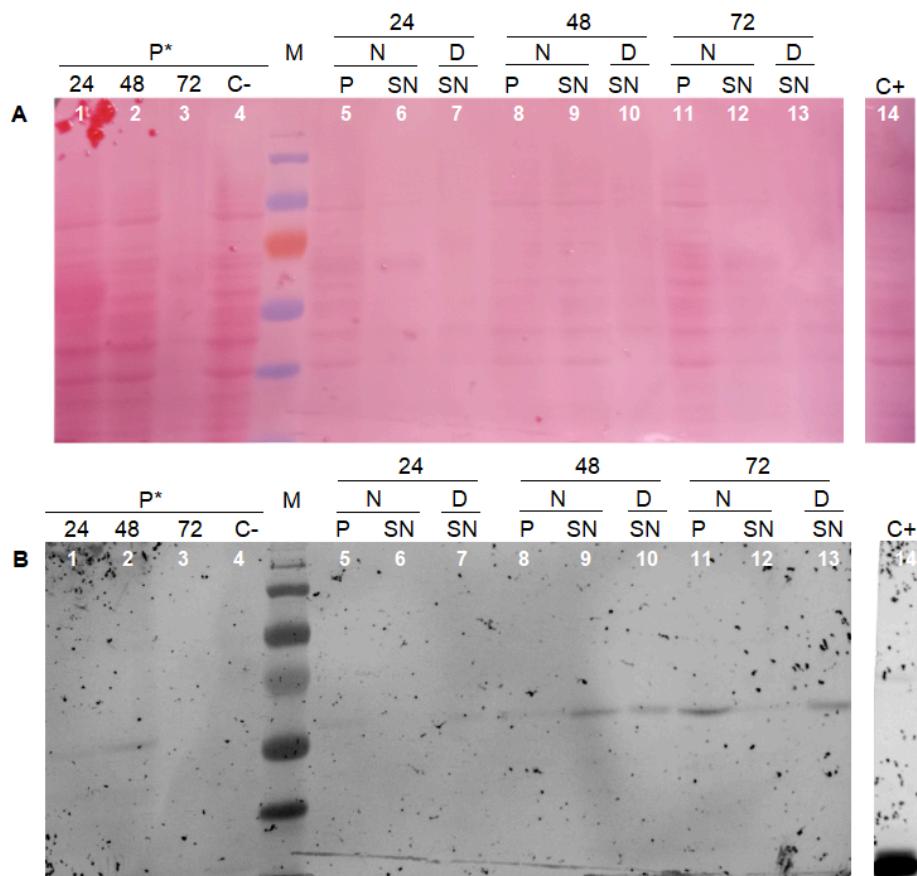


Figura 19: Detección de proteínas recombinantes en los *pellets* celulares del ensayo de transfección. **A)** Análisis mediante el tinte de proteínas (rojoponceau). **B)** Análisis mediante *Western blot* utilizando anticuerpo anti *c-myc* (Invitrogen). Se presentan los resultados para las muestras cosechadas a las 24, 48 y 72 h, el marcador de peso molecular (M), el control negativo (células sin transfectar, S/T) y el control positivo (C+). Las calles P* representan las muestras de *pellets* sin tratar, mientras que las calles N y D corresponden a los *pellets* tratados con los *buffers* nativo y desnaturalizante, respectivamente. En el caso de las muestras tratadas con el *buffer* nativo (N), se presentan tanto el *pellet* (P) como el sobrenadante (SN), mientras que para las muestras tratadas con el *buffer* desnaturalizante (D) se muestra únicamente el sobrenadante. M = 10-250 kDa (Inbio Highway)

Dado que la proteína de interés no se detecta en el SN de cultivo, se procedió a evaluar su solubilización a partir de los *pellets* celulares cosechados a las 24, 48 y 72 h usando un *buffer* nativo ó desnaturalizante. A partir de la calle 5, se analizan las muestras proteicas de los *pellets* tratados con los *buffers* nativo ó desnaturalizante. Según se observa en las calles 7, 10 y 13 la proteína recombinante logró extraerse con *buffer* desnaturalizante ya que se observa señal positiva en la fracción soluble de las muestras tratadas. Asimismo, es de destacar que se logró extraer del *pellet* celular la proteína RGe en condiciones nativas ya que se observa una banda del peso molecular esperado en las muestras del sobrenadante de las células tratadas con el *buffer* nativo (calles 6, 9 y 12).

