

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

**Trabajo de tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**Análisis de las propiedades inmunogénicas de las glicoproteínas
de envoltura del virus de Distemper Canino expresadas en
Pichia Pastoris**

TIZZANO, Marco Antonio

DIRECTOR: Ph.D. PECORARO, Marcelo Ricardo.

CODIRECTOR: Dra. GALOSI, Cecilia Mónica.

Cátedra de Virología

Facultad de Ciencias Veterinarias

MIEMBROS DEL JURADO:

Dr. Claus Juan

Dr. Mórtola Eduardo

Dr. Pidone Claudio

Año 2013

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, que me ha apoyado incondicionalmente. De no haber sido por todo lo que me brindaron, no hubiese sido posible llegar hasta acá.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias y a la Cátedra de Virología que me posibilitó el lugar de trabajo.

A la comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC) por haberme concedido estos años de beca que han posibilitado la realización de esta tesis

A mi director, Marcelo Pecoraro, por confiar en mí, por la paciencia, por haberme transmitido tantos conocimientos, por su comprensión y apoyo no solo en el ámbito laboral, siendo para mí un ejemplo a seguir en lo profesional como en lo humano

A mi codirectora, Cecilia Galosi, por siempre preocuparse por mí, por su contante apoyo profesional y el cariño diario.

A Gabriela Echeverría por estar siempre dispuesta a darme una mano.

A todo el personal de la Cátedra de Virología: Docentes, becarios, pasantes y no docentes.

Para cada uno de mis compañeros: Hernán, Nadia, Germán, Soledad, Javier, Alejandro, Matías, Laura y a todos quienes han pasado por el laboratorio, mi más profundo agradecimiento por haber compartido estos años y que siempre recordaré.

A todos y cada uno, Muchas Gracias

MAT

INDICE DE CONTENIDOS

| | |
|--|----|
| ABREVIATURAS Y SIMBOLOS | VI |
| RESUMEN | 1 |
| 1. INTRODUCCION | 3 |
| 1.1 Distemper Canino | 3 |
| 1.1.1 Taxonomía y características de la familia viral..... | 3 |
| 1.1.2 Morfología Estructura y composición del virión | 4 |
| 1.1.3 Propiedades fisicoquímicas | 8 |
| 1.1.4 Glicoproteínas..... | 8 |
| 1.1.5 Replicación | 11 |
| 1.1.6 Variabilidad | 12 |
| 1.2 Distemper Canino: Historia | 13 |
| 1.2.1 Epidemiología..... | 14 |
| 1.2.2 Patogenia..... | 14 |
| 1.2.3 Signos clínicos | 15 |
| 1.3 Diagnóstico | 17 |
| 1.4 Tratamiento | 17 |
| 1.5 Profilaxis y control por vacunación | 18 |
| 1.6 Expresión de proteínas recombinantes | 19 |
| 2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS | |
| 2.1 Hipótesis de trabajo | 21 |
| 2.2 Objetivos | 22 |
| 2.2.1 Objetivo general..... | 22 |
| 2.2.2 Objetivos particulares | 22 |
| 3. MATERIALES Y METODOS | 23 |
| 3.1 Materiales | 23 |

| | |
|--|-----------|
| 3.1.1 Cepas bacterianas..... | 23 |
| 3.1.2 Cepas de levaduras..... | 23 |
| 3.1.3 Virus células..... | 24 |
| 3.1.4 Animales de experimentación..... | 24 |
| 3.1.5 Vectores de clonado y expresión | 25 |
| 3.1.6 Medios de cultivo..... | 28 |
| 3.1.7 Anticuerpos para detección de proteínas recombinantes... | 30 |
| 3.2 Métodos generales..... | 31 |
| 3.2.1 Cultivos | 31 |
| 3.2.2 Transformación de bacterias competentes | 31 |
| 3.2.3 Extracción de ADN plasmídico | 32 |
| 3.2.4 Cuantificación de ácidos nucleicos y proteínas | 32 |
| 3.2.5 Electroforesis en geles de agarosa | 33 |
| 3.2.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 34 |
| 3.3 Construcción de los vectores de clonado..... | 35 |
| 3.3.1 Diseño de <i>primers</i> | 35 |
| 3.3.2 Obtención del ARN viral | 36 |
| 3.3.3 Transcripción reversa..... | 36 |
| 3.3.4 Amplificación por PCR..... | 37 |
| 3.3.5 Ligación en el vector pCRTPO21 | 38 |
| 3.3.6 Análisis de las colonias | 38 |
| 3.4 Expresión de la H y F en levaduras..... | 39 |
| 3.4.1 Construcción de los vectores de transferencia..... | 39 |
| 3.4.2 Obtención de las levaduras recombinantes..... | 40 |
| 3.4.3 Ensayos de expresión en <i>Pichia pastoris</i> | 43 |
| 3.4.4 Purificación de las proteínas..... | 44 |
| 3.4.5 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) . | 44 |

| | |
|--|-----------|
| 3.4.6 Anticuerpos policlonales..... | 44 |
| 3.4.7 Western Blot | 45 |
| 3.5 Ensayos de inmunogenicidad | 46 |
| 3.5.1 Inoculación de ratones | 46 |
| 3.5.2 Western Blot | 47 |
| 3.5.3 Neutralización viral..... | 48 |
| 4. RESULTADOS..... | 50 |
| 4.1 Construcción de los vectores de clonado..... | 50 |
| 4.2 Expresión de la H y F en levaduras | 61 |
| 4.3 Ensayos serológicos | 69 |
| 5. DISCUSION Y CONCLUSIONES | 73 |
| 6. BIBLIOGRAFIA..... | 81 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| Figura 1: Micrografía electrónica del virus de Distemper canino | 4 |
| Figura 2: Mapa del genoma de los morbillivirus | 5 |
| Figura 3: Estructura de los morbillivirus | 6 |
| Figura 4: Ciclo de Replicación de un morbillivirus | 12 |
| Figura 5: Mapa del vector de clonado pCR21TOPO | 26 |
| Figura 6: Vector de transferencia para levaduras pPIC 3.5 | 27 |
| Figura 7: Vector de transferencia para levaduras pPIC 9 | 27 |
| Figura 8: Placa de 96 pocillos utilizada para la neutralización viral. | 49 |
| Figura 9: Electroforesis de los fragmentos H yF ₀ amplificados por RT-PCR | 51 |
| Figura 10: Representación de los vectores pPCRTOPO-H | 52 |
| Figura 11: Representación de los vectores pPCRTOPO-F ₀ | 52 |
| Figura 12: Digestión de los vectores pPCRTOPO-H y pPCRTOPO-F ₀ | 53 |
| Figura 13: Esquema de los pasos para el clonado de F ₀ en el pPIC9 | 62 |
| Figura 14: Esquema de los pasos para el clonado de H en el pPIC9 | 63 |
| Figura 15: Análisis de los vectores pPIC9-H y pPIC9-F ₀ digeridos con <i>EcoRV</i> | 64 |
| Figura 16: PCR de las levaduras recombinantes para el gen H | 65 |
| Figura 17: PCR de las levaduras recombinantes para el gen F | 66 |
| Figura 18: Western Blot de la proteína F ₀ recombinante | 67 |
| Figura 19: Western Blot de la proteína H recombinante | 68 |
| Figura 20: Western Blot con los sueros de los ratones | 69 |
| Figura 21: Western Blot | 70 |
| Figura 22: Neutralización viral | 72 |

