



Tesina de grado

Licenciatura en Bioquímica

Facultad de Ciencias, Universidad de la República

**Optimización de la expresión de la proteína
ToIC recombinante de *Moraxella bovis*,
principal agente etiológico de la
Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina**

Bach. María Fernanda Ramos Arangüena

Tutora: Dra. Ana Umpiérrez

Co-tutor: Dr. Pablo Zunino

Departamento de Microbiología

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

2022

Agradecimientos

A la enseñanza pública que me permitió formarme como persona y profesional.

A la Dra. Ana Umpiérrez y el Dr. Pablo Zunino por abrirme las puertas del laboratorio y permitirme llevar adelante esta tesina.

A las personas que integran el Departamento de Microbiología del IIBCE (la colonia), las cuales fueron importantes en mi crecimiento personal y profesional.

A Anto Alba, mi hermana del alma que, sin su ayuda, sus comentarios y su apoyo desde los 16 años, este camino hubiera sido gris.

A mis amigos, El Oscuro, El Nene, Vale, Cari, Belén, a los que integrantes de los grupos de WhatsApp: “trifulca de verdad”, “West coast” y “Valizas allá vamos” que sin su apoyo este camino hubiera sido imposible.

A mi familia, a la que está y aquellos que ya no, que su sostén, apoyo, preocupación y amor ayudó a que en todos los momentos de mi vida NUNCA me sintiera sola. En especial a mis sobrinos: Alem, Ileana, Isabella y Santino cuya risa y luz me dan fuerzas día a día.

En especial quiero dedicar todo este trabajo a mis padres, Fernando y María del Carmen, son un pilar fundamental en mi vida, son los que NUNCA dudaron de mis capacidades y sin su amor incondicional NUNCA hubiera llegado tan lejos.

| Índice | Páginas |
|---|---------|
| ÍNDICE | 3 |
| RESUMEN | 5 |
| INTRODUCCIÓN | 6 |
| 1. Queratoconjuntivitis infecciosa bovina (QIB)..... | 6 |
| 2. Signos Clínicos..... | 7 |
| 3. Agentes etiológicos y factores ambientales..... | 8 |
| 3.1 <i>Moraxella bovis</i> | 9 |
| 4. Factores de virulencia de <i>M. bovis</i> | 10 |
| 4.1 Fimbrias..... | 10 |
| 4.2 Sistemas de adquisición de hierro..... | 12 |
| 4.3 Citotoxina..... | 12 |
| 4.4 Proteínas de membrana externa..... | 13 |
| 5. Tratamiento y prevención de la enfermedad..... | 15 |
| 5.1 Vacunas para prevenir QIB..... | 15 |
| 5.2 Proteínas recombinantes para el desarrollo de vacunas..... | 16 |
| HIPÓTESIS | 18 |
| OBJETIVOS | 18 |
| Objetivo General..... | 18 |
| Objetivos Específicos..... | 18 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 19 |
| Antecedentes de este trabajo – generación de TolC recombinante..... | 19 |
| Cepa bacteriana y condiciones de cultivo..... | 21 |
| Extracción del plásmido y digestión con enzimas de restricción..... | 21 |
| Electroforesis en gel de agarosa..... | 22 |
| Secuenciación del plásmido pET-TolCr..... | 22 |
| Optimización de la expresión de TolCr..... | 23 |

| | |
|---|-----------|
| Evaluación de la solubilidad de TolCr..... | 24 |
| Purificación de TolCr en condiciones desnaturizantes..... | 24 |
| Electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)..... | 25 |
| Cuantificación de la concentración de TolCr..... | 26 |
| RESULTADOS..... | 28 |
| Identidad de la proteína TolCr recombinante..... | 28 |
| Optimización de la expresión de TolCr..... | 29 |
| Evaluación de la solubilidad, purificación y cuantificación de TolCr..... | 31 |
| DISCUSIÓN..... | 33 |
| CONCLUSIÓN..... | 38 |
| PERSPECTIVAS..... | 38 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 39 |

RESUMEN

La Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina (QIB) es la enfermedad infecciosa ocular más común que afecta a todas las razas de ganado y es altamente contagiosa. Sus síntomas pueden variar desde ulceración y edema corneal, fotofobia y lagrimeo a perforación corneal y ceguera en casos graves. El principal agente etiológico causante de QIB es *Moraxella bovis*, perteneciente a la familia *Moraxellaceae*. *M. bovis* presenta diferentes factores de virulencia, entre los que se encuentran las fimbrias, los sistemas de adquisición de hierro, citotoxina β -hemolisina (MbxA) y proteínas de membrana externa. Además de las repercusiones en la salud de los bovinos, esta enfermedad presenta un importante impacto económico, asociado a los gastos en tratamientos y al retraso en el crecimiento de los animales.

El tratamiento de la QIB incluye la antibioticoterapia y para la prevención existen vacunas. En el caso de los antibióticos su aplicación debe ser constante, lo que dificulta su empleo de forma rutinaria y es conveniente realizar pruebas de sensibilidad antes de la aplicación debido a la generación de microorganismos resistentes. La vacunación es otra estrategia muy utilizada. Existen actualmente varias vacunas comerciales dirigidas a prevenir el desarrollo de la enfermedad, muchas de las cuales son bacterinas (es decir, elaboradas en base a bacterias enteras inactivadas) de diferentes cepas de *Moraxella* spp. Si bien su uso es generalizado en rodeos donde ocurren brotes de QIB, proporcionan una protección parcial, justificado principalmente por la variabilidad antigénica entre las cepas causantes de los brotes y las que se encuentran en los preparados.

Una estrategia para mejorar las vacunas existentes consiste en la incorporación de antígenos recombinantes. Las proteínas de membrana externa (PMEs), además de ser inmunogénicas son conservadas entre cepas, por lo que se las considera un potencial blanco para generar nuevas vacunas. La PME TolC de *M. bovis* tiene un papel en la exportación de distintas moléculas a través de la membrana externa de bacterias Gram negativas y es conservada entre cepas.

El objetivo de este trabajo consistió en optimizar las condiciones de expresión de la proteína recombinante TolC (TolCr) de *M. bovis* a escala de cultivo de laboratorio. Se evaluó una construcción plasmídica que presentaba el gen que codifica para TolC generada previamente en el laboratorio y se optimizó su expresión. Las condiciones óptimas de expresión de TolCr se obtuvieron cultivando la cepa recombinante a 30°C con una inducción de 3h. Se determinó que la misma se expresa de forma insoluble, obteniéndose una concentración final de 23,9 mg/mL.

INTRODUCCIÓN

1. Queratoconjuntivitis infecciosa bovina (QIB)

La Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina (QIB) es la enfermedad infectocontagiosa ocular más común que afecta al ganado (Brown *et al.*, 1998). Sus síntomas pueden variar desde ulceración y edema de la córnea (Fig. 1), dolor ocular, fotofobia y lagrimeo (Angelos *et al.*, 2007) hasta casos graves como perforación corneal y ceguera (Brown *et al.*, 1972).



Figura 1. La extensión de una úlcera corneal se revela después de la tinción con fluoresceína (Alexander *et al.*, 2010)

La QIB es altamente contagiosa, todas las razas de ganado pueden verse afectadas y se observa una mayor prevalencia en los machos y en animales más viejos, los cuales poseen mayor susceptibilidad a contraer la enfermedad. Esto se ve influenciado en gran medida por la composición genética y el estado inmune del animal (Arnold *et al.*, 2012).

El principal agente etiológico causante de la enfermedad es *Moraxella bovis* (Pugh *et al.*, 1969), aunque estudios posteriores han relacionado otra especie perteneciente a la familia *Moraxellaceae*, *Moraxella bovoculi* (Angelos *et al.*, 2010). Ambas especies bacterianas se han detectado en diversos países del mundo, Estados Unidos (Angelos *et al.*, 2007), Australia (Gould *et al.*, 2013), Israel (Yeruham *et al.*, 2001) y Reino Unido (Bennett, 2003). En América latina se reporta frecuentemente en Brasil (Libardoni *et al.*, 2012) y también se ha reportado en nuestro país por integrantes de nuestro laboratorio (Sosa *et al.*, 2012; 2013).

Aunque es una enfermedad raramente fatal, se la considera la enfermedad ocular más importante del ganado en todo el mundo (Postma *et al.*, 2008). Las tasas de prevalencia de QIB se estiman por clima y región geográfica teniendo en cuenta la raza y la edad del ganado. La prevalencia estimada de QIB en el ganado de carne en todo el mundo es del 2,78% (Dennis *et al.*, 2021). Debido a que pocos países informan las estadísticas nacionales sobre la QIB, es probable que sea una de las principales enfermedades del ganado no notificadas o mal informadas en todo el mundo (Dennis *et al.*, 2021).

La QIB presenta un gran impacto económico en la ganadería debido a que produce una disminución del peso en los animales infectados, aumento de los costos asociados al tratamiento farmacológico repetitivo y una reducción en la producción de leche en los animales lecheros (Baptista *et al.*, 1979; McConnel *et al.*, 2007). En países donde tiene una incidencia elevada como Australia, en 2006 se estimaron que las pérdidas económicas asociadas a la disminución de la producción y al tratamiento del ganado alcanzaron los 23 millones de dólares (Sackett *et al.*, 2006). Asimismo, en 1976 en Estados Unidos se detectaron más de 10 millones de terneros afectados por QIB, con una pérdida económica estimada anual de 226 millones de dólares, estimando que los costos oscilaron entre 25 y 82 dólares por cabeza de ganado (Hansen, 2001). En el Reino Unido, en un estudio realizado en 1996, se estimó una pérdida de 3,9 a 10,4 millones de dólares por año, que incluía costos asociados a las pérdidas en la producción, a los asociados al tratamiento y a la prevención de la enfermedad (Bennett, 2003).

En Uruguay la QIB es detectada con frecuencia (Sosa *et al.*, 2012; 2013), pero no existe una estimación de las pérdidas que esta enfermedad produce. La ganadería es una actividad relevante para el país, siendo el primer país del mundo en consumo de carne vacuna por persona. Además produce cerca de 550 mil toneladas de carne vacuna al año, 180 mil para el consumo interno y 370 mil para exportación (Instituto Nacional de Carnes, 2021).

2. Signos clínicos

La QIB es una enfermedad que afecta principalmente a la córnea. Puede inicialmente dañar un sólo ojo, pero generalmente una vez que se inicia la infección se genera el contagio cruzado hacia el otro. Los signos clínicos pueden manifestarse desde un día hasta 2 semanas después de la infección (Arnold *et al.*, 2012), se caracterizan por un desbordamiento temprano de lágrimas en la cara, secreción que se vuelve purulenta y párpados hinchados y edematosos. Posteriormente la evolución de la infección

generalmente llega al centro de la córnea, pudiéndose extender a todo el ojo (Baptista *et al.*, 1979). Esto puede acompañarse de fotofobia y generar dolor excesivo, lo que desencadena una disminución del apetito en el ganado enfermo (Arnold *et al.*, 2012). En general, los casos leves pueden resolverse espontáneamente sin tratamiento en una o dos semanas después de la infección (Baptista *et al.*, 1979). En los casos más complejos, que no se resuelven solos, los signos pueden progresar a edema corneal, tornando al ojo opaco; mientras que en los casos más graves puede generar ceguera (Brown *et al.*, 1998) y perforación corneal con pérdidas irreversibles, teniendo como una posible consecuencia la enucleación (pérdida del contenido de los ojos) (Alexander *et al.*, 2010).

3. Agentes etiológicos y factores ambientales

La QIB es una enfermedad infectocontagiosa multifactorial en la cual pueden participar distintos microorganismos, así como también existen factores ambientales y genéticos que predisponen a la enfermedad. Entre los agentes etiológicos más frecuentemente asociados a la QIB encontramos a *M. bovis*, *M. bovoculi*, y en menor medida se detecta a *Moraxella ovis*, *Mycoplasma* spp. y *Chlamydomphila* spp. (Brown *et al.*, 1972; Baptista *et al.*, 1979; Brown *et al.*, 1998; Arnold *et al.*, 2012). Otros agentes etiológicos involucrados en la QIB son algunos virus, como por ejemplo el Herpes Virus Bovino Tipo 1 (BHV-1), responsable de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) (Brown *et al.*, 1972; Baptista *et al.*, 1979; Brown *et al.*, 1998; Arnold *et al.*, 2012). Una infección primaria por dicho virus puede crear el entorno adecuado para una infección ocular o aumentar la gravedad de la misma, por lo que se la considera un factor predisponente de la QIB (Arnold *et al.*, 2012). Además de los agentes etiológicos, existen diversos factores ambientales que contribuyen a la predisposición y propagación de la QIB, entre los que se encuentra la mosca de la cara, *Musca autumnalis* (Fig. 2) que irrita la superficie ocular de los bovinos cuando se alimenta de secreciones (Arnold *et al.*, 2012) y actúa como un vector mecánico, ya que puede albergar microorganismos en sus alas y patas hasta tres días, permitiendo así el contagio de animales infectados a no infectados (Brown *et al.*, 1972; Brown *et al.*, 1998; Arnold *et al.*, 2012).