Este ensayo no se utilizó para cuantificar en qué tiempo se obtiene la mayor cantidad de proteína de interés, sino para determinar cualitativamente si a todos los tiempos evaluados la proteína de interés permanece en el *pellet* celular y puede solubilizarse con *buffer* nativo. Si bien en el *Western blot* se observan bandas de diferente intensidad a cada tiempo de

cosecha, esto se debe fundamentalmente a las diferencias en la carga proteica sembrada en estas calles (como se evidencia en la membrana tratada con el tinte de proteínas).

En particular, al analizar las muestras de 24 h en el *Western blot*, se observa mayor intensidad de señal en el *pellet* de las células tratadas con el *buffer* nativo que en el SN (calles 5 y 6, respectivamente), por lo que se pensaría que la proteína no logró extraerse del *pellet* con el *buffer* nativo. Sin embargo, al analizar visualmente la membrana teñida con rojoponceau, la calle 5 presenta una mayor masa proteica que la calle 6, por eso en esta última se visualiza una banda muy tenue. Esto mismo sucede al analizar las muestras del tiempo 72 h donde se visualiza una banda de mayor intensidad en el *pellet* (calle 11) que en el SN (calle 12) luego del tratamiento con *buffer* nativo.

Por su parte, los resultados obtenidos con las muestras de 48 h se pueden interpretar más fácilmente dado que la masa proteica en la muestra de *pellet* y el SN es similar (calles 8 y 9, respectivamente). El *Western blot* revela que la proteína RGe es extraída en condiciones nativas, ya que casi la totalidad de la proteína se detecta en el SN.

Estos resultados confirman que el ectodominio de la glicoproteína se expresa en las células HEK293T, la cual queda retenida en el *pellet* celular y puede ser extraída en condiciones nativas.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

1. DISCUSIÓN.

La rabia es una zoonosis viral que afecta a todos los mamíferos e impacta en su sistema nervioso siendo mortal en la mayoría de los casos una vez aparecen los síntomas clínicos (Rabia, 2023). En el mundo, esta enfermedad es responsable de cerca de 60.000 muertes humanas anualmente y en la mayoría de los casos humanos, el perro es la fuente principal de transmisión (<https://www.paho.org/es/temas/rabia>). En Argentina, el último caso registrado de rabia humana se reportó en el año 2021, se trató de una variante de murciélagos insectívoros (*Tadarida brasiliensis*) que fue transmitida por un gato asilvestrado en la provincia de Buenos Aires (Ministerio de Salud Argentina, 2021).

Como se mencionó previamente, la rabia es una enfermedad inmunoprevenible, tanto en animales como en humanos y es precisamente la inmunización la estrategia fundamental para su control (Ministerio de Salud Argentina, 2024). Además, la medición de anticuerpos contra la rabia se vuelve esencial para su vigilancia permitiendo identificar animales que han sido infectados y evaluar la eficacia de la vacunación como método previo a la exposición (Servat *et al.* 2007). Si bien en nuestro país se utiliza ELISA para detectar la presencia y niveles de anticuerpos antirrábicos, pero éstos son importados, lo que aumenta considerablemente el costo de las pruebas.

En nuestro laboratorio, desarrollamos un ELISA indirecto *in house* que utiliza RABV inactivado y purificado como antígeno de tapizado (Del Médico Zajac, 2018). Este ELISA posee como desventajas que es necesario contar con instalaciones apropiadas para producir el virus, requiere el uso de animales para realizar los controles de la correcta inactivación del mismo, y se detecta gran variabilidad en el rendimiento de las purificaciones de antígeno al utilizar distintos *batchs* de RABV inactivado.