Abreviaturas y símbolos

| | |
|------------|---------------------------------|
| aa | Aminoácidos |
| Amp | Ampicilina |
| AX | Absorbancia a X nm |
| ADN | Acido desoxirribonucleico |
| ARN | Acido ribonucleico |
| <i>bla</i> | Gen de la β -lactamasa |
| BSA | Seroalbúmina bovina |
| cADN | ADN complementario |
| cm | Centímetro(s) |
| csp | Cantidad suficiente para... |
| DAB | Diaminobencidina |
| dNTPs | Deoxiribonucleósidos-trifosfato |
| DO600 | Densidad óptica a 600nm |
| dpi | Días post-infección |
| F | Proteína de fusión |
| g | Gramos |
| g/l | Gramos por litro |
| H | Hemaglutinina |
| His | Histidina |
| hs | Horas |
| im | Intramuscular |
| Kb | Kilo pares de bases |
| KDa | Kilodaltons |
| Lts | Litro |
| M | Concentración molar |
| mA | Miliampers |
| MCS | Sitio de Clonado Múltiple |
| mg | Miligramos |

| | |
|-----------|--|
| min | Minutos |
| ml | Mililitro |
| mm | Milímetros |
| mM | Milimolar |
| mARN | ARN mensajero |
| nm | Nanómetro |
| nt | Nucleótidos |
| ORF | Marco de lectura abierto |
| pb | Pares de bases |
| PBS | Buffer fosfato salino |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PMSF | Fluoruro de fenilmetilsulfonilo |
| (p/v) | Relación peso/volumen |
| (v/v) | Relación volumen/volumen |
| RNP | Ribonucleoproteína |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| S | Svedberg |
| seg | Segundos |
| SFB | Suero fetal bovino |
| TEMED | N,N,N,N'-tetrametiletildiamina |
| V | Voltios |
| vARN | RNA viral |
| wt | Wild type (cepa silvestre) |
| X-Gal | 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-tiogalactopiranosido |
| λ | Longitud de onda |
| μ g | Microgramos |
| μ l | Microlitros |
| μ m | Micrómetros |
| μ M | Micromolar |

RESUMEN

Análisis de las propiedades inmunogénicas de las glicoproteínas de envoltura del virus de Distemper Canino expresadas en *Pichia Pastoris*

Palabras clave: Virus de distemper canino- Hemaglutinina- Proteína de fusión- Vacuna.

El virus del distemper canino o CDV es un patógeno que afecta a los miembros de la familia *Canidae*, causando una enfermedad aguda, sistémica y frecuentemente mortal. Predispone al hospedador a las infecciones bacterianas secundarias y a posibles secuelas de tipo neurológico. La protección contra el CDV se logra a través de la vacunación. La mayoría de las vacunas se elaboran a partir de virus atenuado por pasaje en huevos embrionados o cultivos celulares. Sin embargo, estas vacunas han demostrado no proteger completamente contra la enfermedad y en muchos casos, han generado reacciones adversas que sugieren la necesidad del desarrollo de nuevas metodologías para su producción.

Teniendo en consideración los avances en biología molecular en relación con la producción de proteínas obtenidas de forma recombinante, se propuso como objetivo expresar y evaluar algunas de las proteínas virales utilizando un sistema heterólogo. Con esta metodología se eliminarían las desventajas de los métodos tradicionales. Además, ayudaría a disminuir notablemente los costos de producción.

Se trabajó sobre dos proteínas virales descritas como el blanco principal de los anticuerpos neutralizantes producidos luego de la infección: la hemaglutinina y la proteína de fusión. Ambas proteínas se expresaron en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*, obteniéndose las mismas de forma recombinante y en un alto grado de pureza. Luego, estas proteínas se emplearon para inocular ratones con el fin de comprobar su capacidad de estimular la respuesta inmune y analizar su capacidad neutralizante. Los resultados obtenidos sugieren que ambos polipéptidos han conservado los determinantes antigénicos presentes en la partícula viral y generaron una buena respuesta inmune. Por lo tanto podrían ser utilizados para el desarrollo de una vacuna a subunidades.

SUMMARY

Analysis of the immunogenic properties of the virus envelope glycoproteins of canine distemper virus expressed in *Pichia pastoris*

Key words: Canine distemper virus – Hemagglutinin - Fusión protein - Vaccine.

Canine distemper virus or CDV is a pathogen which affects members of the *canidae* family, causing an acute, often fatal systemic disease, predisposing to secondary bacterial infections and neurologic consequences. Protection through vaccination is based on immune system response against viral components. Most of current canine distemper vaccines are made from attenuated virus by passage in eggs or cell culture. However, these vaccines have shown not been fully protective against the disease and often generated adverse reactions, suggesting the need to design new vaccines.

Considering the progress on DNA technology in relationship with the production of recombinant proteins, it might be possible to develop a vaccine obtained from viral proteins expressed in an heterologous system. This will allow the preparation of large amounts of antigen, avoiding the disadvantages of the traditional methods and also might significantly decrease production costs.

To confirm this hypothesis, we were working on two glycoproteins: the hemagglutinin and the fusion protein. Both polypeptides are main target for neutralizing antibodies produced after infection. Both proteins were expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, obtained both in recombinant form and in high degree of purity. Later, in order to analyze their immunogenicity, the proteins were used to inoculate mice. The results suggested that the polypeptides have maintained the antigenic determinants present in virus particle generating a good immunoresponse and might become relevant for development of a subunit vaccine.

1. INTRODUCCION

1.1 DISTEMPER CANINO

1.1.1 Taxonomía y características de la familia viral

La enfermedad en caninos, conocida como moquillo canino, es producida por el virus del Distemper Canino o CDV, perteneciente al género *Morbillivirus*, el cual se encuentra clasificado taxonómicamente dentro de la familia *Paramyxoviridae* (Amude y col. 2010).

Según el International Comitee on Taxonomy of Viruses (ICTV), la familia *Paramyxoviridae* está compuesta por dos subfamilias, *Paramyxovirinae* y *Pneumovirinae*. La subfamilia *Paramyxovirinae* se divide en siete géneros, *Aquaparamyxovirus*, *Avulavirus*, *Ferlavirus*, *Henipavirus*, *Morbillivirus*, *Respirovirus* y *Rubulavirus*. Por otra parte, la subfamilia *Pneumovirinae* solo consta de dos géneros, *Pneumovirus* y *Metaneumovirus* (ICTV, 2011).

Los paramixovirus se caracterizan por poseer un genoma de ARN de simple cadena, con polaridad negativa, no segmentado y una ARN polimerasa encargada de sintetizar los ARN mensajeros, sin mediar ningún estadio de su ciclo viral en el que el ARN sea copiado a ADN, lo que coloca a estos virus dentro del Grupo V de la clasificación Baltimore (Diallo y col., 1990). Dentro del género *Morbillivirus* se encuentran virus que afectan a humanos y animales.

1.1.2 Morfología, estructura y composición del virión

Los virus del género *Morbillivirus* poseen una morfología pleomórfica; al ser observados mediante un microscopio electrónico presentan una forma esferoide con un

diámetro que oscila entre los 150 y los 300 nm (Fig.1). Son virus envueltos y en su superficie presentan proyecciones.

La masa molecular de los viriones es de 500×10^6 Da. Poseen además una densidad de flotación en CsCl de $1.18-1.31 \text{ g cm}^{-3}$ y en sacarosa de $1.18-1.2 \text{ g cm}^{-3}$. El coeficiente de sedimentación es de $1000 S_{20w}$.