Figura 2. Mosca de la cara presentes en un bovino (Alexander *et al.*, 2010)

Otro de los factores ambientales relevantes es la estación del año, ya que en primavera y en verano existe un incremento en la radiación UV (Brown *et al.*, 1998), lo que genera un daño a las células epiteliales presentes en la córnea, y crea un ambiente propicio para la multiplicación bacteriana (Baptista *et al.*, 1979; Arnold *et al.*, 2012).

Además, debe tenerse en cuenta el manejo del ganado, el estrés cuando se desteta a la cría, el transporte en un mismo establecimiento o hacia otro, la mala nutrición, los parásitos y el clima, todos estos son considerados factores que pueden impactar en la salud general del animal y pueden disminuir la respuesta inmunitaria del ganado ante los patógenos (Arnold *et al.*, 2012).

Como se mencionó, las especies mayoritarias causantes de QIB son *M. bovis* y *M. bovoculi*. Ambas se encuentran muy cercanas filogenéticamente (Angelos *et al.*, 2007), pudiendo diferenciarse por unas pocas pruebas bioquímicas (actividad fenilalanina y gelatinasa) y por diferencias en las secuencias nucleotídicas de genes *housekeeping* y de los que codifican para el ARNr 16S (Angelos *et al.*, 2007). En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, y gracias a análisis moleculares se pudo identificar por primera vez a *M. bovoculi* en nuestro país, determinándose que esta especie circula desde 1983 en Uruguay (Sosa *et al.*, 2012).

3.1 *Moraxella bovis*

M. bovis es un cocobacilo Gram negativo, pertenece a la familia *Moraxellaceae*, dentro de la clase Proteobacteria (Rossau *et al.*, 1991; Pettersson *et al.*, 1998). Las principales características bioquímicas que posee son: oxidasa positiva, no reductor de nitratos a nitritos y no fermentador de carbohidratos (Fraser *et al.*, 1979).

La primera vez que un investigador asoció un cocobacilo Gram negativo con la QIB fue en 1915 (Mitter *et al.*, 1915). Posteriormente, en 1969, se relacionó a *M. bovis* como el principal agente etiológico causante de la enfermedad (Pugh *et al.*, 1969).

El ganado es el único reservorio conocido de este microorganismo, encontrándose en los ojos y las fosas nasales del ganado infectado. Inicialmente se propuso que existían animales portadores, los cuales tenían *M. bovis* en sus ojos sin presentar signos de problemas oculares (Baptista *et al.*, 1979). Estudios posteriores permitieron proponer a *M. bovis* como un patógeno oportunista, debido a que se encuentra en la conjuntiva y secreciones de animales sanos sin signos ni historial de infección (Postma *et al.*, 2008; Arnold *et al.*, 2012).

4. Factores de virulencia de *M. bovis*

La virulencia de *M. bovis* varía entre cepas, así como entre diferentes aislamientos de la misma cepa (Postma *et al.*, 2008). Entre sus factores de virulencia más estudiados se encuentran las fimbrias, los sistemas de adquisición de hierro, la citotoxina: β -hemolisina (MbxA), proteínas de membrana externa (PMEs) y diferentes enzimas hidrolíticas y proteolíticas (Frank *et al.*, 1981; Fenwick *et al.*, 1996; Postma *et al.*, 2008). En particular, se ha determinado que 2 factores son esenciales para causar la enfermedad clínica: la fimbria tipo IV, que se expresa en la superficie celular de la bacteria (Pedersen *et al.*, 1972) y la citotoxina β -hemolisina, la cual se secreta y es corneotóxica y leucotóxica (Beard *et al.*, 1994; Angelos, 2015).

4.1 Fimbrias

Las fimbrias (pili) son apéndices delgados y largos que se encuentran presentes en la superficie de varias especies de bacterias Gram negativas (Fig. 3a), algunas Gram positivas y en algunas especies de hongos (Simpson *et al.*, 1976). Las fimbrias presentes en *M. bovis* se clasifican como fimbrias de tipo IV, poseen una región N-terminal con el primer residuo de la proteína madura inusual, N-metilfenilalanina, seguido de una secuencia amino-terminal. La región C-terminal está compuesta por residuos hidrofóbicos y forma una estructura de láminas beta alrededor de la cual se disponen secuencias hidrófilicas más variables que determinan el perfil inmunológico (Dalrymple *et al.*, 1987). Estas fimbrias poseen una ubicación polar en las células lo que les permite generar la movilidad bacteriana conocida como *twitching* (Dalrymple *et al.*, 1987).

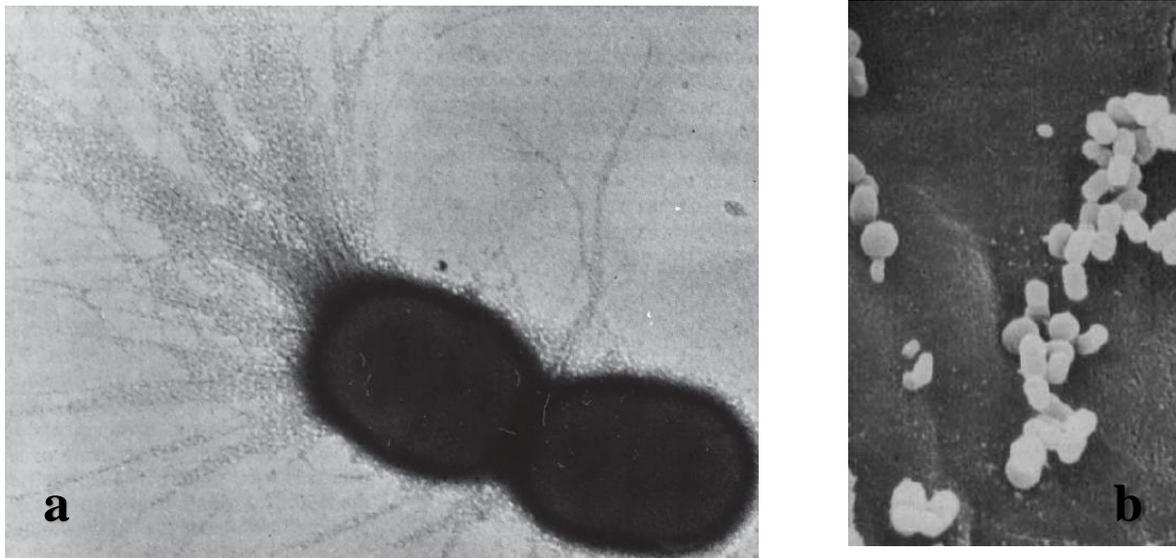


Figura 3. Fimbrias de *M. bovis*. (a) Micrografía electrónica de transmisión. *M. bovis* mostrando numerosas fimbrias en los extremos polares de la célula bacteriana, 23.300X (Annuar *et al.*, 1985). (b) Micrografía electrónica de barrido. Adherencia de *M. bovis* al epitelio corneal (Jackman *et al.*, 1984).

En 1972 se realizó el primer estudio que relacionó la presencia de fimbrias con la capacidad de *M. bovis* de colonizar la mucosa conjuntival, observándose que cumplen un rol de adherencia a la mucosa del ojo bovino, y que son importantes para el desarrollo de una infección ocular persistente (Fig. 3b) (Pedersen *et al.*, 1972). Además se comprobó que podrían ser responsables de producir los signos clínicos de la enfermedad, ya que terneros inoculados con *M. bovis* conteniendo fimbrias desarrollaron signos clínicos de QIB, mientras que terneros inoculados con *M. bovis* que no expresaban fimbrias no desarrollaron la enfermedad (Jayappa *et al.*, 1986).

Más recientemente, y por medio de análisis moleculares, se ha identificado que existen 2 tipos de fimbrias de *M. bovis*, las cuales se denomina Q (16 kDa, previamente llamada β) e I (18 kDa, anteriormente nombrada α) (Marrs *et al.*, 1988; Postma *et al.*, 2008). La variación entre la expresión génica de una u otra está asociada a cambio de fases, con una inversión de aproximadamente 2 kilobases de ADN, que genera una recombinación de sitio específica dentro de la región codificante del gen de la fimbria (Marrs *et al.*, 1988; Postma *et al.*, 2008). En cuanto a la función que cumplen, y de acuerdo a ensayos *in vitro*, se ha determinado diferencias, la fimbria tipo Q mejora la adhesión de las bacterias a la córnea bovina, mientras que la fimbria tipo I es importante en la persistencia local y el mantenimiento de la infección (Marrs *et al.*, 1988; Postma *et al.*, 2008).

4.2 Sistemas de adquisición de hierro

La expresión de los sistemas de adquisición de hierro es un componente importante para la adaptación bacteriana al medio ambiente, principalmente en aquellos ambientes donde su disponibilidad es limitada. Les confiere a las bacterias la capacidad de adquirir hierro del huésped para favorecer la producción de proteínas y la síntesis de ADN (Fenwick *et al.*, 1996). Un mecanismo común que aumenta la patogénesis de diferentes especies bacterianas es la producción y secreción de sideróforos, regulada por la concentración de hierro ambiental (Kakuda *et al.*, 2003).

Los sideróforos son pequeñas moléculas quelantes de hierro. Extraen el mismo de las proteínas del huésped y luego se unen a receptores de la superficie bacteriana que importan este nuevo complejo (sideróforo-Fe) hacia el interior de la célula bacteriana (Kakuda *et al.*, 2003).

Entre los receptores de hierro de bacterias Gram negativas encontramos a algunas PMEs dependientes de TonB como por ejemplo BtuB, FecA, FepA y FhuA (Piggot *et al.*, 2013). Estas proteínas se unen con alta afinidad al hierro y permiten por medio de un transporte activo el pasaje de sideróforos-Fe, vitamina B₁₂ y una variedad de otros sustratos hacia el periplasma (Piggot *et al.*, 2013). Luego estos sustratos se unen a proteínas periplásmicas, que permiten la unión a los transportadores de unión a ATP presentes en la membrana interna y transportan el sideróforo-Fe hacia el citoplasma (Andrews *et al.*, 2003). Una vez allí el complejo se disocia, el Fe queda libre para su utilización y los sideróforos se liberan al citoplasma donde pueden volverse a secretar al medio extracelular o degradarse (Andrews *et al.*, 2003).

Por otro lado, en bacterias Gram positivas el complejo sideróforo-Fe se une a proteínas ancladas a la membrana que permite la unión a una permeasa, la cual es responsable del transporte del complejo sideróforo-Fe a través de la membrana hacia el citoplasma (Andrews *et al.*, 2003).

4.3 Citotoxina

Las cepas de *M. bovis* son capaces de generar β -hemólisis (Fig. 4) gracias a que expresan una citotoxina denominada β -hemolisina. Es uno de los factores de virulencia más estudiados de *M. bovis*. Aquellas cepas que la expresen generarán β -hemólisis en placas de agar sangre y se ha establecido que tendrán la capacidad de producir QIB. Por otro lado, las cepas no hemolíticas de *M. bovis* no son patógenas para el ganado (Postma *et al.*, 2008).

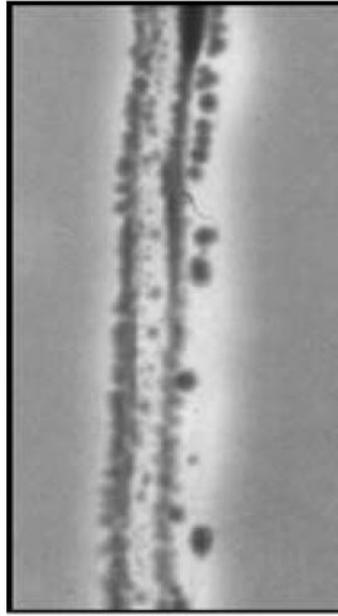


Figura 4. β -hemólisis en placas de agar sangre producida por la β -hemólisisina de *M. bovis* (Angelos *et al.*, 2003).

La β -hemólisisina (MbxA) de *M. bovis*, pertenece a la familia de toxinas RTX de exoproteínas bacterianas, posee un peso estimado de 100 kDa y se encuentra muy conservada entre los diferentes aislamientos (Angelos *et al.*, 2001). Su modo de acción involucra la formación de un poro en la membrana de las células, lo que tiene como resultado la lisis celular. Puede afectar a células de la córnea y a los neutrófilos del hospedero. Genera úlceras corneales y expulsión de enzimas presentes en los neutrófilos que fragmentan y agregan las fibras de colágeno, retrasando así la cicatrización de la córnea (Clinkenbeard *et al.*, 1991; Postma *et al.*, 2008).

4.4 Proteínas de membrana externa

Las PME se encuentran en la membrana externa de bacterias Gram negativas, están expuestas al exterior de la célula bacteriana y son la primera línea de contacto entre la bacteria y su entorno (Rollauer *et al.*, 2015; Fairman *et al.*, 2011). A la gran mayoría de ellas se las puede considerar un factor de virulencia debido a su importancia en la interacción entre la bacteria y el huésped. Participan en la unión e invasión de las bacterias al epitelio del hospedero, así como permiten evadir los mecanismos de defensa del hospedador, escapando de la respuesta inmune (Achouak *et al.*, 2001; Galdiero *et al.*, 2012). Pueden proporcionar al microorganismo resistencia a antibióticos, ya que la gran mayoría forman un canal o poro que permiten el transporte de estas moléculas al exterior celular (Achouak *et al.*, 2001; Galdiero *et al.*, 2012).