En este contexto, resulta de gran interés la expresión recombinante de la glicoproteína del RABV para ser utilizada como antígeno de ELISA para la detección de anticuerpos antirrábicos. Se han realizado muchos intentos de su expresión utilizando un sistema recombinante. La naturaleza glicosilada de esta proteína requiere un sistema eucariota para su expresión en lugar de un sistema procariótico que carece de maquinaria de glicosilación. De hecho, la expresión en sistemas procariotas resultó subóptima, ya que los anticuerpos policlonales generados en animales inmunizados con la vacuna RABV no lograron reconocer adecuadamente la proteína (Yelverton *et al.* 1983). En otros trabajos, utilizando células de insecto, células de mamíferos o plantas, se generaron formas

monoméricas y triméricas de la glicoproteína, demostrando que se conserva la estructura antigenica de la proteína (Prehaud *et al.*, 1989, Burger *et al.*, 1991, Klepfer *et al.*, 1993b, Ashraf *et al.*, 2005). Sin embargo, se observan diferencias en los tamaños de las proteínas producidas, lo cual refleja las disparidades en la glicosilación entre las células hospedadoras de insectos y mamíferos (Koraka *et al.*, 2014). Además, dado que la purificación de la proteína completa resultó compleja y en algunos casos de bajo rendimiento, surgió como estrategia expresar solo el ectodominio de la glicoproteína en forma secretada. En este sentido, existen reportes de su expresión en sistemas de células de insecto (Targovnik *et al.*, 2019), y células eucariotas (Koraka *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2020).

En este contexto, surge como línea de trabajo de nuestro laboratorio expresar y purificar la glicoproteína del virus rábico a partir de células eucariotas y evaluar su utilidad como antígeno de tapizado de un ELISA indirecto que permita determinar la presencia de anticuerpos antirrábicos en sueros de distintas especies. En particular, para esta Tesis de Licenciatura, se propuso expresar el ectodominio de la glicoproteína de RABV (RGe) en células eucariotas.

En este trabajo, la secuencia del ectodominio de la glicoproteína fue amplificada por PCR a partir del vector pCI-RG que posee la secuencia completa del gen que codifica para la glicoproteína del virus rábico, el cual se encontraba disponible en nuestro laboratorio.

Como los patrones de plegamiento y glicosilación de la proteína son importantes para su inmunogenicidad y secreción, los sistemas eucarióticos son los más apropiados para su expresión. Con este antecedente, en este trabajo se seleccionó para la expresión en células de mamífero el vector pSecTag2 y las células HEK293T, para asegurar la correcta glicosilación y la secreción de la proteína al medio extracelular utilizando la vía vacuolar del retículo endoplasmático.

El vector pSecTag2 aporta a la secuencia de interés un péptido señal de direccionamiento al retículo y también le aporta dos etiquetas, el epítope *c-myc* y un tracto de 6 histidinas (6xHis). Estas etiquetas permiten la detección de la proteína recombinante mediante anticuerpos comerciales y en el caso de 6xHis, facilita su purificación mediante su interacción con el ion Níquel inmovilizado en una resina. Además, el cassette de expresión se encuentra bajo el promotor fuerte derivado de Citomegalovirus (PCMV), por lo que se espera una alta tasa de transcripción de la secuencia de interés. Por otro lado, se seleccionaron las células HEK293T, porque a diferencia de otras líneas celulares, estas tienen una alta eficiencia de transfección.