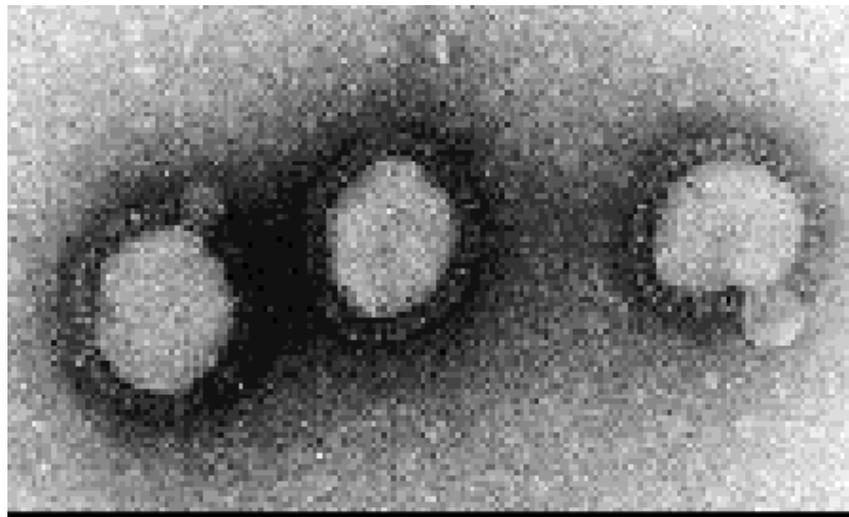


Figura 1: Micrografía electrónica del virus del Distemper canino.

La partícula viral está formada por una nucleocápside de naturaleza proteica, dentro de la cual se halla localizado el genoma viral de ARN de cadena simple y polaridad negativa. Este genoma posee una longitud de entre 15200 a 15900 nucleótidos y codifica para 6 proteínas estructurales: proteína de nucleocápside (N), fosfoproteína (P), proteína de gran tamaño (L), proteína de matriz (M), hemaglutinina (H) y proteína de fusión (F). Además codifica para dos proteínas no estructurales llamadas (C) y (V) (Vagnozzi y col. 2006) (Fig. 2 y 3).

Para la obtención de las proteínas virales, el ARN genómico debe ser transcrito, por la ARN polimerasa presente en el virión, en 6 ARNs mensajeros. Cada ARN mensajero se traducirá en uno de los polipéptidos antes mencionados (Barret y col., 1999, Diallo y col., 1990).



Figura 2: Mapa del genoma del *Morbillivirus*: Ubicación esquemática de los genes N (nt 108 - 1679), P (nt 1801- 3321), M (nt 3432 - 4439), F (nt 5277 - 6935), H (nt 7091 - 8905) y L (9t042- 15593) (Genome, NCBI).

En cada extremo del ARN genómico se hallan pequeñas regiones conocidas como *leader* con una longitud de 56 nucleótidos la correspondiente al 3' y de 37 nucleótidos la del 5'. Se especula que dichas regiones contienen promotores para la unión de la ARN polimerasa con el ARN en la nucleocápside y secuencias de nucleación para la encapsidación del genoma por la nucleoproteína (Diallo y col., 1990).

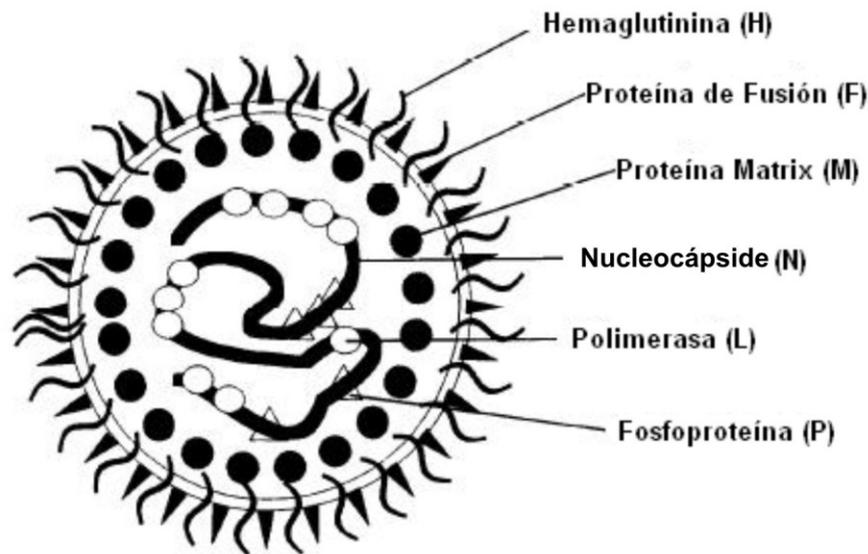


Figura 3: Estructura de los morbillivirus. Estructura del virus, donde se pueden observar las proteínas que lo conforman.

El genoma viral se encuentra protegido por la nucleoproteína N. Dicha proteína es la más abundante en el virión y es muy sensible a la proteólisis intracelular. La porción carboxilo terminal de la proteína N también interactúa con proteínas reguladoras celulares como el factor de regulación de interferon IRF-3, interacción vital para la eficiente replicación del virus (Tenover y col., 2002).

La proteína fosforilada P es esencial para la replicación del virus y está involucrada en todos los aspectos del ciclo viral. Unida a la proteína L integran el complejo de polimerasa (ARN polimerasa dependiente de ARN) encargado de la síntesis de ARN.

La proteína L se asocia al ARN encapsidado (N-ARN) a través de su interacción con la proteína P, quien actúa como enlace o adaptador, para formar el complejo de transcripción.

Las funciones de la fosfoproteína P durante la infección viral son: actuar como un trans-activador transcripcional al reclutar la proteína L sobre el templado formado por la proteína N y el ARN viral, unirse al N-ARN interactuando con regiones no codificantes del ARN genómico y prevenir la asociación espuria de la proteína N con ARN inespecífico, actuando como una chaperona, formando un complejo P-N soluble, que es además el precursor para la encapsidación del ARN viral recién sintetizado (Rima y col., 1983).

A partir de la secuenciación del gen codificante para la proteína P se hallaron dos marcos abiertos de lectura, uno para P y el otro para la proteína no estructural C. La proteína V es producto de la modificación post transcripcional del mRNA, la cual consiste en la adición de una guanidina en un sitio específico (sitio de edición), de modo que el nuevo mRNA traduce una proteína cuyo extremo N-terminal es similar al de la proteína P pero con un C-terminal propio de la proteína V y caracterizado por ser rico en cisteína.

Se ha postulado que la proteína C participa en el proceso de iniciación, extensión y terminación de la transcripción del mRNA viral. Por otra parte la proteína V interfiere con la respuesta de interferón (IFN), particularmente en la respuesta de IFN tipo I (IFN- α/β) (Cruz y col., 2006). Se ha sugerido que la proteína V actúa como una chaperona en el ensamblado de la nucleocápside y/o regula el cambio de la transcripción del mRNA hacia la síntesis del ARN anti-genómico (Vagnozzi y col., 2006).

La proteína L se encuentra en asociación con las proteínas N, P y el ARN genómico formando la nucleocápside. Cumple la función de ARN polimerasa dependiente de RNA (Sidhu y col., 1993, Vagnozzi y col., 2006).

La proteína de matriz juega un papel esencial en el ensamblado de los paramixovirus dado que sirve como unión entre la nucleocápside y las glicoproteínas de envoltura. Media la interacción del complejo ribonucleoproteína viral con regiones específicas de la membrana plasmática donde se encuentran las glicoproteínas de envoltura virales (Rima y col., 1983; Anderson y col., 2008; Dietzel y col., 2011).

1.1.3 Propiedades fisicoquímicas

La partícula viral es muy sensible al calor y a la luz ultravioleta. Se inactiva por el tratamiento a temperaturas entre 50 y 60° C durante 30 minutos.