Entre las PME podemos encontrar proteínas integrales de la membrana plasmática que adoptan una arquitectura de barril β anfipático transmembrana, que le ofrece una alta estabilidad a la membrana para resistir al entorno variable (Rollauer *et al.*, 2015; Fairman *et al.*, 2011). En las bacterias Gram negativas, la parte hidrofílica de las PME permite la interacción con el espacio extracelular y periplasma, mientras que la parte hidrofóbica es utilizada para interactuar con la membrana, atravesándola y proporcionando integridad y permeabilidad selectiva (Buchanan *et al.*, 1999).

Las PME de la familia TolC son ubicuas entre las bacterias Gram negativas (Koronakis *et al.*, 2004). Están compuestas por una α -hélice (100 Å) que forma un túnel en el periplasma de la célula, unido a un canal de barril β (40 Å) que atraviesa la membrana externa (Koronakis *et al.*, 2004) (Fig. 5a), estableciendo una estructura de poro único (Fig. 5b).

En particular, TolC participa en la expulsión celular de diversas moléculas, que incluyen toxinas proteicas y fármacos antibacterianos (Koronakis *et al.*, 2004). Además, su composición nucleotídica entre diferentes cepas de *M. bovis* es altamente conservada, razón por la cual se la ha propuesto como un posible antígeno para incorporarse a vacunas contra la QIB (Galdiero *et al.*, 2012; Sosa *et al.*, 2015).

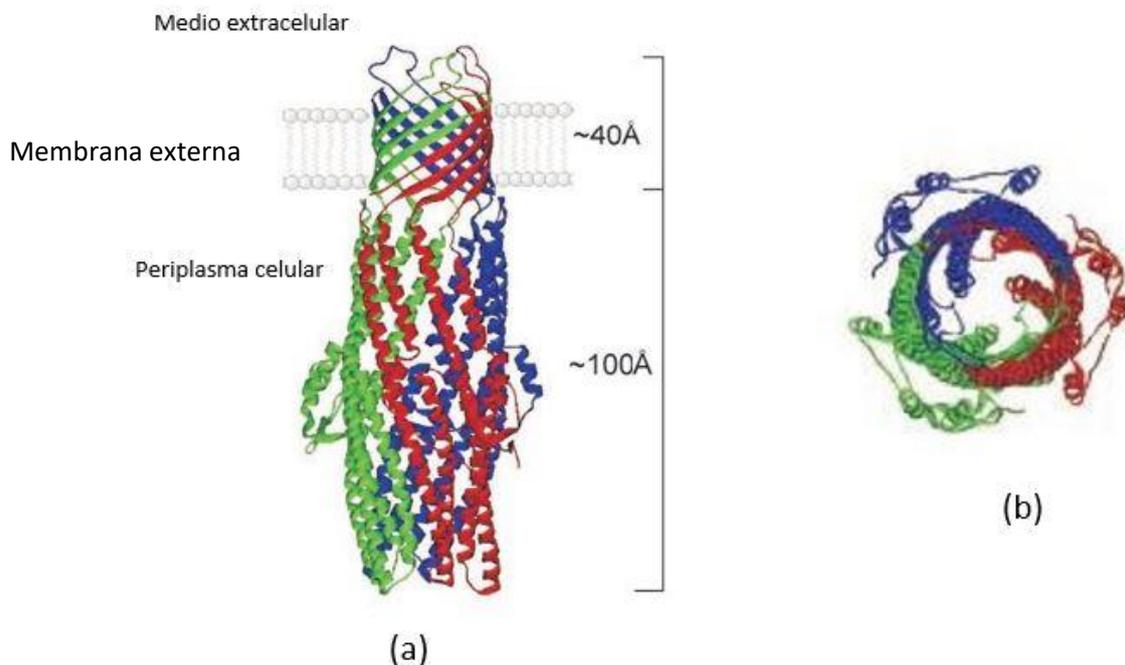


Figura 5. Estructura de TolC. (a) vista lateral de la membrana externa, (b) vista superior de la membrana externa (Koronakis *et al.*, 2004).

5. Tratamientos y prevención de la enfermedad

La antibioticoterapia es el principal tratamiento utilizado para tratar la QIB. La aplicación se realiza por medio de ungüentos o solución acuosa, tanto para erradicar microorganismos patógenos en los animales enfermos como en el ganado portador (Abeynayake *et al.*, 1989). No es una estrategia que resulte totalmente efectiva debido a que se necesita mantener una concentración constante en la película lagrimal, y por ello es un tratamiento costoso y poco práctico (Abeynayake *et al.*, 1989). Previo a su administración se necesitan estudios de susceptibilidad, ya que existe evidencia de resistencia a diferentes tipos de antibióticos. Además, su administración de forma oral tampoco es práctica, a menos que los animales infectados estén separados del rodeo (Brown *et al.*, 1998).

En este escenario, la prevención de la QIB, la detección inmediata mediante una cuidadosa inspección visual y el aislamiento del ganado infectado resultan fundamentales para evitar la propagación de la enfermedad a los individuos sanos (Brown *et al.*, 1998). En los rodeos se recomienda el uso de insecticidas para disminuir o eliminar el número de individuos de la mosca de la cara (Fig. 2) (Brown *et al.*, 1972; Brown *et al.*, 1998; Arnold *et al.*, 2012) y también es relevante que el ganado permanezca a la sombra o con protección ocular en las estaciones de primavera y verano (Baptista *et al.*, 1979).

5.1 Vacunación para prevenir la QIB

Una de las estrategias que se utiliza para prevenir la QIB es la vacunación. Existen actualmente varias vacunas comerciales basadas en bacterina de *M. bovis*, o enriquecidas con componentes bacterianos como fimbrias purificadas (Brown *et al.*, 1998). Si bien todas las vacunas generan una respuesta humoral en los animales vacunados, hasta el momento no se ha logrado una protección total. Una razón de ello que se ha discutido ampliamente es que existe una elevada diversidad entre los diferentes aislamientos de *M. bovis*, y las variantes que están contenidas en las vacunas no coinciden necesariamente con las variantes circulantes en esa zona geográfica (Smith *et al.*, 1990; Lepper *et al.*, 1992). En particular, se especula que esta variabilidad podría deberse a que *M. bovis* presenta diferentes serogrupos fimbriales que aumentan el número de antígenos y permiten que la bacteria pueda evadir la respuesta inmune de animales vacunados (Lepper *et al.*, 1992). Por estas razones es esencial caracterizar los patógenos causantes de QIB a nivel local, y de esa manera desarrollar vacunas más efectivas.

5.2 Proteínas recombinantes para el desarrollo de vacunas

La manipulación del ADN por medio de ingeniería genética ha permitido un gran desarrollo de la Biotecnología de proteínas, ya que permite la obtención de grandes cantidades de proteínas de buena calidad, las cuales en la naturaleza se expresarían en muy bajas concentraciones (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2004; Rocha Pizaña *et al.*, 2005). Pueden usarse como herramientas de diagnóstico, como componentes vacunales, anticuerpos o enzimas funcionales, entre otras (Walsh, 2005; Jayaraj *et al.*, 2009). En el proceso de generación de proteínas recombinantes se manipula un ADN blanco que contiene la información genética de la proteína, el cual se incorpora a un vector de expresión e inducción controlada (plásmido) (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2004; Rocha Pizaña *et al.*, 2005; Overton, 2014). Los plásmidos pueden ser de alto o bajo número de copias. La elección de una u otra variante dependerá de un equilibrio entre la cantidad de proteína recombinante que se desee generar, la toxicidad que ésta pudiera tener sobre la cepa de producción y el gasto energético que le causará a la misma. Los vectores de expresión comerciales, entre otras cosas, presentan diferentes promotores inducibles. Algunos de los promotores más usados son el promotor lac y el trp (Kimple *et al.*, 2004; Jayaraj *et al.*, 2009; García *et al.*, 2013). La mayoría de los vectores de expresión además codifican para otro péptido, el cual se denomina etiqueta de afinidad, la cual es necesaria para los pasos de purificación de la proteína. Existe una gran variedad de etiquetas, y su incorporación es un paso fundamental que asegura la purificación proteica (Kimple *et al.*, 2004; Jayaraj *et al.*, 2009; García *et al.*, 2013). Otra consideración importante para la producción de proteínas es la elección de la cepa de expresión. Los sistemas de expresión más utilizados son las bacterias *Escherichia coli* y *Lactococcus lactis*, las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris* y además pueden considerarse algunas células de mamíferos. Nuevamente, la elección del sistema dependerá del tipo de proteína recombinante que se quiera obtener (Jayaraj *et al.*, 2009).

Si bien los sistemas de expresión heteróloga de proteínas están sumamente regulados y son controlados, en algunos casos no se alcanzan los niveles de expresión deseados o esperados. Esto puede deberse a factores genéticos, entre los que se encuentra la estabilidad del ARN mensajero o el promotor elegido bajo el cual se encuentra la expresión de la proteína (García *et al.*, 2013). También, deben tenerse en cuenta los factores fisiológicos y las condiciones de crecimiento de la cepa de expresión, como por ejemplo el medio de cultivo, la temperatura y la duración de la inducción, entre otros (QIAGEN, 2003; García *et al.*, 2013). Por estas razones, cuando se diseña una proteína

recombinante, y previo a su utilización masiva, es relevante optimizar las condiciones de expresión.

Como alternativa para mejorar las vacunas existentes contra la QIB algunos trabajos se han centrado en la generación de nuevas formulaciones vacunales, ya sea con nuevos antígenos nativos purificados como con nuevos adyuvantes. Por ejemplo, en uno de esos trabajos se utilizó fimbrias purificadas de *M. bovis* con diferentes adyuvantes, evaluándose la respuesta de inmunoglobulinas (IgA) frente a la administración en bovinos (Zbrun *et al.*, 2012). En otro ensayo utilizaron citotoxina nativa, observando luego de la vacunación ausencia/aparición de signos clínicos de QIB. Si bien los resultados parecen auspiciosos, en ninguno de estos trabajos se logró una protección completa contra QIB (George *et al.*, 2005). Posteriores trabajos se centraron en la utilización de proteínas recombinantes, ya sea fimbrias recombinantes de *M. bovis* (Lepper *et al.*, 1993), como citotoxina de *M. bovis*, con administración subcutánea e intranasal (Angelos *et al.*, 2004; 2014) como de *M. bovoculi* (Angelos *et al.*, 2010b). Sea cual sea la proteína que se propone evaluar, en todos los casos se debe tener en cuenta que debe ser un antígeno conservado y preferentemente que tenga un rol importante en la supervivencia bacteriana.

Trabajos realizados en nuestro laboratorio han determinado que además de las fimbrias y la citotoxina existen otros posibles antígenos conservados entre especies y cepas de *Moraxella* spp. que podrían ser considerados como componentes vacunales (Sosa *et al.*, 2015; Acquistapace, 2018). Entre ellos, la PME-CD de *M. bovis* mostró ser muy conservada a nivel genético e inmunogénica en ensayos *in vivo* con animales de experimentación, y por ello se la considera como una candidata potencial para incorporarse a las vacunas contra la QIB (Acquistapace *et al.*, 2014). Asimismo, el gen que codifica a la proteína TolC de *M. bovis* ha mostrado ser conservado entre cepas locales causantes de QIB, y podría ser un blanco interesante de estudio para generar nuevas formulaciones vacunales (Sosa *et al.*, 2015).

HIPÓTESIS

La expresión de la proteína recombinante TolCr de *M. bovis* se puede optimizar modificando las condiciones de cultivo de la cepa, ya sea la temperatura de crecimiento/inducción bacteriana como la duración del tiempo de inducción.

OBJETIVOS

Objetivo general

Optimizar las condiciones de expresión de la proteína recombinante TolC (TolCr) de *Moraxella bovis*, generada previamente en el laboratorio y evaluar su solubilidad para su posterior purificación y cuantificación.

Objetivos específicos

1. Determinar la presencia del gen *tolC* en el plásmido de expresión pET-TolCr proveniente de la cepa de expresión *E. coli* BL21(λDE3)-TolCr generada en el laboratorio.
2. Confirmar la identidad del inserto de ADN presente en pET-TolCr de la proteína TolCr por medio de secuenciación.
3. Optimizar las condiciones para la expresión de TolCr.
4. Evaluar la solubilidad de la proteína TolCr expresada.
5. Purificar TolCr por medio de una cromatografía de afinidad con metales inmovilizados.
6. Cuantificar la proteína obtenida por medio del método colorimétrico de Bradford.

MATERIALES Y MÉTODOS

Antecedentes de este trabajo – generación de TolC recombinante

La construcción de la cepa *E. coli* BL21(λ DE3)-TolC recombinante (*E. coli*-TolCr), fue realizada previamente a este trabajo por investigadores del Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

La cepa *E. coli* XL-1 Blue fue utilizada para la transformación y estabilización del plásmido de expresión (Bullock *et al.*, 1987), mientras que para la expresión de TolC se utilizó la cepa *E. coli* BL21 (λ DE3) (Studier *et al.*, 1986). Esta última es lisogénica para el fago DE3, el cual presenta el gen que codifica para la ARN polimerasa T7 bajo el promotor Lac UV5 (inducible por isopropil- β -D-tiogalactopiranososa (IPTG) en el cultivo bacteriano). Por otro lado, para la expresión de la proteína se utilizó el plásmido pET-21a(+) (Studier *et al.*, 1986), el cual es resistente a ampicilina y presenta el promotor T7. La adición de este antibiótico al medio permite seleccionar los clones que contengan el plásmido.