El primer análisis por Western blot realizado con las muestras de *pellet* y sobrenadante de las células HEK293T transfectadas con pST-RGe, reveló reacción inespecífica del Ac anti his contra proteínas celulares, por lo que se descartó su uso en los subsiguientes ensayos. Posteriormente, al analizar las muestras utilizando un anticuerpo anti *c-myc* se logró identificar una banda del peso molecular esperado para la proteína recombinante RGe (aproximadamente 50 kDa) en las calles correspondientes a las muestras de *pellet* de las células transfectadas con pST-RGe. Sin embargo, no se observó una reacción positiva en los sobrenadantes de transfección. Dado que la señal detectada en el *pellet* era muy débil, podría ser que la proteína estuviera en el SN en concentraciones muy bajas que no fueron detectadas por la sensibilidad de la técnica. Por lo tanto, se decidió realizar dos procedimientos con los sobrenadantes para concentrar las muestras: una fracción del SN fue tratada con TCA para concentrar las proteínas totales, mientras que otra fracción fue sometida a purificación mediante resina Ni-NTA, con el fin de aislar las proteínas recombinantes que llevan la etiqueta 6xHis. Al analizar dichas muestras por *Western blot* con el Ac anti *c-myc* no se detectó la proteína recombinante en ellas. Por lo tanto, si bien las células transfectadas expresan la proteína de interés, ésta no es secretada o por lo menos no en cantidades detectables para el ensayo. Al repetir el ensayo de transfección utilizando mayor número de células (botella T25) con el fin de aumentar la masa total de proteínas, se observaron los mismos resultados.

El hecho de que en esta TL la proteína RGe quedara retenida en las células es sorprendente ya que el plásmido pSecTag2 aporta la secuencia señal para la exportación de la proteína y la secuenciación realizada sobre el pST-RGe no mostró ninguna modificación nucleotídica sobre la secuencia teórica del plásmido y el inserto, que pudiera modificar la secuencia proteica. Se han realizado investigaciones que abordan la expresión del ectodominio en el sobrenadante obteniendo resultados satisfactorios (Koraka *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2020). Aunque ambos trabajos coinciden con esta TL en el uso de células HEK293, se destacan diferencias importantes en las construcciones plasmídicas en comparación con este trabajo. En esta TL el vector de expresión posee la secuencia señal de la cadena de Igk murina y la secuencia del ectodominio que codifica desde el aa 32 al 456 de la proteína completa. Koraka *et al.* (2014) utilizan un vector de expresión que contiene el péptido señal CD5 y a continuación la secuencia del ectodominio (que abarca los aa 20 a 455), un *linker* de 7 aas, un dominio de trimerización y un *tag*. Por otro lado, Zhao *et al.* (2020) emplean tres fragmentos diferentes del ectodominio (desde el aa 20 al 233, del 20 al 368 y del 20 al 460) con el péptido señal de la glicoproteína. Las proteínas de menor tamaño quedan retenidas en la fracción intracelular mientras que detectan expresión muy baja con la proteína de mayor tamaño. Luego, realizan una nueva construcción plasmídica

utilizando el péptido señal de la cadena pesada de la IgG humana y la secuencia del ectodominio que codifica del aa 20 al 460 y detectan niveles elevados de la proteína recombinante en el sobrenadante. Estos resultados sugieren que las secuencias utilizadas son críticas para lograr la secreción del ectodominio de la glicoproteína.

Dado que la RGe queda retenida en las células, resulta crucial establecer las condiciones adecuadas para su extracción. Esto es especialmente importante cuando se emplean antígenos proteicos como inmunógenos o para detectar los anticuerpos generados por infección o vacunación. En tales casos, es fundamental que la proteína recombinante mantenga tanto la estructura como el perfil de glicosilación de la proteína viral nativa.

Para identificar en qué condiciones de trabajo puede ser extraída la proteína, se realizó una nueva transfección y los *pellets* celulares fueron sometidos a un tratamiento con *buffer* nativo o desnaturalizante. De esta manera, pudimos observar que la RGe recombinante podía ser recuperada en el sobrenadante de las células tratadas con *buffer* nativo. Si bien se observa que una fracción de RGe queda aún retenida en el *pellet*, esto puede deberse a que en el tratamiento solo se agregó el *buffer* nativo y se realizó ruptura de las células por cambio de temperatura. Es probable que al agregar un paso de sonicado del *pellet* celular y se adicione algún detergente suave en el *buffer* que ayude a desestabilizar las membranas celulares, pero no altere la estructura proteica, y así se aumente el rendimiento de extracción.