En tejidos extraídos de perros infectados el virus sobrevive por lo menos una hora a 37° C y tres horas a 20° C o 24° C (temperatura ambiente).

La supervivencia del virus es mucho mayor a temperaturas frías, conservando la infectividad en el ambiente durante semanas a temperaturas entre 0° C y 4° C. En condiciones de laboratorio se mantiene infectivo durante varios años entre temperaturas de -70° C, o -192° C (nitrógeno líquido).

El virus es estable a PH entre 4,5 y 9,0. Al ser un virus envuelto es sensible al éter y cloroformo, soluciones de formalina diluida (0,5%), fenol (0,75%) y desinfectantes de amonio cuaternario (0,3%) (Gillespie y col., 1972).

1.1.4 Glicoproteínas

La envoltura está constituida por una doble capa lipídica derivada de la célula huésped. En la cara interna se encuentra la proteína de matriz y en su parte externa posee proyecciones o espículas formadas por dos glicoproteínas, la hemaglutinina H y la proteína de fusión F (Plattet y col., 2005).

La proteína de fusión F es una glicoproteína de tipo I, esencial para el ingreso y la diseminación del virus (Merz y col., 1980; Von Messling y col., 2001). Se sintetiza como una pre-proteína de 662 aminoácidos (pre F₀). Sin embargo algunos estudios sugirieron que el inicio de la traducción se puede dar tanto en el primer (AUG1) como en un segundo codón de inicio (AUG61) (Evans y col., 1990; Plattet y col., 2007).

Ambos precursores pre-F₀ (1) y pre-F₀ (61) son translocados dentro del lumen del retículo endoplasmático y son clivados entre los aminoácidos 135-136 por una peptidasa señal (SPase) (Plattet y col., 2007). Esto produce dos péptidos señal inusualmente largos de 135 o 75 aminoácidos dependiendo del codón de iniciación utilizado y un segundo precursor inmaduro F₀. Dentro del retículo endoplasmático se produce la oligomerización de F₀ dando lugar a la formación de trímeros. Luego el homotrímero es glicosilado y clivado en tres subunidades (F₁-F₂) unidas por puentes disulfuro, por una furina (serina proteasa del Golgi) (Plempner y col., 2003). A continuación la proteína madura se inserta en la membrana plasmática de la célula infectada (Plattet y col., 2007).

El peso molecular estimado de F₀ oscila entre 58 a 60 KDa y el de la subunidad F₁ es de aproximadamente 41 KDa (Iwatsuki y col., 1997). F₁ posee el dominio N-terminal del péptido de fusión (el cual se inserta en la membrana plasmática celular durante la fusión) (Paterson y col., 1987; Varsanyi y col., 1987), un dominio de transmembrana C-terminal y dos hepta repeticiones (HRA) y (HRB) las cuales son críticas para la fusión de membranas (Von Messling y col., 2004).

Por otra parte la subunidad F₂, de aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, se encuentra relacionada con la regulación de la fusión (Gardner y col., 2007).

La hemaglutinina H del CDV es una glicoproteína de tipo II de 604 a 607 aminoácidos (Curran y col., 1991). Su peso molecular varía entre 78 a 85 KDa en la forma glicosilada. Se sintetiza como un monómero en el retículo endoplásmico. Luego de la síntesis se producen dímeros de H mediante la unión por puentes disulfuro (Sato y col., 1981; Cherpillod y col., 1999).

A diferencia de la proteína homónima del virus del sarampión, la proteína H del virus no posee actividad de hemaglutinina. Además dichas proteínas de los miembros del género *Morbillivirus* carecen de actividad neuraminidasa (Lee y col., 2008).

La proteína H está constituida por una pequeña porción citoplasmática N-terminal de 34 aminoácidos, de los cuales 21 residuos forman parte de la región de transmembrana (Kövamees y col., 1991). Además posee un ectodominio C-terminal constituido por un tallo con una configuración de α -hélice el que soporta una cabeza globular, la cual contiene al sitio de unión al receptor celular y los sitios antigénicos (Zipperle y col., 2010).

La proteína H tiene ocho potenciales sitios de N-glicosilación, de los cuales cinco están distribuidos en la región carboxilo terminal. En el caso de la cepa vacunal Onderstepoort sólo están presentes 4 de los 8 probables sitios de glicosilación (Mochizuki y col., 1999, Iwatsuki y col., 1997).

Se han identificado los aminoácidos claves en la cabeza globular que regulan la actividad de unión al receptor CD150 (signal lymphocyte-activating molecule) o SLAM (Seki y col., 2003). Dichos residuos son conservados en todos los *Morbillivirus* (Y₅₂₅, D₅₂₆, R₅₂₉) (Zipperle y col., 2010).

La función de la hemaglutinina es la de producir la unión del virus con un receptor que se encuentra en la membrana plasmática celular. Esta unión desencadena una serie de cambios conformacionales en la proteína de fusión, de tal modo que la porción hidrofóbica

de dicha proteína se inserta en la membrana plasmática, provocando la fusión de las membranas y permitiendo que el virus ingrese a la célula (Stern y col., 1995, Von Messling y col., 2001).

1.1.5 Replicación

Las partículas virales reconocen a las células hospedadoras mediante la interacción de la hemaglutinina viral con dos receptores presentes en dos linajes celulares: la CD46, una proteína cofactor de unión de complemento que inhibe la activación de complemento y la CD150 o SLAM, un receptor de los linfocitos y células dendríticas, la cual participa en la activación de estas células (Tatsuo y col., 2001, Iorio y col., 2008).

Luego del reconocimiento del receptor en la membrana celular, la proteína H dispara una serie de cambios conformacionales sobre la proteína F en la cual la región hidrofóbica del péptido de fusión queda expuesta y se inserta en la membrana plasmática de la célula hospedadora induciendo la fusión de las membranas, permitiendo el ingreso del virus a la célula. Luego del ingreso, la polimerasa se asocia a la nucleocápside para la replicación y transcripción. A partir de la hebra ARN genómico se lleva a cabo la transcripción de los diversos genes virales. Una vez que existen componentes proteicos para formar suficientes viriones comienza la replicación, la cual consiste en la generación de copias de polaridad positiva a partir del ARN genómico, las cuales son denominadas antígenómicas y se utilizan como molde para la síntesis de ARN genómico. La partícula viral no necesita formarse para que se infecten otras células, ya que con la expresión de las glicoproteínas de envoltura se induce la fusión de la membrana de la célula hospedera con células vecinas y de esta manera se transfieren las nucleocápsides de una célula a otra sin exponerse al exterior de la célula (Figura 4).

Esta fusión de membranas ocasiona el efecto citopático de los paramixovirus, el cual es representado por la formación de células gigantes multinucleadas llamadas sincicios (Santos-Lopez y col., 2004).