Primeramente se amplificó por PCR el gen que codifica para TolC de la cepa de referencia *M. bovis* Epp63. Los primers se diseñaron a partir de la secuencia publicada del gen TolC completo. En dichos primers se incorporaron los sitios de restricción para las enzimas *NdeI* y *SacI* de forma que el primer *forward* (directo) contuviera la secuencia nucleotídica complementaria a TolC (Fig. 6 señalado en rojo) y la secuencia blanco de la enzima de restricción *NdeI* (Fig. 6 señalado en verde), de forma que la enzima cortara la secuencia dejando al principio los nucleótidos correspondientes al codón inicio del gen, y el primer *reverse* (reverso) contuviera la secuencia nucleotídica complementaria a TolC (Fig. 6 señalado en rojo), la secuencia blanco de la enzima de restricción *SacI* (Fig.6 señalado en amarillo), la secuencia STOP para terminar la duplicación (Fig.6 señalado en violeta) y la secuencia nucleotídica que codifica para una cola de 6 residuos de histidina, necesaria para el proceso de purificación proteica (Fig 6. señalado en turquesa).

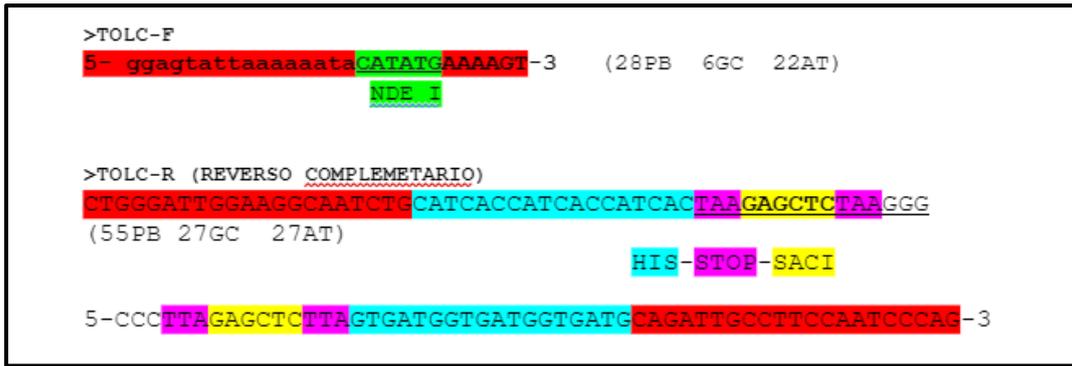


Figura 6. Diseño de primers generados para la amplificación del gen *tolC* de *M. bovis* Epp 63. Rojo:secuencias de primers *Forward* y *Reverse*; Verde: secuencia blanco de la enzima *NdeI*; Anarillo: secuencia blanco de la enzima *SacI*; Fucsia: codones STOP; Turquesa: cola de poli Histidina.

El plásmido pET 21 a (+) utilizado para generar la proteína recombinante se purificó con el kit comercial AxyPrep Plasmid Miniprep Kit: Spin Protocol (Axygen).

El plásmido purificado y el producto de PCR del gen que codifica a TolC fueron digeridos con las mismas enzimas de restricción *NdeI* y *SacI* (Fig. 7 señalado con una flecha negra). Por medio de una ligasa se generó la unión entre el plásmido digerido y el fragmento de TolC amplificado, posteriormente se transformó *E. coli* BL21(λDE3) generando así la cepa recombinante *E. coli*-TolCr.

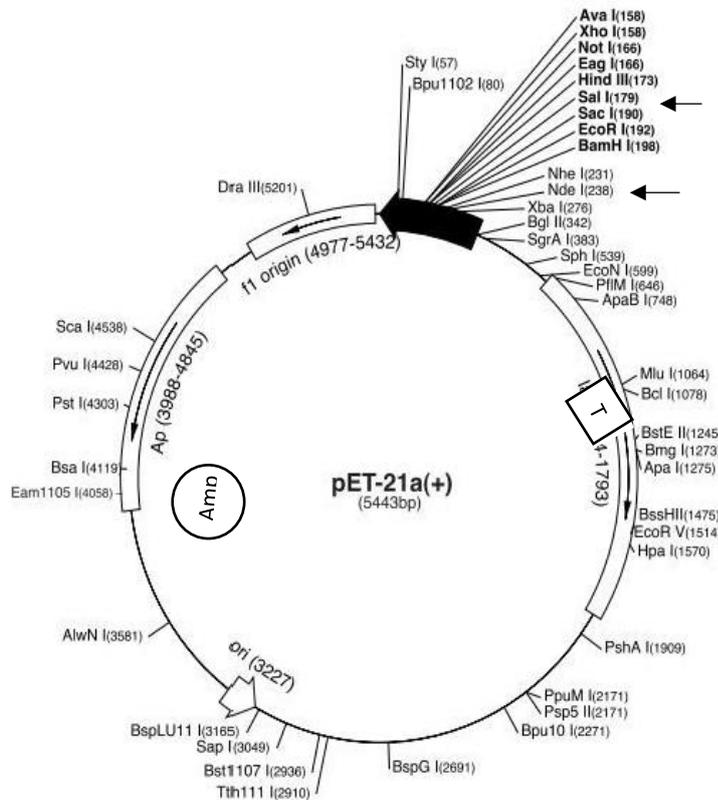


Figura 7. Esquema del plásmido pET 21 a(+), conteniendo los sitios de corte para *NdeI* y *SacI*, el promotor del bacteriófago T7 y resistencia a ampicilina.

Cepa bacteriana y condiciones de cultivo

En el presente trabajo se utilizó la cepa *E. coli* BL21(λ DE3) TolC recombinante (*E. coli*-TolCr), clon 5, que se encuentra almacenada a -80°C en caldo Luria Bertani (LB) y glicerol 15%, suplementado con ampicilina [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$]final, en el cepario del Departamento de Microbiología.

El cultivo rutinario de dicho clon se realizó en placas de medio Luria Bertani Agar (LA) o en caldo LB, suplementados con ampicilina a una concentración final de [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$], con una incubación entre 18-24h a 37°C .

Extracción del plásmido y digestión con enzimas de restricción

La extracción del plásmido pET-TolCr se realizó de acuerdo con las instrucciones del kit comercial GenElute Plasmid Miniprep kit (SIGMA-ALDRICH). Brevemente, una colonia aislada de *E. coli*-TolCr se sembró en 100mL de caldo LB/amp [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$] y se incubó 18h con agitación a 37°C . Transcurrida la incubación se tomó una alícuota de 3mL del cultivo bacteriano para proceder a purificar el plásmido como lo indica el protocolo. Primero se resuspendieron las células en el buffer provisto por el kit y se usó vortex para homogeneizar (este paso es fundamental para una purificación eficiente). A continuación, se lisaron las células en una solución alcalina con SDS, la cual además permite la desnaturalización del ADN cromosómico y de las proteínas. Los plásmidos se ven menos afectados por este proceso por su pequeño tamaño y su estructura superenrollada. La lisis no excedió los 5 minutos ya que una exposición prolongada puede llegar a desnaturalizar el ADN plasmídico. Posteriormente se desnaturalizaron las proteínas, los lípidos y partes celulares, quedando el ADN genómico en la solución como un precipitado viscoso. Para limpiar aún más el sobrenadante, donde se encontraba el ADN plasmídico se centrifugó el mismo, y el sobrenadante se cargó en la columna de sílice. Previamente la columna se colocó en un tubo de microcentrífuga y se le añadió un buffer que facilita la unión del ADN plasmídico a la columna. En pasos posteriores se realizaron 2 lavados consecutivos para descartar contaminantes y finalmente se eluyó el ADN plasmídico por medio de la adición del buffer de elución, que genera una variación del pH que permite que el ADN se libere de la columna.

La digestión enzimática del plásmido purificado se realizó con las enzimas de restricción *NdeI* y *SacI* (ANZA) de acuerdo al protocolo provisto por el fabricante. Brevemente, se mezclaron 3 μL del plásmido purificado, 1 μL de cada enzima, 2 μL de buffer 10X (ANZA, provisto por las enzimas), y 13 μL de H_2O . La mezcla de reacción se incubó a 37°C por

15 min. Transcurrido el tiempo de incubación se inactivaron las enzimas a 80°C durante 20 min. La extracción del plásmido y la digestión enzimática se corroboraron por electroforesis en geles de agarosa.

Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis es un método de separación de moléculas como ADN o proteínas en función de su carga. Para modificar la velocidad de migración y la separación de productos se pueden utilizar diferentes concentraciones de los componentes del gel, como ser la agarosa o la acrilamida. Diferentes concentraciones de estos componentes generan diferentes diámetros del poro, que tiene relación directa con el tamaño o el peso de la molécula que se desee separar (Roca *et al.*, 2004).

En este trabajo el gen *ToIC* amplificado y digerido tanto como el plásmido purificado y digerido enzimáticamente se corrieron en geles de agarosa 2% y 0,8% en buffer TBE 0,5X respectivamente. Cada muestra se sembró en una relación 5:1 (5µL de muestra + 1µL de buffer concentrador). Para estimar el tamaño del ADN se utilizó el marcador de tamaño molecular 1Kb Plus (Invitrogen).

Luego de realizada la corrida electroforética, los geles se tiñeron con el fluoróforo GelRed (Biotum) que se intercala en el surco menor del ADN doble hebra y su emisión a 600nm aumenta cuando se genera la unión y se observaron bajo luz UV. La fluorescencia obtenida será proporcional a la cantidad de ácido nucleico presente (Roca *et al.*, 2004).

Secuenciación del plásmido pET-ToICr

La identidad del gen *toIC* recombinante, que codifica para la proteína ToICr, se confirmó mediante secuenciación. Para ello, una alícuota del plásmido recombinante pET-ToICr purificado y los primers (T7 forward se aparea desde la base 69 hasta 87 presente en el plásmido y T7 reverse se aparea desde la base 308 a 327 del plásmido) se envió a secuenciar al servicio brindado por Macrogen Inc. (Corea del Sur). La edición y los análisis de identidad de la secuencia obtenida se realizaron con el programa bioinformático de acceso libre BioEdit (versión 7.5.0.3) y el programa en línea BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Optimización de la expresión de TolCr

Para optimizar la expresión de la proteína recombinante se ensayaron distintas temperaturas de cultivo/inducción y diferentes tiempos de inducción (Tabla 1) (QIAGEN, 2003; García *et al.*, 2013; Jia *et al.*, 2016). El protocolo de sobreexpresión de TolCr se detalla a continuación.

Se inocularon 300mL de caldo LB/ampicilina [100µg/mL] con una colonia aislada de *E. coli*-TolCr y el medio se incubó a 30°C o 37°C (dependiendo del protocolo ensayado) con agitación vigorosa (Tabla 1). Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) en el rango de 0,4 a 0,8 que comprende la fase exponencial de crecimiento bacteriano donde las células están saludables, dividiéndose todas por fisión binaria y la velocidad de crecimiento es máxima. Aquí se tomó una alícuota (Ti) para visualizar posteriormente por electroforesis las condiciones iniciales de los cultivos y se indujo la expresión de la proteína con IPTG estéril a una concentración final de 1mM. El IPTG es un análogo de la lactosa, ambas moléculas son inductores del Operón lac, el encargado de la expresión de TolCr. El cultivo se incubó durante 1,5h/3h a 30°C o 37°C con agitación vigorosa, dependiendo del protocolo ensayado (Tabla 1), luego se tomó una alícuota (Tf) y se centrifugó el resto del cultivo a 10.000 rpm a 4°C durante 15 min. Finalmente, el sedimento obtenido se almacenó a -20°C para la posterior purificación de la proteína recombinante. Al igual que el cultivo final, las alícuotas Ti y Tf se centrifugaron (10.000 rpm durante 5 min) y los sedimentos se resuspendieron en buffer de muestra 2X. Finalmente, las muestras se analizaron por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15%.

Tabla 1. Condiciones de cultivo ensayadas para optimizar la expresión de TolCr.

| Temperatura de crecimiento e inducción | Duración del tiempo de inducción |
|---|---|
| 37°C | 3h |
| 30°C | 3h |
| 30°C | 1h y 30 min |

Evaluación de la solubilidad de TolCr

Para determinar la solubilidad de la proteína expresada, una alícuota del *pellet* final (Tf) se resuspendió en 5mL de buffer de resuspensión (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 10mM, pH= 8), se agregó lisozima a 1 mg/mL final y se incubó en hielo durante 30 min. Luego se sonicó la muestra a 200-300 W (x6), con pausas de 10 segundos, con el objetivo de incrementar el proceso de lisis (siempre se mantuvo el lisado en hielo). Posteriormente se procedió a centrifugar el lisado a 10.000 xg durante 30 min a 4°C y se colectó el sobrenadante (fracción A), que corresponde a las proteínas solubles. Por otro lado, se resuspendió el pellet en 5mL de buffer de resuspensión (fracción B), que corresponde a las proteínas insolubles del preparado: células que no se lisaron, componentes de membrana y cuerpos de inclusión. Una alícuota de cada fracción se analizó por SDS-PAGE al 15%.