Basados en el diseño experimental de esta Tesis de Licenciatura se esperaba obtener el ectodominio de la glicoproteína en el sobrenadante de las células transfectadas de modo de facilitar el proceso de purificación de la misma. Sin embargo, la proteína RGe fue detectada en la fracción celular. La secuenciación del *cassette* de expresión evidenció la presencia del péptido señal para su secreción y confirmó la ausencia de errores en la secuencia. Sin embargo, la retención intracelular de la proteína sugiere la presencia de un mecanismo aún no dilucidado que impide su secreción. A pesar de esto, la proteína puede ser extraída del *pellet* en condiciones nativas, lo cual, como se comentó previamente, es óptimo para utilizarla como antígeno de reconocimiento de anticuerpos antirrábicos.

A futuro, se realizarán ensayos de transfección en soportes de cultivo celular de mayor tamaño (T75 o T175) para aumentar el número de células y se evaluarán distintos *buffers* de extracción nativa que optimicen el rendimiento. Posteriormente, se realizará la purificación de la proteína recombinante con la resina de Ni-NTA. Finalmente se analizará la reactividad de la RGe con sueros antirrábicos de distintas especies y se evaluará su uso como antígeno de ELISA.

De esta manera, contaremos con un antígeno recombinante, que no requiere instalaciones de bioseguridad para su producción, y que permite la optimización del proceso de obtención para asegurar reproducibilidad entre lotes, como insumo para el desarrollo de un ELISA de producción nacional que permita detectar anticuerpos antirrábicos en sueros de distintas especies.

2. CONCLUSIONES.

- El ectodominio de la glicoproteína del RABV se expresa de forma transitoria en células HEK293T y queda retenida en las células.
- La proteína recombinante puede ser extraída de la fracción intracelular en condiciones nativas.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Ashraf, S., Singh, P. K., Yadav, D. K., Shahnawaz, M., Mishra, S., Sawant, S. V., & Tuli, R. (2005). High level expression of surface glycoprotein of rabies virus in tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice. *Journal of Biotechnology*, 119(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2005.06.009>
- Astray, R. M., Jorge, S. A. C., & Pereira, C. A. (2017). Rabies vaccine development by expression of recombinant viral glycoprotein. In *Archives of Virology* (Vol. 162, Issue 2, pp. 323–332). Springer-Verlag Wien. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-3128-9>
- Burger, S. R., Remaley, A. T., Danly, J. M., Moore, J., Muschel, R. J., Wunner, W. H., & Spitalnik, S. L. (1991). Stable expression of rabies virus glycoprotein in Chinese hamster ovary cells. *Journal of General Virology*, 72(2), 359–367. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-2-359/CITE/REFWORKS>
- Cliquet F, Aubert M, Sag L (1998) Development of a fluorescent anti-body virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. 212:79–87. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(97\)00212-3](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(97)00212-3)
- Cox, J. H., Dietzschold, B., & Schneider, L. G. (1977). Rabies virus glycoprotein. II. Biological and serological characterization. *Infection and Immunity*, 16(3), 754-759. <https://doi.org/10.1128/IAI.16.3.754-759.1977>
- Del Médico, Z., Garanzini, D., Jurado, R., Pérez, O., & Calamante, G. (2018). Development of an indirect ELISA based on purified, inactivated rabies virus as a first step to evaluate immune response induced by recombinant anti-rabies vaccines. *XXIX Conferencia Internacional Rabies In The Americas (RITA)*.
- Del Médico Zajac, M. P., Garanzini, D., Pérez, O. R., & Calamante, G. (2019). Recombinant veterinary vaccines against rabies: State of art and perspectives. *Emerging and Reemerging Viral Pathogens: Volume 2: Applied Virology Approaches Related to Human, Animal and Environmental Pathogens*, 225-242. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814966-9.00012-3>
- Ertl, H. C. J. (2020). Next generation of rabies vaccines. *Rabies: Scientific Basis of the Disease and Its Management, Fourth Edition*, 509-526. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818705-0.00015-7>