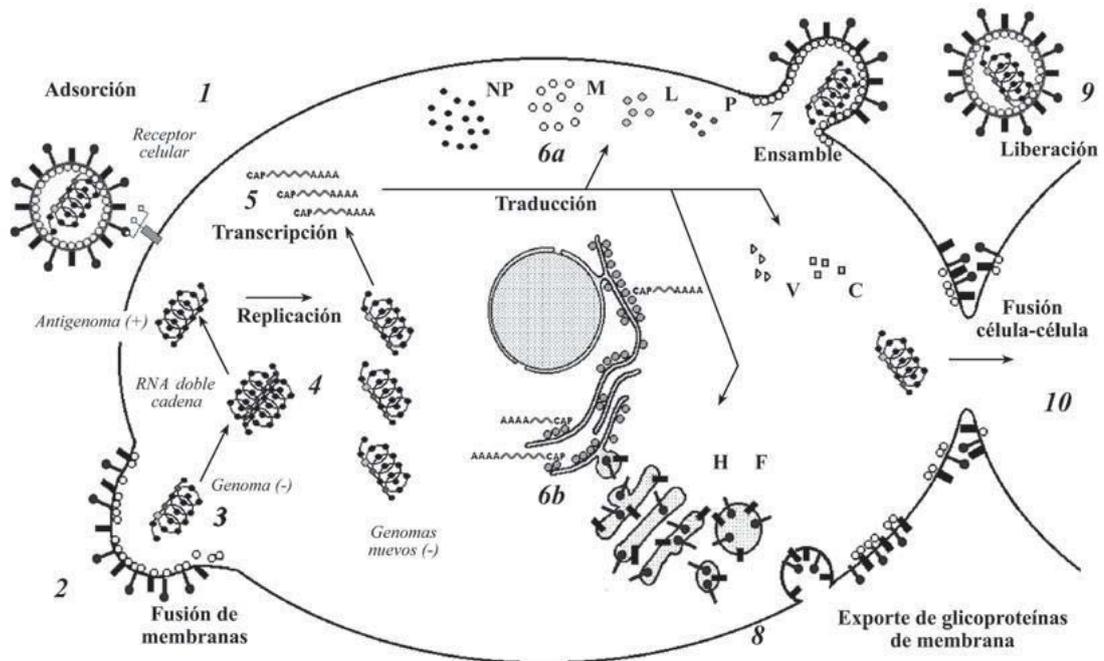


Figura 4: Ciclo de Replicación de un Morbilivirus: 1) Adsorción de la partícula viral a la membrana de la célula hospedera; 2) Fusión de las membranas celular y viral; 3) Liberación de la nucleocápside al citoplasma; 4) Síntesis de ARN de cadena positiva (antigenoma) y replicación de genoma; 5) Producción de ARN mensajero; 6a) Síntesis de proteínas virales; 6b) Las proteínas F y H son sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso y glicosiladas en el aparato de Golgi; 7) Las proteínas N, P y L son acopladas al ARN recién sintetizado y la proteína M se ubica en la parte interna de la membrana celular; 8) Las proteínas F y H son exportadas a la membrana citoplásmica en contacto íntimo con la proteína M; 9) La afinidad de las proteínas N, P y L con la M y ésta con la F y H es determinante para el ensamblaje del virión, el cual es liberado por exocitosis; 10) los viriones pueden infectar las células inmediatamente vecinas a través de la fusión membrana célula-célula, debido a la expresión de las proteínas virales en la membrana de la célula hospedera (Santos-Lopez y col., 1994)

1.1.6 Variabilidad

El CDV es un virus monotípico, definido mediante un suero policlonal. La simple exposición del huésped al virus confiere inmunidad de larga duración (Iwatsuki y col., 2000).

Estudios comparativos del virus han revelado que el gen H está sujeto a un gran número de cambios genéticos, que se traducen en grandes variaciones antigénicas, si se lo compara con los otros genes virales. Se calcula que para el gen H, la tasa de sustitución de nucleótidos es de 1.13×10^{-3} sustituciones/sitio/año (Pomeroy y col., 2008). Esta variación en la secuencia de nucleótidos produce cambios en los aminoácidos de la hemaglutinina los cuales pueden afectar a los sitios relacionados con la neutralización, debido a la disrupción de epítopes importantes.

La pronunciada diversidad genética en el gen H de los recientes aislamientos a campo del CDV puede alterar la antigenicidad de las nuevas cepas, con respecto a las cepas utilizadas como vacunas (Harder y col., 1996). Esto podría relacionarse con los episodios de distemper canino en animales vacunados (Martella y col., 2006).

1.2 Distemper Canino

Historia

El virus del distemper canino (CDV) se detectó en España en 1760 (Llang y col., 2008). Sin embargo, según Charles Federic Hensinger (1853), el CDV fue llevado desde Perú. En 1763, novecientos perros murieron en un solo día en Madrid. La enfermedad había sido descrita en 1764 por Ulloa en su trabajo “Relación histórica del viaje a América meridional”. En 1764 la enfermedad fue reportada en Inglaterra e Italia y en Rusia en 1770. En 1844, Karle tuvo éxito en la primera transmisión experimental de la enfermedad mediante el raspado de los labios de cachorros afectados. La primera descripción en detalle del distemper canino fue realizada por Edward Jenner en 1809 (Gillespie y col., 1972). Sin embargo el agente causal fue descubierto en 1905, fecha en que el virus fue aislado por Henri Carré, de allí el nombre de “Enfermedad de Carré”.

1.2.1 Epidemiología

El distemper canino es enzoótico y se encuentra distribuido por todo el mundo. Muchos carnívoros terrestres además de la familia *canidae* son susceptibles a la infección natural por CDV. Se observó en miembros de la familia *Mustelidae* (nutrias, hurones, martas), *Procyonidae* (coatí y mapache), *Hyaenidae* (hiena) y *Felidae* (félidos salvajes como leones, tigres, leopardos en cautiverio). También afecta a carnívoros marinos como las focas y a cetáceos como el delfín. Se han identificado diversos *Morbillivirus*: virus moquillo canino, virus moquillo focino, virus moquillo del delfín, virus moquillo de la marsopa (Appel y col., 1999, Beineke y col., 2007).

En el año (1994) un brote de CDV mató al 30% de los leones en el Parque Nacional Serengeti de Tanzania (Appel y col., 1999, Carpenter y col., 1998). Existen suficientes evidencias que las especies salvajes susceptibles a CDV actúan como reservorio del virus. En nuestro país, se detectaron casos letales en leones en un zoológico privado (Pecoraro y col., 2000; Teodoroff y col., 2000).

1.2.2 Patogenia

El CDV ingresa a las vías respiratorias, a través de aerosoles, infectando los macrófagos del tracto respiratorio superior. Luego se produce la replicación viral en los nódulos linfáticos locales y tras la infección inicial del epitelio alveolar, el virus permanece dos días en las células mononucleares de los ganglios linfáticos bronquiales y en las tonsilas (Beineke y col., 2007; Nielsen y col., 2009). Durante la primera semana, antes de la aparición de los signos clínicos, los virus asociados a las células se diseminan vía sanguínea hasta la médula ósea, el bazo, el timo, los ganglios linfáticos mesentéricos y cervicales y los macrófagos de la lámina propia del estómago e intestino delgado. La proliferación del CDV en estos sitios se

debe a la marcada linfopenia que presentan los perros infectados a causa del daño que provoca el virus en las células linfoides y que afecta tanto a las células T como a las B. Entre 3 - 6 días post-infección se eleva la temperatura coincidiendo con la aparición de interferón circulante (Von Messling y col., 2003). Al séptimo día aún no se encuentran anticuerpos, pero en algunos perros, los niveles de virus en suero sanguíneo alcanzan títulos de 1:100 o superiores al octavo o noveno día. En estos animales no existe posterior diseminación del virus y éste desaparece rápidamente de los tejidos linfáticos, evolucionando la enfermedad subclínicamente. Si al noveno día no existen anticuerpos detectables o al decimocuarto día no se ha alcanzado títulos de 1:100, el virus se propaga por todo el organismo. Además de continuar la infección de las células mononucleares del sistema linfático, se produce una infección generalizada del epitelio intestinal, respiratorio y urogenital, de piel y de glándulas endocrinas y exocrinas. Entre la segunda y tercera semana post-infección se inicia una fuerte respuesta inmune humoral y celular. Los perros con títulos altos de anticuerpos pueden recuperarse sin presentar signos clínicos posteriores.