Purificación de TolCr en condiciones desnaturalizantes

Debido a que la proteína TolCr generada se encontró en la fracción B (fracción insoluble), se procedió a su purificación en condiciones desnaturalizantes, de acuerdo al protocolo establecido en el manual de QIAGEN (QIAGEN, 2003). Para esto se utilizó una cromatografía de afinidad con metales inmovilizados. La misma posee una fase estacionaria compuesta por el ion metálico Ni²⁺, el cual está inmovilizado con un quelante (ácido nitrotriacético, N-TA), y la fase móvil se compone de la proteína TolCr generada que posee una cola de poli-histidina, la cual tiene afinidad por el ion, generando un enlace de coordinación (Rocha Pizaña *et al.*, 2005; Hedman *et al.*, 1989).

Las células previamente inducidas con IPTG se resuspendieron en buffer A (Urea 8M, Tris 0,01, NaH₂PO₄ 0,1M, pH= 8) y se agitaron moderada durante 1 h a temperatura ambiente (TA). Transcurrido el tiempo, el lisado se centrifugó a 10.000 xg durante 15 min a 4°C. Al sobrenadante obtenido se le agregó 8mL de resina Ni-NTA al 50% (Qiagen) equilibrada en 4 volúmenes (1 volumen= 5mL) de buffer A, ambos componentes formarán la columna cromatográfica y la mezcla se incubó con agitación moderada durante 45 minutos a TA.

Una vez que la columna se dejó en condiciones estáticas la resina decantó y se lavó con 13 volúmenes de buffer A (1 volumen= 4mL), controlando que el flujo de salida fuera 10-15mL/h y que la absorbancia a 280nm (A₂₈₀) fuera menor a 0,01. El control de A₂₈₀ se realizó porque en este valor absorben la luz los aminoácidos aromáticos que pueden

estar presentes en las cadenas laterales de la proteína (Roca *et al.*, 2004). Luego, la columna se lavó con 11 volúmenes de buffer C (Urea 8M, Tris 0,01, NaH₂PO₄ 0,1M, pH= 6,3) y nuevamente se controló que la A₂₈₀ fuera menor a 0,01nm. Posteriormente la proteína TolCr unida al Ni se eluyó con 10 volúmenes de Buffer C con el agregado de Imidazol 500mM final. Esto es posible gracias a que el imidazol compite con la proteína por unirse a la columna, desplazando a TolCr y permitiendo su elución (Roca *et al.*, 2004).

Las fracciones se recogieron en varios tubos, de los cuales el primero contuvo 15 mL de eluido y los siguientes 5 mL cada uno. Finalmente, la presencia de la proteína en cada fracción se controló por SDS-PAGE al 15%. Aquellas fracciones en las cuales se encontró la proteína se dializaron con suero fisiológico, 0,9% NaCl (m/v) a 4°C por 72h utilizando una membrana de diálisis que retiene proteínas cuyo peso molecular (PM) es mayor a 12 kDa (SIGMA-ALDRICH), en cambio las moléculas más pequeñas como iones o metabolitos pueden atravesar la membrana porosa, separándose de manera diferencial según su tamaño. La proteína dializada se almacenó en alícuotas a - 20°C hasta su uso (Roca *et al.*, 2004).

Electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para visualizar la proteína TolCr expresada y purificada se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida (Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis, PAGE) en condiciones desnaturizantes, según el protocolo de Sambrook y colaboradores (Sambrook *et al.*, 1989). Para la preparación del gel se usó una relación de acrilamida/bisacrilamida de 29:1 respectivamente. El gel concentrador utilizado se preparó a una concentración final de acrilamida de 5%, mientras que el gel separador se preparó a una concentración final de acrilamida de 12%, estos porcentajes permiten definir el tamaño del poro en el gel, además de incluir persulfato de amonio 10% y TEMED, los que permiten la polimerización del gel (Roca *et al.*, 2004). La solución tampón utilizada para la electroforesis fue Tris-glicina (Tris 0,3%, glicina 1,9%, SDS 1%). La corrida electroforética se realizó en una cuba Mini Protean Tetra System (Bio-Rad) a 100V hasta que el frente de corrida llegó al gel separador, y se continuo luego a 120V. Previo a la siembra en el gel, las proteínas se solubilizaron en buffer de muestra (Tris-HCl 125 mM, pH= 6,5, glicerol 20%, SDS 4%, β-mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol 0,01%) y se calentaron a 100°C durante 10 minutos. El glicerol aporta densidad a la muestra y facilita su siembra en el pocillo, el SDS, es un detergente que desnaturiza proteínas, quedando todas con la misma forma, en caso de ser oligomérica permite la separación

de las subunidades (Roca *et al.*, 2004). Además, se une a las proteínas en la misma proporción: 1.4 g de SDS cada 1 g de proteína, brindando la misma densidad de carga lo que permite la separación proteica exclusivamente por tamaño (Roca *et al.*, 2004). El agregado de β -mercaptoetanol se utilizó para reducir los enlaces disulfuro, separando las subunidades proteicas. Por otro lado, el azul de bromofenol se puede unir débilmente a las proteínas, y se utilizó para visualizar el avance de la electroforesis (Roca *et al.*, 2004). La muestra se calentó para desnaturalizar completamente las proteínas y permitir el acceso al SDS a toda la cadena polipeptídica (Roca *et al.*, 2004).

Las bandas proteicas se visualizaron por tinción de los geles con azul brillante de Coomassie (0,25g de azul brillante de Coomassie en 90 mL de etanol absoluto al 50% en agua destilada y 10 mL de ácido glacial) y posteriormente se decoloró los geles por medio de una solución decolorante (etanol 25%, ácido acético 8%). El azul brillante de Coomassie es una molécula apolar que se une a las proteínas de forma inespecífica permitiendo visualizarlas de color azul por el pH utilizado, y el etanol y el ácido glacial permiten la solubilización y la inmovilización de las moléculas proteicas (Roca *et al.*, 2004).

Para poder estimar el peso molecular de las proteínas se empleó el marcador de peso molecular (PM) AccuRuler RGB Plus Prestained Protein Ladder (Maestrogen).

Cuantificación de la concentración de TolCr

Se cuantificó la proteína recombinante TolCr por medio del método colorimétrico de Bradford (Bradford *et al.*, 1976), utilizando el kit comercial Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) en placas de microtitulación. Este método utiliza el colorante azul brillante de Coomassie, el cual forma un fuerte complejo no covalente con grupos amino y carboxilos presentes en las proteínas. La unión entre el colorante y la proteína provoca un cambio en el máximo de absorción de 465nm a 565nm, este último valor es el utilizado para el ensayo. Este método tiene una sensibilidad que varía de 1 a 15 μ g (Bradford *et al.*, 1976).

Se preparó una curva de calibración con un estándar de albúmina sérica bovina (BSA), usando diferentes diluciones en agua ultrapura: 0,15mg/mL; 0,25mg/mL; 0,35mg/mL y 0,45mg/mL. En el caso de TolCr se utilizó la muestra sin diluir, 50:50 y 30:70 (proteína:agua bidestilada respectivamente). Cada dilución se sembró por triplicado. El volumen de siembra fue de 10 μ L de muestra (BSA o TolCr) y se agregó 200 μ L de reactivo Dye Reagent Concentrate (provisto por el fabricante del kit) a cada pocillo.

Transcurridos 5 min se midió la absorbancia a 595nm. Con los valores de absorbancia de la proteína BSA se realizó una curva estándar, a partir de la cual se cuantificó la proteína TolCr purificada.

RESULTADOS

Identidad de la proteína TolCr recombinante

Para confirmar la presencia del gen y corroborar la identidad del inserto de ADN se extrajo el plásmido de la cepa de expresión *E. coli* BL21(λ DE3)(pET-TolCr), clon 5, utilizando el kit comercial Gen Elute™ Plasmid Miniprep Kit (SIGMA-ALDRICH) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Primeramente, el plásmido purificado se digirió con las enzimas de restricción *Nde*I y *Sac*I y una alícuota del mismo (doble digerido) se corrió en un gel de agarosa 0,8% teñido con GelRed (Fig. 8, carril 3). Además, se corrió una alícuota del plásmido purificado sin digerir (Fig. 8, carril 2).

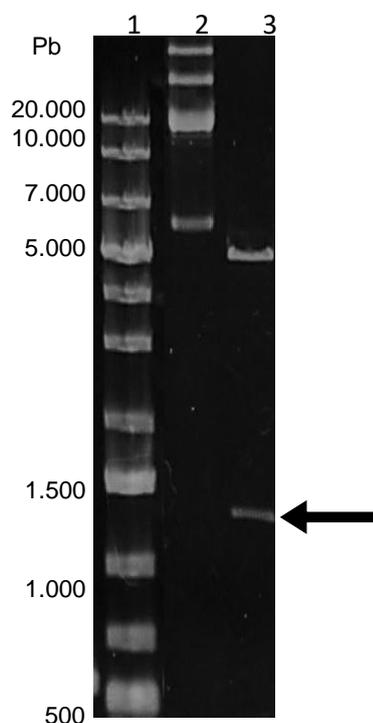


Figura 8. Purificación y digestión enzimática del plásmido TolCr. Gel de agarosa 0,8% teñido con GelRed. Carril 1: Marcador de tamaño molecular 1kbPlus. Carril 2: plásmido purificado sin digerir. Carril 3: plásmido luego de la doble digestión. Flecha: inserto de tamaño esperado (aproximadamente 1289 Pb). Pb: pares de bases.

Se observó que el plásmido pET-TolCr se encontraba en las diferentes conformaciones plasmídicas: circular, lineal, enrollado y superenrollado (Fig. 8, carril 2), y que la doble digestión enzimática generó un fragmento de ADN del tamaño esperado, 1289pb banda inferior a 1500pb, correspondiente al fragmento de ADN que codifica a la proteína recombinante TolCr (Fig. 8, carril 3 señalado con una flecha).

Luego de la digestión enzimática, otra alícuota del ADN plasmídico purificado se envió a Macrogen Inc. (Corea del Sur) para confirmar la identidad del fragmento que codifica a la proteína TolCr. El alineamiento y los análisis de las secuencias obtenidas se realizaron con el programa bioinformático BioEdit (versión 7.5.0.3) y el programa en línea BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A partir de las comparaciones con los genomas y secuencias parciales disponibles en las bases de datos públicas se confirmó que la secuencia predicha de la proteína TolC recombinante presentaba un 99,74% de identidad con el gen que codifica a TolC de la cepa de referencia *M. bovis* Epp63 y con el gen que codifica a TolC de la cepa *M. bovis* tifton I (Fig. 9).

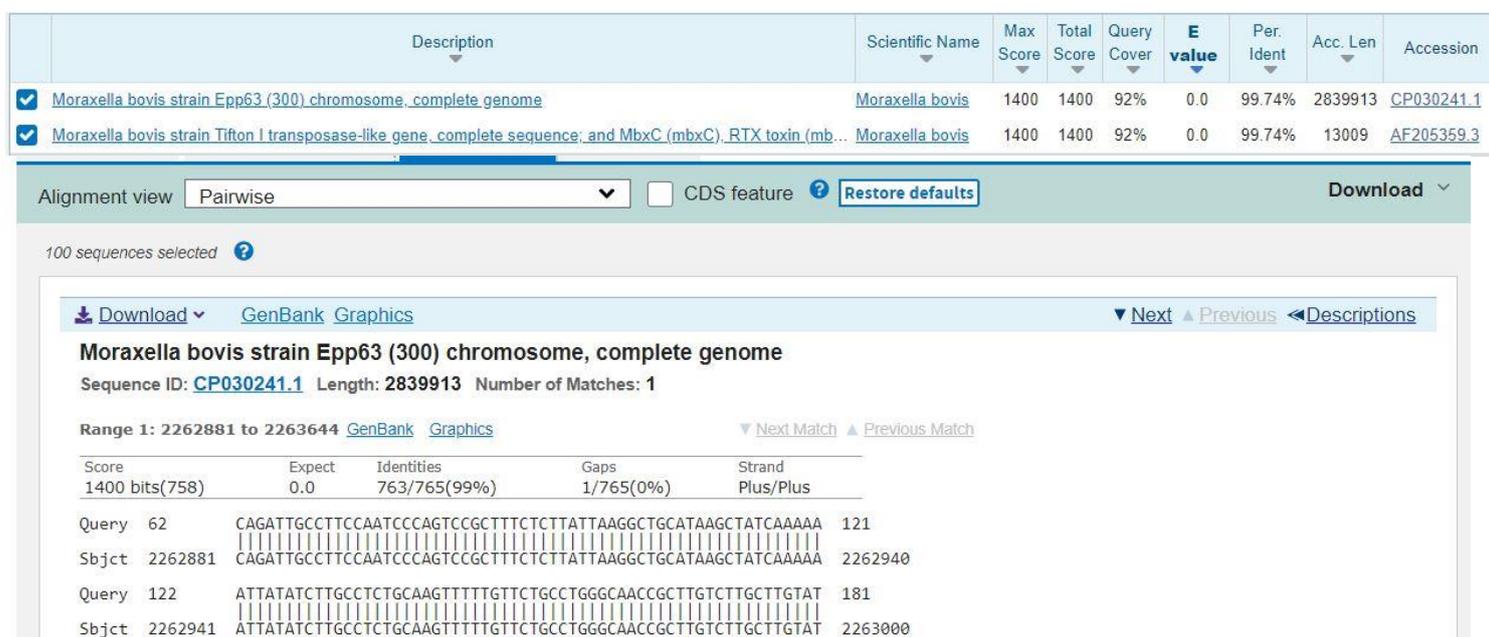


Figura 9. Resultados obtenidos del alineamiento de la secuencia de TolCr con las secuencias disponibles en la base de datos pública, utilizando la herramienta BLAST.