- Fernando, B. G., Yersin, C. T., José, C. B., & Paola, Z. S. (2016). Predicted 3D Model of the Rabies Virus Glycoprotein Trimer. *BioMed Research International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1674580>
- Fisher, C. R., Streicker, D. G., & Schnell, M. J. (2018). The spread and evolution of rabies virus: Conquering new frontiers. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 16, Issue 4, pp. 241–255). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.11>
- Flint, J., Racaniello, V., Skalka, A. M., Rall, G., & Enquist, L. (2015a). *Principios de Virología* (4.a ed., Vol. 1).
- Fontana, D., Kratje, R., Etcheverrigaray, M., & Prieto, C. (2015). Immunogenic virus-like particles continuously expressed in mammalian cells as a veterinary rabies vaccine candidate. *Vaccine*, 33(35), 4238–4246. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2015.03.088>
- Fontana, D., Rodriguez, M. C., Garay, E., Russo, S., & Prieto, C. (2020). Optimization and validation of a blocking ELISA for quantitation of anti-rabies immunoglobulins in multispecies sera. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(9), 4127–4139. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10490-6>
- Garanzini, D. P. (2021). Estrategias de inmunoprofilaxis para la prevención de la rabia mediante la utilización de vectores virales no replicativos recombinantes. FFyB – UBA.
- Garanzini, D. P., Del Médico Zajac, M. P., Pérez, O. R., & Calamante, G. (2015). Obtención de vectores no replicativos para la expresión in vivo de la glicoproteína del virus rábico.
- Gupta PK, Sharma S, Walunj SS, Chaturvedi VK, Raut AA, Patial S et al (2005) Immunogenic and antigenic properties of recombinant soluble glycoprotein of rabies virus. *Vet Microbiol* 108:207–214. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.04.007>
- Hanahan, D. 1985. “Techniques for Transformation of Escherichia Coli.” In *DNA Cloning: A Practical Approach*, Vol. 1, edited by D.M Glover, 109–35. Oxford. IRL Press.
- Katz, I. S. S., Guedes, F., Fernandes, E. R., & dos Ramos Silva, S. (2017). Immunological aspects of rabies: a literature review. *Archives of Virology* 2017 162:11, 162(11), 3251–3268. <https://doi.org/10.1007/S00705-017-3484-0>
- Klepfer, S. R., Debouck, C., Uffelman, J., Jacobs, P., Bollen, A., & Jones, E. V. (1993). Characterization of rabies glycoprotein expressed in yeast. *Archives of Virology*, 128(3–4), 269–286. <https://doi.org/10.1007/BF01309439/METRICS>

- Koraka, P., Bosch, B. J., Cox, M., Chubet, R., Amerongen, G. van, Lövgren-Bengtsson, K., Martina, B. E. E., Roose, J., Rottier, P. J. M., & Osterhaus, A. D. M. E. (2014). A recombinant rabies vaccine expressing the trimeric form of the glycoprotein confers enhanced immunogenicity and protection in outbred mice. *Vaccine*, 32(36), 4644–4650. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.06.058>
- Korimbocus J, Dehay N, Tordo N, Cano F, Morgeaux S (2016) Development and validation of a quantitative competitive ELISA for potency testing of equine anti rabies sera with other potential use. *Vaccine* 34:3310–3316. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.04.086>
- Kuzmin, I. v., & Rupprecht, C. E. (2008). Rabies Virus. *Encyclopedia of Virology*, 367–373. <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00482-9>
- Lafon, M. (2013). Immunology. *Rabies: Scientific Basis of the Disease and Its Management*, 387-408. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396547-9.00010-9>
- Li, Q., Yan, R., Bai, N., Tan, Z., Yu, Q., Su, H., Wei, X., Li, A., Chen, X., Li, Z., He, Y., Li, H., Li, X., & Mao, Y. (2023). Immunogenicity and Antigenicity of the Ectodomain of Rabies Virus Glycoprotein Stably Expressed in HEK293T Cells. *International Journal of Medical Sciences*, 20(10), 1282–1292. <https://doi.org/10.7150/ijms.87134>
- Ministerio de Salud Argentina. (2018). *Guía para la prevención, vigilancia y control de la rabia en Argentina*.
- Ministerio de Salud Argentina. (2021). *Alerta Epidemiológica: Caso de rabia humana variante murciélagos: Provincia de Buenos Aires*.
- Ministerio de Salud Argentina. (2024). *Boletín epidemiológico nacional*.
- Picotto LD, Sguazza GH, Tizzano MA, Galosi CM, Cavalitto SF, Pecoraro MR (2017) An efective and simplified DO-stat control strategy for production of rabies glycoprotein in *Pichia pastoris*. Protein Expr Purif 132:124–130. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.02.004>
- Prehaud, C., Takehara, K., Flamand, A., & Bishop, D. H. L. (1989). Immunogenic and protective properties of rabies virus glycoprotein expressed by baculovirus vectors. *Virology*, 173(2), 390–399. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90551-5](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90551-5)
- Qian W, Aguilar F, Wang T, Qiu B (2013) Secretion of truncated recombinant rabies virus glycoprotein with preserved antigenic properties using a co-expression system in *Hansenula polymorpha*. J Microbiol 51:234–240. <https://doi.org/10.1007/s12275-013-2337-0>