Los animales infectados cuya respuesta inmune es débil, desarrollan la enfermedad con un curso agudo o subagudo. Los macrófagos y linfocitos infectados transportan al virus hacia el epitelio de los sistemas digestivo, respiratorio, urogenital y al sistema nervioso central (SNC) (Appel y col., 1999). La infección en este último se caracteriza por la escasa presencia de virus brotantes y la ausencia de destrucción celular, lo cual favorece al escape del virus al control del sistema inmune (Pearce-Kelling y col., 1990).

1.2.3 Signos clínicos

Los signos clínicos del Distemper canino varían desde inaparentes hasta una enfermedad severa según la cepa viral. Se puede presentar de varias formas (respiratoria, entérica o gastrointestinal, cutánea y nerviosa) (Okita y col., 1997; Moritz y col., 2000) y

varía según las condiciones ambientales, la edad y el estado inmunitario del animal. Los primeros signos aparecen al mismo tiempo que el primer pico febril. Después de varios días el animal vuelve a la temperatura normal y luego presenta una segunda fase de fiebre. Este segundo pico febril va acompañado de falta de apetito, erizamiento del pelo, inflamación y eritema de las amígdalas e inflamación en las conjuntivas y la mucosa nasal (Beineke y col., 2007; Von Messling y col., 2003). Las amígdalas suelen estar enrojecidas e inflamadas. Los pacientes presentan signos respiratorios coincidentemente con el segundo acceso febril, hay prurito nasal, la punta de la nariz se seca y agrieta y muestra depósitos hiperqueratósicos, existe secreción serosa o mucosa, más tarde purulenta y regularmente contiene estrías de sangre. La tumefacción intensa de la mucosa nasal hace que la respiración sea resollante. El catarro de la laringe y los bronquios se evidencia por tos, primero breve y seca, más tarde prolongada y húmeda y a veces, en forma de accesos espasmódicos. Se puede desarrollar una bronconeumonía. En la forma ocular, los pacientes, presentan fotofobia, catarro conjuntival, al que pueden asociarse queratitis parenquimatosa u obstrucción ulcerosa de la córnea. La pupila suele engrosarse, pero rara vez se desarrolla iritis grave con acumulación de exudado fibrinoso o purulento en la cámara anterior del ojo, excepto en casos que produce perforación de la córnea.

El sistema digestivo está igualmente implicado. La anorexia y la amigdalitis son signos precoces. Los vómitos en los que arrojan masas mucosas pigmentadas de amarillo por la bilis, y la diarrea, caracterizadas desde leves a intensas y frecuentes muy fétidas, mezcladas en ocasiones con mucosidades o con sangre, no aparecen por lo general hasta el final del primer acceso febril o durante el segundo y dan lugar a un rápido adelgazamiento, deshidratación y debilidad. Al mismo tiempo la mucosa bucal está seca y caliente y la lengua se observa ulcerada. (Astete Torrejón y col., 2004)

En la forma nerviosa puede haber embotamiento, somnolencia o estados de excitación con aullidos inmotivados y aumento de la agresividad. La sensibilidad incrementada o disminuida (hiperestesia o hipoestesia) son difíciles de apreciar si no dan motivo a la automutilación (Deem y col., 2000).

1.3 Diagnóstico

El diagnóstico del Distemper canino se basa en los signos clínicos. Sin embargo existe una batería de pruebas diagnósticas que pueden realizarse para confirmar la presencia del virus (Appel y col., 1999). Dichas pruebas son serológicas: Neutralización viral, ELISA, Inmunofluorescencia Indirecta (Frölich y col., 2000; Gencay y col., 2004). Existen además pruebas moleculares como la RT-PCR a partir de de sangre o secreciones (Frisk y col., 1999; Calderón y col., 2007). Posteriormente se han desarrollado técnicas de diagnóstico rápido basadas en inmuno cromatografía o cromatografías de flujo lateral que permiten tener un resultado en pocos minutos (An y col., 2008). Por otro lado también se puede realizar el aislamiento viral (Gillespie y col., 1972).

1.4 Tratamiento

En la actualidad no existe una droga antiviral específica que tenga efecto sobre el CDV, por lo tanto, el tratamiento es inespecífico. Toda vez que sea posible, se debe evitar tratar al paciente en forma intrahospitalaria por el riesgo de transmisión por aerosoles a otros animales. Los perros con infecciones respiratorias anteriores deben conservarse en ambientes limpios, calientes y sin corrientes. Es necesario limpiar los exudados oculares y nasales de la cara. La neumonía se complica con frecuencia por infecciones bacterianas

secundarias, requiriendo antibióticoterapia de amplio espectro, expectorante o nebulización (*UC Davis Koret Shelter Medicine Program, 2006*)

1.5 Profilaxis y control por vacunación

La forma más efectiva para el control del Distemper canino en los últimos 35 años ha sido la utilización de distintos tipos de vacunas. Sin embargo se han publicado algunos reportes sobre probables efectos indeseados a consecuencia de la vacunación, tales como encefalitis post vacunal (Cherpillod y col., 1999). El cachorro adquiere inmunidad pasiva contra el CDV de la madre. La mayor parte de estos anticuerpos derivados de la madre proceden del calostro absorbido durante la lactación en las primeras horas después del nacimiento. Los anticuerpos maternos desaparecen entre las 12 y 14 semanas de edad y, mientras están presentes, interfieren en la respuesta a la vacunación; por lo tanto, se administra una serie de vacunas e intervalos de 3 a 4 semanas entre las 6 y 16 semanas de edad (Appel y col., 1999).

Las primeras vacunas que se utilizaron contra el Distemper, en 1923, fueron preparadas con material de cerebro de perros muertos y tratadas con formalina. Estas vacunas no protegían contra la infección y tenían dudosos resultados de protección contra la enfermedad. La primera vacuna preparada, en 1945, con virus vivo modificado en hurones, producía la enfermedad y alta mortalidad. Posteriormente, en 1950, se preparó una vacuna en huevos embrionados y en cultivos celulares de embrión de pollo, utilizando las cepas Lederle y Onderstepoort. La cepa Rockborn replicada en cultivos de embrión de pollo producía una buena inmunidad, pero en algunos casos era responsable de encefalitis post-vacunal (Appel y col., 1999). Para la elaboración de la última serie de vacunas en 1987 se utilizó un vector vaccinia virus recombinante (Recombitek) el cual expresaba las proteínas

de envoltura. Esta vacuna inducía una buena respuesta inmunológica y no presentaba riesgo de enfermedad post vacunal (Taylor y col., 1991, Welter y col., 1999).

En la actualidad, mediante la tecnología de ADN recombinante se están estudiando el desarrollo de vacunas a ADN, en las cuales algunos genes virales son incorporados en plásmidos los cuales son administrados en animales (Jensen y col., 2009; Cherpillod y col., 1999).

Otra alternativa para la producción de vacunas contra el Distemper canino es la de obtener las proteínas del virus utilizando un sistema de expresión heterólogo. Dichas proteínas pueden ser administradas en animales (Norby y col., 1986).

1.6 Expresión de proteínas recombinantes

La producción de proteínas recombinantes funcionales se encuentra íntimamente relacionada con la maquinaria del organismo productor de esa proteína. *E. coli* ha sido la elección a la hora de expresar muchas proteínas, ya que su genoma se encuentra completamente mapeado y es relativamente fácil de manipular. Además crece rápido y posee pocos requerimientos nutricionales.