Optimización de la expresión de TolCr

La expresión de TolCr se realizó a partir de un caldo LB/amp sembrado con una colonia aislada de la cepa de expresión *E. coli*-TolCr (clon 5) al cual se le adicionó IPTG 1mM final. La inducción de la expresión de la mencionada proteína se corroboró corriendo las fracciones de proteínas totales antes de la adición de IPTG (Ti) y luego de la inducción (Tf), en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (Fig. 10). Tal y como se observa en el gel (Fig. 10, banda tenue de 41 kDa aproximadamente, recuadro negro), en estas condiciones, la inducción de la expresión de TolCr fue baja.

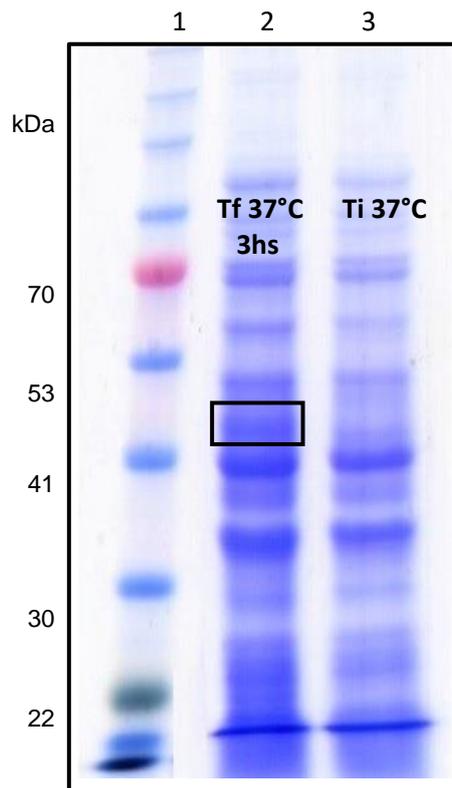


Figura 10. Expresión de TolCr. SDS-PAGE 12%. Carril 1: Marcador de peso de amplio rango (MAESTROGEN). Carril 2: Tf: inducción a 37°C, duración 3h. Carril 3: Ti.

Teniendo en cuenta estos resultados se procedió a optimizar la expresión de TolCr probando 2 temperaturas de cultivo/inducción y 2 tiempos de inducción diferentes (Tabla 1, materiales y métodos). Como se puede observar en la Fig. 11, la disminución de la temperatura de crecimiento/inducción de 37°C a 30°C aumentó la cantidad de proteína TolCr generada (banda intensa de aproximadamente 41 kDa, recuadro negro, carriles 2 y 4 (Fig. 11)). Asimismo, el tiempo de inducción que mejor resultado generó fue 3h (Fig. 11, carril 4).

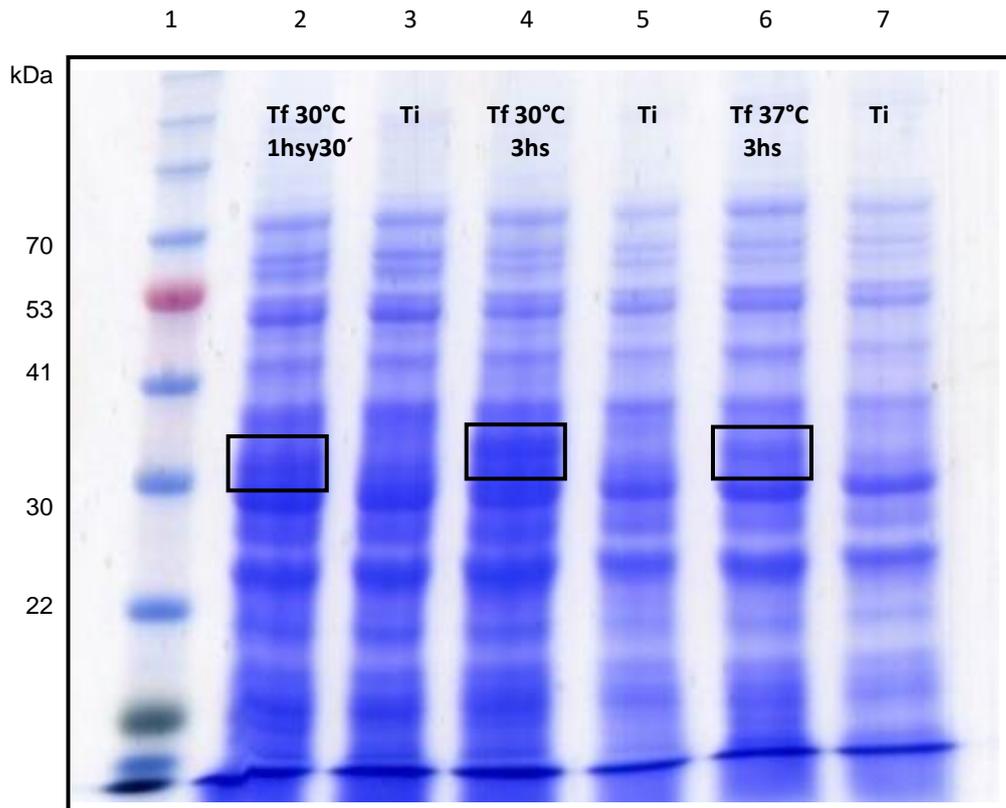


Figura 11. Inducción de la expresión de TolCr a diferentes temperaturas de crecimiento y con distintos tiempos de inducción. SDS-PAGE 12%. Carril 1: Marcador de peso de amplio rango (MAESTROGEN). Carril 2: Tf= inducción 30°C, 1h y 30min. Carril 3: Ti. Carril 4: Tf= inducción 30°C, 3h. Carril 5: Ti. Carril 6: Tf= inducción 37°C, 3h. Carril 7: Ti.

De esta manera se establecieron las condiciones óptimas de crecimiento y duración de inducción de la expresión de TolCr: temperatura de crecimiento e inducción de 30°C y duración de la expresión 3h.

Evaluación de la solubilidad, purificación y cuantificación de TolCr

La solubilidad de TolCr se evaluó de acuerdo al protocolo descrito en el manual de QIAGEN (2003). Una alícuota de la fracción A (fracción de proteína soluble, Fig. 12, carril 4) y de la fracción B (fracción de proteína insoluble, Fig. 12, carril 5) se corrieron en un gel de poliacrilamida, y se determinó que TolCr se encontraba en la fracción insoluble de las células (Fig. 12, carril 5, recuadro negro).

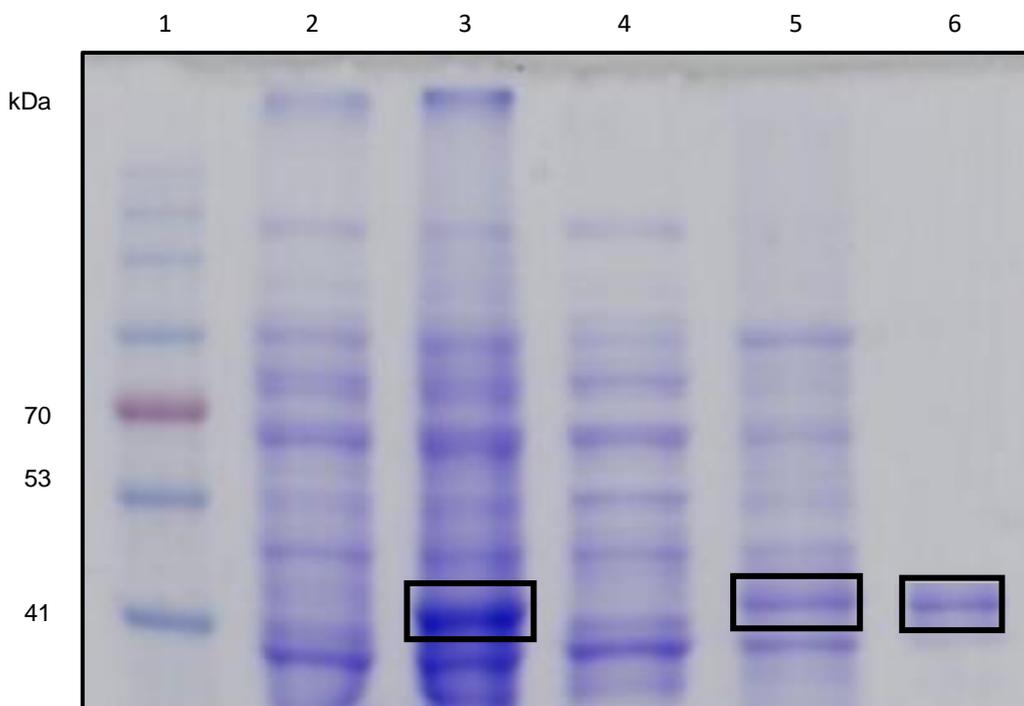


Figura 12. Evaluación de la solubilidad y purificación de TolCr. SDS-PAGE 12%. Carril 1: Marcador de peso de amplio rango (MAESTROGEN). Carril 2: T₀= inducción 30°C, 3h. Carril 3: T_f= inducción 30°C, 3h. Carril 4: FRACCIÓN A. Carril 5: FRACCIÓN B. Carril 6: proteína TolCr purificada.

Posteriormente, y a partir de que la proteína se detectó en la fracción B, TolCr se purificó en columnas de afinidad de Agarosa-Niquel en condiciones desnaturalizantes con urea 6M. Para la elución de la proteína de la columna se utilizó Imidazol 500mM, el cual compete con TolCr por los sitios de unión en la columna, permitiendo su elución (Fig. 12, carril 6, recuadro negro).

A continuación, la proteína TolCr purificada se dializó en membranas de diálisis con suero fisiológico durante 72h a 4°C y se cuantificó en placas de microtitulación mediante el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976), y utilizando la proteína seroalbúmina bovina (BSA) como estándar en la curva de calibración. A partir de la curva de calibración se determinó que la concentración de TolCr fue 23,9 mg/mL. Finalmente, TolCr dializada y cuantificada se almacenó en alícuotas a -20°C para posteriores ensayos.

DISCUSIÓN

La Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina (QIB) es la enfermedad infectocontagiosa ocular más común que afecta a todas las razas de ganado en el mundo (Brown *et al.*, 1998; Postma *et al.*, 2008). A nivel mundial se estima una incidencia de 2,78% en el ganado de carne (Dennis *et al.*, 2021), aunque también se presenta en ganado de leche. Genera grandes pérdidas económicas asociadas con la disminución de peso en animales infectados, disminución de la producción de leche en animales lecheros además de costos asociados al tratamiento farmacológico repetitivo y a la prevención de la enfermedad (Baptista *et al.*, 1979; McConnel *et al.*, 2007). En nuestro país la QIB es una enfermedad que se encuentra con frecuencia (Sosa *et al.*, 2012; 2013), aunque no existe una estimación económica de las pérdidas ocasionadas por la enfermedad.

La QIB es una enfermedad multifactorial, en la cual pueden participar distintos microorganismos, así como también existen factores ambientales y genéticos que predisponen a los bovinos (Baptista *et al.*, 1979; Brown *et al.*, 1998; Arnold *et al.*, 2012). Entre los agentes etiológicos más frecuentemente asociados a la QIB encontramos a *M. bovis* y *M. bovoculli* (Brown *et al.*, 1972; Baptista *et al.*, 1979; Brown *et al.*, 1998; Arnold *et al.*, 2012).

Debido a que el tratamiento con antibióticos no es siempre efectivo para controlar y eliminar la enfermedad (McConnel *et al.*, 2007), y que además las vacunas existentes proporcionan una protección variable, la cual depende de las variantes circulantes en los rodeos (Smith *et al.*, 1990; Lepper *et al.*, 1992), son necesarios nuevos estudios de caracterización de patógenos causantes de QIB a nivel local.

Una estrategia para mejorar las formulaciones de las vacunas contra la QIB es utilizar antígenos conservados, los cuales al ser incorporados a los preparados vacunales deberían inducir respuestas inmunológicas protectoras frente a distintas cepas. Una herramienta para la producción a escala laboratorio e industrial de estos antígenos son las proteínas recombinantes. Entre los beneficios de esta aproximación se destaca que la cepa de expresión es de fácil manipulación y está caracterizada exhaustivamente, la expresión heteróloga no posee de primera mano costos elevados, se obtienen productos libres de patógenos y se generan grandes cantidades de un producto específico (García *et al.*, 2013). Las proteínas producto de estos sistemas, a su vez pueden incorporarse a los preparados vacunales para generar mejores respuestas inmunes protectoras en los bovinos.

Entre los antígenos que se encuentran actualmente en estudio, como posibles componentes de vacunas contra la QIB se encuentran las fimbrias (Zbrun *et al.*, 2012) y la citotoxina de *M. bovis* (George *et al.*, 2005), así como algunas PME (Acquistapace *et al.*, 2021).