- Servat, A., Feyssaguet, M., Blanchard, I., Morize, J. L., Schereffer, J. L., Boue, F., & Cliquet, F. (2007). A quantitative indirect ELISA to monitor the effectiveness of rabies vaccination in domestic and wild carnivores. *Journal of Immunological Methods*, 318(1–2), 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.JIM.2006.07.026>
- Sissoëff, L., Mousli, M., England, P., & Tuffereau, C. (2005). Stable trimerization of recombinant rabies virus glycoprotein ectodomain is required for interaction with the p75NTR receptor. *Journal of General Virology*, 86(9), 2543–2552. <https://doi.org/10.1099/VIR.0.81063-0/CITE/REFWORKS>
- Smith JS, Yager PA, Baer GM (1973) A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. *Bull World Health Organ* 48:535–541
- Targovnik, A. M., Ferrari, A., Mc Callum, G. J., Arregui, M. B., Smith, I., Bracco, L. F., Alfonso, V., López, M. G., Martínez-Solís, M., Herrero, S., & Miranda, M. V. (2019). Highly efficient production of rabies virus glycoprotein G ectodomain in Sf9 insect cells. *3 Biotech*, 9(11). <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1920-4>
- Tordo, N., Poch, O., Ermine, A., Keith, G., & Rougeon, F. (1986). Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(11), 3914-3918. <https://doi.org/10.1073/PNAS.83.11.3914>
- van Oers MM (2011) Opportunities and challenges for the baculovirus expression system. *J Invertebr Pathol* 107:S3–S15. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.05.001>
- Wasniewski, M., & Cliquet, F. (2012). Evaluation of ELISA for detection of rabies antibodies in domestic carnivores. *Journal of Virological Methods*, 179(1), 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.10.019>
- Wiktor, T. J., Macfarlan, R. I., Reagan, K. J., Dietzschold, B., Curtis, P. J., Wunner, W. H., Kieny, M. P., Lathe, R., Lecocq, J. P., & Mackett, M. (1984). Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(22), 7194-7198. <https://doi.org/10.1073/PNAS.81.22.7194>
- Yelverton E, Norton S, Obijeski JF, Goeddel DV (1983) Rabies virus glycoprotein analogs: biosynthesis in *Escherichia coli*. *Science* 219:614–620. <https://doi.org/10.1126/science.6297004>
- Zanetti, F., Rudak, L., Micucci, M., Conte Grand, D., Luque, A., Russo, S., Taboga, O., Pérez, O., & Calamante, G. (2012). Obtención y Evaluación Preliminar de Un Virus

Canarypox Recombinante Como Candidato a Vacuna Antirrábica. *Revista Argentina de Microbiología* 44, 75-84.

Zhao, R., Shan, Y., Li, M., Lou, Z., Feng, Y., Huang, L., Ren, W., Wang, P., Sun, Y., Sun, Y., Su, J., Sun, H., Hong, D., Li, Y., Chen, R., & Sun, L. (2020). Novel strategy for expression and characterization of rabies virus glycoprotein. *Protein Expression and Purification*, 168. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2019.105567>