Sin embargo *E.coli* es un organismo procariota, por lo tanto carece de organelas intracelulares, tales como retículo endoplasmático y aparato de Golgi las cuales son responsables de las modificaciones de las proteínas producidas. Por lo tanto muchos polipéptidos eucariotas se producen en bacterias, no son funcionales ya que carecen de modificaciones postraduccionales tales como glicosilaciones (Makrides, 1996). Una alternativa para resolver estos problemas es utilizar sistemas de expresión en células de mamíferos o sistemas de expresión de levaduras.

Una de las levaduras más utilizadas es *Pichia pastoris* (*P.pastoris*). Esta levadura posee varias ventajas, dado que no tiene endotoxinas y utiliza metanol como fuente de carbono. El sistema de *P. pastoris* utiliza el promotor inducible por metanol (promotor alcohol oxidasa AOX1), que controla la expresión de la enzima alcohol oxidasa, la cual cataliza el primer paso en el metabolismo del metanol.

Las proteínas expresadas en este sistema, en general, se pliegan correctamente y se secretan al medio de cultivo. Un gran número de proteínas se han producido en este sistema, tales como el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B y un fragmento de la toxina tetánica, entre otras (Cino y col, 1999; Vassileva y col. 2001).

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPOTESIS DE TRABAJO

Teniendo en cuenta que la protección por medio de la vacunación se fundamenta principalmente en la respuesta del sistema inmune contra las proteínas del virus, es posible elaborar una vacuna contra el CDV a partir de una o más de las proteínas virales obtenidas en forma recombinante.

Las proteínas más adecuadas para el estudio son las dos glicoproteínas de envoltura del CDV, la hemaglutinina (H) y la proteína de fusión (F), pues son las que poseen mayor capacidad inmunogénica e inducen la producción de anticuerpos neutralizantes, confiriendo protección contra la enfermedad clínica.

La utilización del sistema de expresión de proteínas basado en la levadura *Pichia pastoris* permite la producción de gran cantidad de las proteínas recombinantes H y F, con capacidad de generar una respuesta inmune.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo general

Producir las proteínas de envoltura (H y F) del CDV en un sistema de expresión de levaduras de *P. Pastoris* y analizar sus propiedades inmunogénicas.

2.2.2 Objetivos parciales

- Expresar las glicoproteínas de envoltura H y F del CDV en un sistema de expresión eucariota de levaduras (*P.Pastoris*).

- Evaluar la respuesta inmune mediada por anticuerpos utilizando un modelo experimental (ratón BALB/c) inoculados con las proteínas recombinantes H y F.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Cepas bacterianas

TOP10F' (Invitrogen): Cepa de clonado de *E. coli*. Utilizada con el vector pCR2.1TOPO.

Genotipo: F' {*proAB*, *lacI^q*, *lacZΔM15*, Tn10(Tet^R)}, *deoR*, *RecA1*, *araD139*, *gal*, *rpsL(Str^R)*, *endA1*, *nupGλ-Δ(ara-leu)7697mcrA*, *Δ(mrr-mcrBC)*, *φ80lacZΔM15*, *ΔlacX74*.

Permiten la diferenciación de las colonias transformadas por el plásmido obtenido por la unión del producto de PCR con el vector pCR2.1.

3.1.2 Cepas de levaduras

GS115 (Invitrogen): Cepa para expresión de proteínas en *P. pastoris*. Genotipo: *his4*
Fenotipo: Mut⁺ His⁻.

Posee el fenotipo *wild type* (wt) para la utilización de metanol, puede crecer tanto en medios ricos como en medios mínimos suplementados con histidina.

KM71 (Invitrogen): Cepa para expresión en *P.pastoris*. Genotipo: *arg4 his4 aox1::arg4*. Fenotipo Mut^S Arg⁺ His⁻

La inserción del gen *arg4* dentro del gen *aox1* le confiere el fenotipo Mut^S (Methanol Utilization Slow) por lo que crece muy lentamente en medios mínimos con metanol como única fuente de carbono. Al igual que la cepa GS115 también es His⁻ y necesita el aporte de histidina en el medio de cultivo.

3.1.3 Virus y células

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó una cepa vacunal del CDV, la cual se encontraba almacenada en estado liofilizado en la Cátedra de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP). Para la multiplicación del virus se usó la línea celular VERO (riñón de mono) desarrollada con Medio Mínimo Esencial (MEM Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Internegocios), glutamina (0,03g/ml), penicilina 100 UI/ml y 100µg/ml de estreptomicina. Para el mantenimiento de las células se usó 2% de SFB.

Los cultivos celulares se realizaron en frascos descartables T-25 (Greiner-Bioscience) a 37°C en una estufa con 5% de CO₂ hasta llegar a confluencia.

La multiplicación del virus se evidenció por la aparición de efecto citopático (formación de sincicios) dentro de las 48 hs post-infección.

Luego de tres pasajes sucesivos del virus en cultivo celular, se procedió a titular la cepa viral empleando la metodología estándar de Reed y Muench, (1938). Se trabajó con una suspensión viral de 10³ DICC 50% / 50µl.

3.1.4 Animales de Experimentación

Para los ensayos se emplearon ratones machos BALB/c libres de patógenos, de 6 a 8 semanas de edad, provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Los animales fueron tratados en base a los lineamientos de la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” (Academy Press, 1996, Washington, USA, http://dels.nas.edu/ilar_n/ilarhome/).

3.1.5 Vectores de clonado y expresión

pCR2.1TOPO (Invitrogen): vector de clonado de 3.9Kb, desarrollado para clonar productos de PCR utilizando la enzima ADN-Topoisomerasa I en lugar de la ADN-Ligasa. La inserción del producto de PCR dentro del vector interrumpe el gen *lacZ*, por lo tanto las bacterias que hayan sido transformadas con este plásmido tendrán el fenotipo Lac⁻ y en presencia de un sustrato cromogénico como el Bluo-Gal o X-Gal no desarrollan color. Las bacterias que no posean el plásmido se verán de color azules. Esto facilita el *screening* de las colonias obtenidas.

El **pCR2.1TOPO** posee dos orígenes de replicación: pUC y de *f1*. Además contiene dos genes, *nptII* y *bla* que le confieren resistencia a Kanamicina y Ampicilina respectivamente y sitios de unión para *primers* universales M13 que sirven para verificar la presencia del inserto (Fig. 5).