La PME TolC cumple una función clave en la supervivencia bacteriana, más específicamente en la exportación de distintas moléculas a través de la membrana externa de bacterias Gram negativas, y se ha reportado que es conservada en *M. bovis* (Galdiero *et al.*, 2012; Sosa *et al.*, 2015). Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que el gen que la codifica es muy conservado entre cepas causantes de QIB en Uruguay (Sosa *et al.*, 2015), y como consecuencia se la considera como un posible antígeno de nuevos preparados vacunales. El objetivo de este trabajo fue optimizar las condiciones de expresión de una proteína de membrana externa recombinante, TolCr, de *M. bovis*, generada previamente en el laboratorio y evaluar su solubilidad para su posterior purificación y cuantificación.

En principio se verificó la construcción plasmídica. Usando dos enzimas de restricción, *NdeI* y *SacI*, se confirmó la presencia de un fragmento del tamaño esperado para el gen que codifica a TolC en el plásmido. Para determinar la identidad de dicha secuencia de ADN el sitio de policlonado del plásmido pET-TolCr se secuenció y luego del análisis de las secuencias obtenidas se confirmó que tenía homología con la secuencia esperada de TolC de *M. bovis*. Se obtuvo un 92% de cobertura ya que los primers utilizados para la secuenciación amplificaban una secuencia más grande que la proteína TolC (la región de policlonado del plásmido pET). El 8% restante tiene homología con la secuencia plasmídica.

Posteriormente se procedió a optimizar la inducción de la expresión de TolCr. Existen diversos factores que pueden afectar la producción de una cantidad adecuada de proteína recombinante, los cuales se pueden clasificar en factores genéticos y en factores fisiológicos (García *et al.*, 2013).

Entre los factores genéticos a tener en cuenta cuando se desarrolla una proteína recombinante es la elección del promotor que permite la síntesis de la proteína de interés. En este trabajo se utilizó el plásmido pET-TolCr el cual presenta el gen que codifica a TolCr, bajo el control del promotor del bacteriófago T7. Para que el sistema se exprese se necesita de una ARN polimerasa, la cual se encuentra codificada en la cepa de expresión *E. coli* BL21(λ DE3) bajo el control del promotor lac (Lactosa) (Studier *et al.*, 1986). El Operón lac se reprime en presencia de glucosa y se induce en presencia de lactosa o su análogo IPTG (Gronenborn, 1976; Hannig *et al.*, 1998; García *et al.*,

2013). Como se describió en materiales y métodos, para la expresión de nuestra proteína de estudio se utilizó IPTG, debido a que la expresión se realizó a escala de laboratorio. Este inductor puede ser tóxico si se utiliza en grandes cantidades en el cultivo, además de que es un reactivo caro para utilizarse a nivel industrial (Hannig *et al.*, 1998). Otra característica importante a tener en cuenta en este sistema es que el promotor lac debe ser usado en cepas de *E. coli* que contengan en su genoma las enzimas que se necesitan para metabolizar el IPTG (permeasa, β -galactosidasa y transacetilasa), como por ejemplo la cepa *E. coli* BL21(λ DE3) (Jeong *et al.*, 2009).

Otro factor genético a considerar es la presencia de codones raros en la secuencia de nucleótidos que codifican para TolCr. Aunque el código genético es universal, tanto hospederos procariotas como eucariotas harán un uso preferencial de determinados codones, dejando unos pocos con o sin uso (González *et al.*, 2018). Estos codones raros son los encargados de sintetizar los aminoácidos arginina y prolina y en general disminuyen la velocidad de traducción y favorecen el corrimiento del marco de lectura, lo que puede generar una terminación prematura de la síntesis de la proteína recombinante (García *et al.*, 2013; González *et al.*, 2018). En la secuencia aminoacídica de TolCr encontramos 20 argininas y 4 prolinas de un total de 428 aminoácidos. Si bien no existe un número máximo referente a la cantidad de estos residuos aminoacídicos en la proteína, en el caso de TolCr constituyen un 6% del total de los aminoácidos, otros autores especulan que podría ser un fenómeno que incida en la expresión proteica (García *et al.*, 2013).

El último factor genético a considerar son las modificaciones en el genoma de la cepa huésped. La cepa debe ser deficiente en proteasas, para evitar que se expresen enzimas que degraden la proteína recombinante generada, en nuestro caso a TolCr (QIAGEN, 2003; García *et al.*, 2013). En este trabajo se utilizó la cepa de laboratorio *E. coli* BL21(λ DE3), la cual presenta ciertas ventajas referentes a este factor en particular. Su genoma está modificado, y carece de las proteasas lon y OmpT. Ambas enzimas se encuentran comúnmente en *E. coli*, se producen en altas concentraciones, y son conocidas por su elevada degradación proteica. Su ausencia incrementa la estabilidad de las proteínas intracelulares, en especial de las proteínas recombinantes que se producen en grandes concentraciones (González *et al.*, 2018).

Entre los factores fisiológicos que pueden afectar la expresión se encuentra la composición del medio de cultivo, el cual debe contener fuentes de carbono y nitrógeno que permitan la biosíntesis de macromoléculas (García *et al.*, 2013). Estos compuestos están presentes en el medio de cultivo usados para este trabajo LA y LB. Otro de los

factores fisiológicos que pueden modificarse para aumentar la producción proteica es la disminución de la temperatura de crecimiento/inducción, la cual se relaciona con la velocidad de crecimiento de la cepa huésped. Disminuyendo la cantidad de generaciones se disminuye además la actividad de las proteasas presentes en el medio y se aumenta la expresión de chaperonas, lo que le proporciona más tiempo a la cepa para expresar más eficientemente la proteína recombinante (QIAGEN, 2003; Jia *et al.*, 2016). En este trabajo se observó que al modificar la temperatura de crecimiento de 37°C a 30°C, se mejoró notoriamente la producción de TolCr.

También otro factor fisiológico a evaluar es la duración de la inducción. Algunas veces las proteínas generadas de forma recombinante son tóxicas para la célula, afectando el desarrollo de la célula huésped. Por eso, la disminución de la duración de la inducción permitiría generar concentraciones tolerables intracelulares (QIAGEN, 2003; García *et al.*, 2013). Si bien estas modificaciones han resultado efectivas para diferentes proteínas recombinantes en otros estudios, en nuestro trabajo, la disminución de 3h a 1,5h en la duración de la inducción no mostró una mejora en la expresión de TolCr, sino que determinamos que el mejor tiempo de inducción para TolCr es 3h.

Una vez que se establecieron las condiciones óptimas de expresión de TolCr se evaluó su solubilidad, encontrándose a la proteína en la fracción insoluble. Este fenómeno está ampliamente documentado en la bibliografía debido a que las proteínas recombinantes se generan en altas concentraciones intracelulares, y además a que pueden no ser eficientemente procesadas por chaperonas celulares (González *et al.*, 2018). Los cuerpos de inclusión son agregados insolubles de proteínas parcialmente plegadas y biológicamente inactivas en el citoplasma (González *et al.*, 2018; Sørensen *et al.*, 2005; 2005b) que se producen en respuesta al estrés celular y a los altos niveles de proteína generada. La detección de TolCr en esta fracción nos llevó a purificar la proteína en condiciones desnaturizantes, lo que supone una desnaturalización de la misma en los pasos de purificación. Una alternativa para obtener a TolCr en su estado nativo así como aumentar su concentración sería utilizar el sistema de expresión con la levadura *S. cerevisiae*. Su principal ventaja radica en que permite la fusión entre la proteína recombinante madura y el factor de apareamiento de la levadura, lo que direcciona a la proteína hacia su vía secretora la cual se expresa como consecuencia de manera soluble y en su forma nativa. En el sistema utilizado en este trabajo, con *E. coli*, podría agregarse en la construcción plasmídica una señal de secreción celular. Esta incorporación podría ser útil si se desea realizar posteriores ensayos con TolCr, como

por ejemplo ensayos *in vitro* e *in vivo* para determinar la inmunogenicidad de la misma (Jayaraj *et al.*, 2009).

Posteriormente se realizó la cuantificación de TolCr por medio del método colorimétrico de Bradford, obteniéndose 23,9 mg/mL, en trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio (Acquistapace, 2018) generando proteínas recombinantes de membrana externa PME-CD a partir de dos cepas de referencia de *M.bovis* Epp63 y Ev354 se logró obtener 1,34 mg/mL y 3,3 mg/mL respectivamente. A través de comparar ambos valores con el obtenido en este trabajo se observa que se logró llegar a una concentración de proteína alta, además de observarse una línea única en el gel de purificación, por lo que el proceso consiguió obtener una concentración alta y con casi ningún contaminante detectable en electroforesis.

CONCLUSIÓN

Los análisis moleculares del plásmido de expresión pET-TolCr confirmaron que el mismo contenía la secuencia completa del gen que codifica para la proteína TolCr de *M. bovis*. Asimismo, se logró optimizar las condiciones óptimas para la expresión de la proteína recombinante TolCr, las cuales incluyen una temperatura de crecimiento/inducción bacteriana de 30°C con una duración de la inducción de 3h. Con respecto a la solubilidad de la misma se determinó que es una proteína que en ensayos a escala laboratorio se expresa de forma insoluble, se purificó y cuantificó obteniéndose una concentración final de 23,9 mg/mL.

PERSPECTIVAS

Para poder proponer a TolCr como un potencial componente de formulaciones vacunales contra la QIB deberían realizarse ensayos que permitan observar su potencial inmunogénico.

Inicialmente podría evaluarse la inmunogenicidad de TolCr *in vivo*, en un modelo animal de laboratorio (Towbin *et al.*, 1979). La proteína purificada se utilizaría para inmunizar ratones, utilizando un protocolo previamente desarrollado en nuestro laboratorio (Pellegrino *et al.*, 2003) y luego extraer suero para evaluar su inmunogenicidad mediante la técnica de *Western blot*.

Posteriormente, podrían cuantificarse los anticuerpos específicos anti-TolC generados naturalmente sin inoculación, en suero de bovinos sanos y con síntomas de QIB, utilizando la técnica de ELISA indirecto (Murphy *et al.*, 2009).

Estos ensayos iniciales podrán permitirnos determinar si la proteína genera respuestas de anticuerpos. En caso de que los resultados sean auspiciosos se podría proseguir con ensayos a campo de inoculación en bovinos para poder valorar la posible protección contra la QIB otorgada por la vacunación con el antígeno TolC de *M. bovis*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abeynayake, P., & Cooper, B. (1989.). The concentration of penicillin in bovine conjunctival sac fluid as it pertains to the treatment of *Moraxella bovis* infection.(II) Topical application. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics.*, 31-36.
- Achouak, W., Heulin, T., & Pagés, J. M. (2001.). Multiple facets of bacterial porins. *FEMS Microbiology Letters.*, 1-7.
- Acquistapace, S. (2014). Proteínas de membrana externa de *Moraxella bovis* y *Moraxella bovoculi* como componentes de vacunas contra la queratoconjuntivitis bovina. *Tesis de Grado*. Montevideo, Uruguay: Facultad de Ciencias, UDELAR, IIBCE.
- Acquistapace, S. (2018). Fimbrias y PME-CD de *Moraxella bovis* como posibles antígenos protectores contra la Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina. *Maestría en Biotecnología*. Montevideo, Uruguay: IIBCE.
- Acquistapace, S., Umpiérrez, A., Fernández-Ciganda, S., Sotelo-Silveira, J., & Zunino, P. (2021.). Proteína de membrana externa CD de *Moraxella bovis* como antígeno potencial contra la queratoconjuntivitis infecciosa bovina. *Veterinaria (Montevideo).*, 216-225.
- Alexander, D. (2010.). Infectious Bovine Keratoconjunctivitis: A Review of Cases in Clinical Practice. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice.*, 487–503.
- Andrews, S., C., Robinson, A., K., & Rodríguez-Quiñones, F. (2003.). Bacterial iron homeostasis. *FEMS microbiology reviews.*, 215-237.
- Angelos, J., A., Hess, J., & George, L. (2001.). Cloning and characterization of a *Moraxella bovis* cytotoxin gene. *American journal of veterinary research.*, 1222-1228.
- Angelos, J., A., Hess, J., F., & George, L., W. (2003.). An RTX operon in hemolytic *Moraxella bovis* is absent from nonhemolytic strains. *Veterinary microbiology.*, 363-377.
- Angelos, J., A., Hess, J., & George, L. (2004.). Prevention of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis with a recombinant *Moraxella bovis* cytotoxin-ISCOM matrix adjuvanted vaccine. *Vaccine.*, 537-545.
- Angelos, J., A., Spinks, P., Q., Ball, L., M., & George, L., W. (2007.). *Moraxella bovoculi* sp. nov., isolated from calves with infectious bovine keratoconjunctivitis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.*, 789–795.
- Angelos, J., A., (2010.). *Moraxella bovoculi* and Infectious Bovine Keratoconjunctivitis: Cause or Coincidence?. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice.*, 73–78.
- Angelos, J., A., Lane, V., Ball, L., & Hess, J. (2010b.). Recombinant *Moraxella bovoculi* cytotoxin-ISCOM matrix adjuvanted vaccine to prevent naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. *Veterinary research communications.*, 229–239.
- Angelos, J., A., Edman, J., & Chigerwe, M. (2014.). Ocular Immune Responses in Steers following Intranasal Vaccination with Recombinant *Moraxella bovis* Cytotoxin Adjuvanted with Polyacrylic Acid. *Clinical and Vaccine Immunology.*, 181–187.
- Angelos, J., A., (2015.). Infectious Bovine Keratoconjunctivitis (Pinkeye). *Veterinary Clinics: Food Animal Practice.*, 61-79.

- Annur, B., O., & Wilcox, G., E. (1985.). Adherence of *Moraxella bovis* to cell cultures of bovine origin. *Research in veterinary science.*, 241-246.
- Arnold, M. (2012.). Infectious Bovine Keratoconjunctivitis (Pinkeye) in Cattle. *University of Kentucky Collage of Agriculture.*, 1-4.
- Baptista, P. (1979.). Infectious Bovine Keratoconjunctivitis a review. *British Veterinary Journal.*, 225-242.
- Beard, M., K., & Moore, L. (1994.). Reproduction of bovine keratoconjunctivitis with a purified haemolytic and cytotoxic fraction of *Moraxella bovis*. *Veterinary Microbiology.*, 15-33.
- Bennett, R. (2003.). The 'direct costs' of livestock disease: the development of a system of models for the analysis of 30 endemic livestock diseases in Great Britain. *Journal of Agricultural Economics.*, 57-71.
- Bradford, M., M. (1976.). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry.*, 248-254.
- Brown, J., F., & Adkins Jr, T. R. (1972.). Relationship of feeding activity of face fly (*Musca autumnalis* DeGeer) to production of keratoconjunctivitis in calves. *American journal of veterinary research.*, 2551-2555.
- Brown, M., H., Brightman, A., H., Fenwick, B., W., & Rider, M., A. (1998.). Infectious Bovine Keratoconjunctivitis: A Review. *Journal of Veterinary Internal Medicine.*, 259-266.
- Buchanan, S., K. (1999.). Beta-barrel proteins from bacterial outer membranes: structure, function and refolding. *Current opinion in structural biology.*, 455-461.
- Bullock, W., Fernández, J., & Short, J. (1987.). XL1-Blue, high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with b-galactosidase section. *Biotechniques.*, 376-379.
- Clinkenbeard, D., & Thiessen, A. (1991.). Mechanism of action of *Moraxella bovis* hemolysin. *Infection and immunity.*, 48-52.
- Dalrymple, B., & Mattick, J. (1987.). An Analysis of the Organization and Evolution of Type 4 Fimbrial (MePhe) Subunit Proteins. *Journal of molecular evolution.*, 261-269.
- Dennis, E., J., & Kneipp, M. (2021.). A Review of Global Prevalence and Economic Impacts of Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice.*, 355-369.
- Fairman, J., W., Noinaj, N., & Buchanan, S., K. (2011.). The structural biology of β -barrel membrane proteins: a summary of recent reports. *Current opinion in structural biology.*, 523-531.
- Fenwick, B., Rider, M., Liang, J., & Brightman, A. (1996.). Iron repressible outer membrane proteins of *Moraxella bovis* and demonstration of siderophore-like activity. *Veterinary Microbiology.*, 315-324.
- Frank, S., K., & Gerber, J., D. (1981.). Hydrolytic Enzymes of *Moraxella bovis*. *Journal of Clinical Microbiology.*, 269-271.

- Fraser, J., & Gilmour, J. (1979.). The identification of *Moraxella bovis* and *Neisseria ovis* from the eyes of cattle and sheep. *Research in Veterinary Science.*, 127-128.
- Galdiero, S., Falanga, A., Cantisani, M., Tarallo, R., Della Pepa, M. E., D’Orlando, V., & Galdiero, M. (2012.). Microbe-Host Interactions: Structure and Role of Gram-Negative Bacterial Porins. *Current Protein and Peptide Science.*, 843-854.
- García, J., Santana, Z., Zumalacárregui, L., Quintana, M., González, D., Furrázola, G., & Cruz, O. (2013.). Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *VacciMonitor.*, 30-39.
- George, L., Borrowman, A., & Angelos, J. (2005.). Effectiveness of a cytolysin-enriched vaccine for protection of cattle against infectious bovine keratoconjunctivitis. *American journal of veterinary research.*, 136-142.
- González, A., & Fillat, M. (2018.). Aspectos metodológicos de la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista de Educación Bioquímica.*, 14-27.
- Gould, S., Dewell, R., Tofflemire, K., Whitley, R., D., Millman, S., T., Opriessnig, T., & O’Connor, A., M. (2013.). Randomized blinded challenge study to assess association between *Moraxella bovoculi* and infectious bovine keratoconjunctivitis in dairy calves. *Veterinary microbiology.*, 108-115.
- Gronenborn, B. (1976.). Overproduction of phage lambda repressor under control of the lac promotor of *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics.*, 243-250.
- Guerrero-Olazarán, M., Cab-Barrera, E., L., Galán-Wong, L., J., & Viader-Salvadó, J., M. (2004.). Biotecnología de Proteínas Recombinantes para la Aplicación en Acuicultura. *Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola.*, 418-440.
- Hannig, G., & Makrides, S., C. (1998.). Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends in biotechnology.*, 54-60.
- Hansen, R. (2001.). New tools in the battle against pinkeye. *Proceedings of Nevada livestock production annual update. Reno, University of Nevada.*, 5-8.
- Hemdan, E. (1989.). Surface topography of histidine residues: A facile probe by immobilized metal ion affinity chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, 1811-1815.
- Instituto Nacional de Carnes.* (noviembre de 2021). Obtenido de <http://www.inac.uy>
- Jackman, S., H., & Rosenbusch, R., F. (1984.). In vitro adherence of *Moraxella bovis* to intact corneal epithelium. *Current eye research.*, 1107-1112.
- Jayappa, H., G., & Lehr, C. (1986.). Pathogenicity and immunogenicity of pilated and nonpilated phases of *Moraxella bovis* in calves. *American journal of veterinary research.*, 2217-2221.
- Jayaraj, R., & Smooker, P., M. (2009.). So you Need a Protein - A Guide to the Production of Recombinant Proteins. *The Open Veterinary Science Journal.*, 28-34.
- Jeong, H., Barbe, V., Lee, C., H., Vallenet, D., Yu, D., S., Choi, S., H., . . . Kim, J., F. (2009.). Genome sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21 (DE3). *Journal of molecular biology.*, 644-652.

- Jia, B., & Jeon, C. (2016.). High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open biology.*, 160196.
- Kakuda, T., Oishi, D., Tsubaki, S., & Takai, S. (2003.). Molecular cloning and characterization of a 79-kDa iron-repressible outer-membrane protein of *Moraxella bovis*. *FEMS Microbiology Letters.*, 279-284.
- Kimple, M., & Sondek, J. (2004.). Overview of affinity tags for protein purification. En *Current protocols in protein science.* (págs. 1-19.). John Wiley & Sons, Inc.
- Koronakis, V., Eswaran, J., & Hughes, C. (2004.). Structure and function of TolC: The Bacterial Exit Duct for Proteins and Drugs. *Annual review of biochemistry.*, 467-489.
- Lepper, A., Moore, L., Atwell, J., & Tennent, J. (1992.). The protective efficacy of pili from different strains of *Moraxella bovis* within the same serogroup against infectious bovine keratoconjunctivitis. *Veterinary Microbiology.*, 177-187.
- Lepper, A., Elleman, T., Hoyne, P., Lehrbach, P., Atwell, J., Schwartzkoff, C., . . . Tennent, J. (1993.). A *Moraxella bovis* pili vaccine produced by recombinant DNA technology for the prevention of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Veterinary Microbiology.*, 175-183.
- Libardoni, F., Scherer, C., F., Farias, L., Vielmo, A., Balzan, C., & Vargas, A. C. (2012.). *Moraxella bovoculi* em casos de ceratoconjuntivite infecciosa bovina no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira.*, 743-746.
- Marrs, C., Rurhl, W., Schoolnik, G., & Falkow, S. (1988.). Pilin Gene Phase Variation of *Moraxella bovis* Is Caused by an Inversion of the Pilin Genes. *Journal of Bacteriology.*, 3032-3039.
- McConnel, C., Shum, L., & JK, H. (2007.). Infectious bovine keratoconjunctivitis antimicrobial therapy. *Australian Veterinary Journal.*, 65-69.
- Mitter, S., N. (1915.). Contagious ophthalmia among cattle. *Veterinary Journal.*, 28-29.
- Murphy, K., Travers, P., & Walport, M. (2009.). Apéndice I: caja de herramienta del inmunólogo. En *Inmunología de Janeway.* (págs. 735-732.). México, D.F.: McGraw-Hill interamericana editores, S.A.
- Overton, T., W. (2014.). Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug discovery today.*, 590-601.
- Pedersen, K., B., Froholm, L., O., & Bovre, K. (1972.). Fimbriation and colony type of *Moraxella bovis* in relation to conjunctival colonization and development of keratoconjunctivitis in cattle. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology and Immunology.*, 911-918.
- Pellegrino, R., Galvalisi, U., Scavone, P., Sosa, V., & Zunino, P. (2003.). Evaluation of *Proteus mirabilis* structural fimbrial proteins as antigens against urinary tract infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology.*, 103-110.
- Pettersson, B., Kodjo, A., Ronaghi, M., Uhlen, M., & Tsnjum, T. (1998.). Phylogeny of the family *Moraxellaceae* by 16s rDNA sequence analysis, with special emphasis on

- differentiation of *Moraxella* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 75-89.
- Piggot, T., J., Holdbrook, D., A., & Khalid, S. (2013.). Conformational dynamics and membrane interactions of the *E. coli* outer membrane protein FecA: a molecular dynamics simulation study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 284-293.
- Postma, G., Carfagnini, J., & Minatel, L. (2008). *Moraxella bovis* pathogenicity: An update. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 449–458.
- Pugh, G. (1969.). Characterization of *Moraxella bovis* and its relationship to bovine infectious keratoconjunctivitis. *Retrospective Theses and Dissertations*, 11-214.
- QIAGEN. (2003.). *The QIAexpressionist: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins*.
- Roca, P., Oliver, J., & Rodríguez, A., M. (2004.). *Bioquímica: técnicas y métodos*. Islas Baleares.: Hélice.
- Rocha Pizaña, M., D. (2005.). Utilidad de una etiqueta de poli-histidina para la purificación de la hormona del crecimiento bovino recombinante. *Doctoral dissertation*. (págs. 1-91.). Nuevo León.: Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Rollauer, S., E., Soorshjani, M., A., Noinaj, N., & Buchanan, S., K. (2015.). Outer membrane protein biogenesis in Gram-negative bacteria. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 1-10.
- Rossau, R., Van Landschoot, A., Gillis, M., & De Ley, J. (1991.). Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a New Bacterial Family To Accommodate the Genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and Related Organisms. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 310-319.
- Sackett, D., Holmes, P., Abbott, K., Jephcott, S., & Barber, M. (2006.). Assessing the economic cost of endemic disease on the profitability of Australian beef cattle and sheep producers. *Meat and Livestock Australia Ltd*.
- Sambrook, J., Fritsch, E., F., & Maniatis, T. (1989.). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY.: Cold spring harbor laboratory press.
- Simpson, C., White, F., & Sandhu, T. (1976.). The Structure of Pili (Fimbriae) of *Moraxella bovis*. *The Journal of experimental medicine*, 1-4.
- Smith, P., Blankenship, T., Hoover, T., Powe, T., & Wright, J. (1990.). Effectiveness of two commercial infectious bovine keratoconjunctivitis vaccines. *American journal of veterinary research*, 1147-1150.
- Sørensen, H., P., & Mortensen, K., K. (2005.). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology*, 113-128.
- Sørensen, H., P., & Mortensen, K., K. (2005b.). Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial cell factories*, 1-8.
- Sosa, V., & Zunino, P. (2012.). Molecular and phenotypic analysis of *Moraxella* spp. associated with infectious bovine keratoconjunctivitis in Uruguay. *The Veterinary Journal*, 595–597.

- Sosa, V., & Zunino, P. (2013.). Diversity of *Moraxella* spp. strains recovered from infectious bovine keratoconjunctivitis cases in Uruguay. *The Journal of Infection in Developing Countries.*, 819-824.
- Sosa, V., Umpiérrez, A., Acquistapace, S., & Zunino, P. (2015.). Virulence genes in *Moraxella* spp. isolates from infectious bovine keratoconjunctivitis cases. *The Journal of Infection in Developing Countries.*, 1028-1032.
- Studier, F., & Moffatt, B. (1986.). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. . *Journal of Molecular Biology.*, 113-130.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979.). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, 4350-4354.
- Walsh, G. (2005.). Biopharmaceuticals: recent approvals and likely directions. *Trends in biotechnology.*, 553-558.
- Yeruham, I., Perl, S., & Elad, D. (2001.). Infectious bovine keratoconjunctivitis and lymphofollicular hyperplasia of the third eyelid in heifers. *Journal of Veterinary Medicine.*, 137-141.
- Zbrun, M., Zielinski, G., Piscitelli, H., Descarga, C., Urbani, L., Defain Tesoriero, M., & Hermida, L. (2012.). Evaluation of anti-*Moraxella bovis* pili immunoglobulin-A in tears following intranasal vaccination of cattle. *Research in Veterinary Science.*, 183-189.