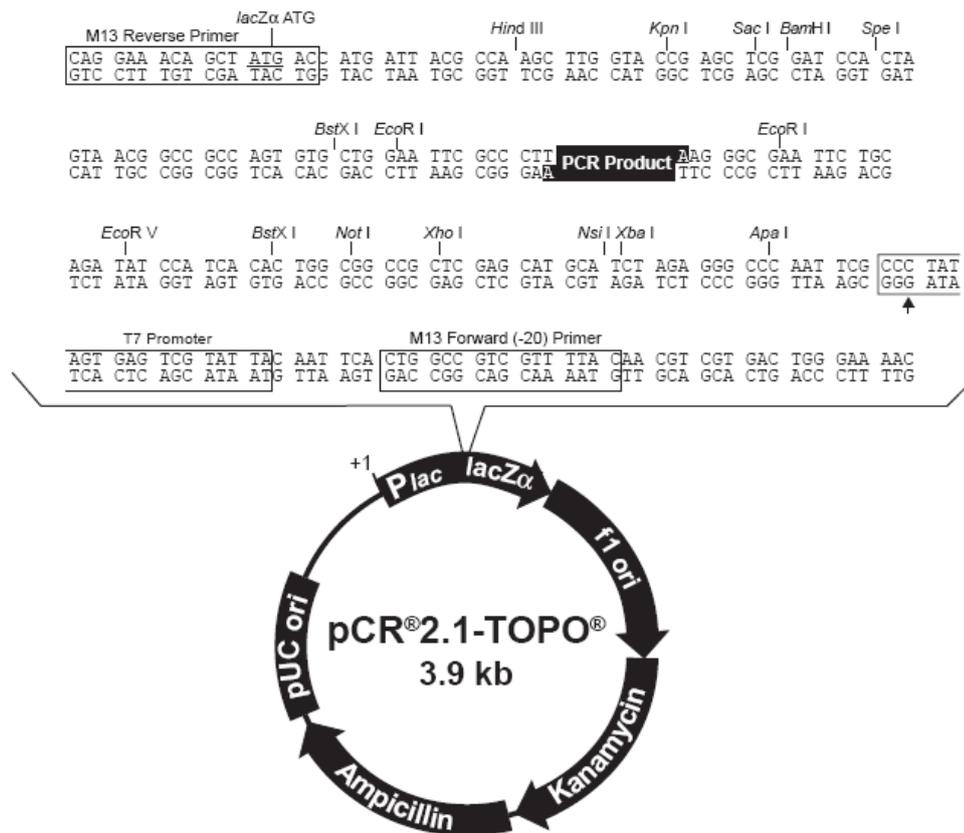


Figura 5: Mapa del vector de clonado pCR2.1TOPO: amp: gen de resistencia a ampicilina; kan: gen de resistencia a kanamicina; ori: origen de replicación.

pPIC3.5 (Invitrogen): Es un vector de transferencia para la expresión de proteínas en *P.pastoris*. El gen de interés se inserta en el MCS, entre el promotor y el terminador aox1. Posee además el origen de replicación de PBR322, que le permite replicar en bacterias, las cuales pueden ser seleccionadas por la resistencia a ampicilina. Al transformar las cepas de *P.pastoris* (KM71 o GS115) con este plásmido linealizado se produce una inserción del tipo Ω que genera el reemplazo del gen aox1 de la levadura por el fragmento que contiene el gen de interés, de modo que dicho gen se incorpora al genoma y se induce su expresión dada la presencia de metanol en el medio de cultivo. Durante el evento de recombinación el genoma de la levadura adquiere además el gen histidinol deshidrogenasa (*his4*) que le confiere el

fenotipo His⁺ y permite seleccionar las colonias recombinantes en placas de medio de cultivo mínimo sin histidina. (Fig. 6)

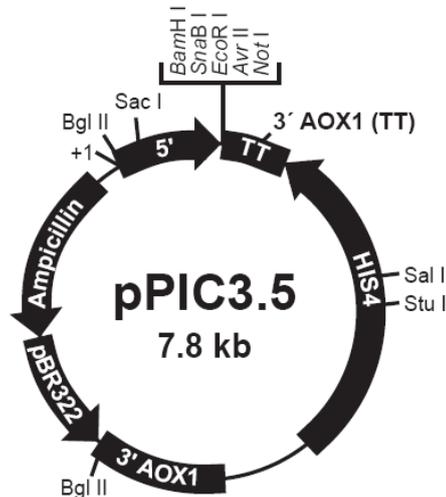


Figura 6: Vector de transferencia para levaduras **pPIC 3.5**. MCS: sitio de clonado múltiple; amp: gen de resistencia a ampicilina; his4: gen histidinol deshidrogenasa; ori: origen de replicación.

pPIC 9 (Invitrogen): Es un vector de expresión de *P.pastoris* similar al pPIC3.5, pero posee además un péptido señal derivado del factor α de *S.cerevisiae*, el cual al ser fusionado al gen de interés, permite la secreción de la proteína recombinante al medio extracelular. (Fig. 7)

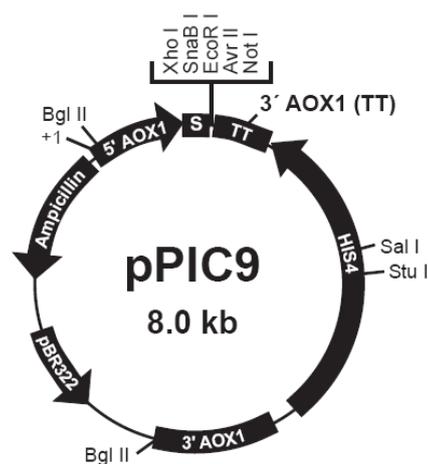


Figura 7: Vectores de transferencia para levaduras. MCS: sitio de clonado múltiple; amp: gen de resistencia a ampicilina; his4: gen histidinol deshidrogenasa; ori: origen de replicación.

3.1.6 Medios de cultivo

Medio LB: Utilizado para realizar cultivos y para el mantenimiento de las cepas bacterianas de *E.coli*.

| | |
|-------------------------------|-------|
| Bacto-Triptona (Difco) | 10g/l |
| Extracto de levaduras (Difco) | 5g/l |
| NaCl (Merk) | 10g/l |

Autoclavar a 121°C durante 20 min.

Para la realización de placas de LB sólido se agregan 15g/l de Bacto-agar (Difco) previo al autoclavado.

Para la selección con antibiótico, se deja enfriar a 55°C y luego se agrega 50µg/ml de ampicilina. Para la selección de colonias Lac⁻ agregar 0,5 mM de IPTG (Fermentas) y 80µg/ml de X-Gal (Promega).

Medio SOC: Utilizado para el crecimiento de cepas bacterianas luego de la transformación.

| | |
|-------------------------------|-------|
| Bacto-Triptona (Difco) | 10g/l |
| Extracto de levaduras (Difco) | 5g/l |
| NaCl (Merck) | 10g/l |
| MgSO ₄ (Merck) | 10M |
| MgCl ₂ (Merck) | 10mM |
| Glucosa (Wako) | 20mM |

Medio YPD: Medio rico utilizado para el crecimiento de las levaduras.

| | |
|-------------------------------|-------|
| Extracto de levaduras (Difco) | 10g/l |
|-------------------------------|-------|

Peptona (Difco) 20g/l

Dextrosa (Wako) 10g/l

Para placas agregar 15g/l de Bacto-agar (Difco)

Medio MD: Medio mínimo para levaduras.

1,34% de YNB (US Biological)

4×10^{-5} % de Biotina (Sigma)

2% Dextrosa (Wako)

Autoclavar a 121°C durante 20 min, dejar enfriar hasta 55°C y luego agregar la biotina previamente filtrada. Para placas se agrega 15g/l de Bacto-agar (Difco) antes de autoclavar.

Medio MM: Medio mínimo selectivo para discriminar los fenotipos Mut⁺/ Mut^S de *P.pastoris*.

1,34% de YNB (US Biological)

4×10^{-5} % de Biotina (Sigma)

0,5% de Metanol (Merck)

Autoclavar a 121°C durante 20 min, dejar enfriar hasta 55°C y luego agregar la biotina previamente filtrada y la cantidad apropiada de metanol. Para placas se agrega 15g/l de Bacto-agar (Difco) antes de autoclavar.

Medio MGY: Medio de crecimiento para *P.pastoris*.

1,34% de YNB (US Biological)

4×10^{-5} % de Biotina (Sigma)

1% de Glicerol (Merck)

Autoclavar a 121°C durante 20 min, dejar enfriar hasta 55°C y luego agregar la biotina previamente filtrada.

Medio BMM: Medio utilizado para expresión en *P.pastoris*.

1,34% de YNB (US Biological)

4x10⁻⁵% de Biotina (Sigma)

0,5% de Metanol (Merk)

Autoclavar a 121°C durante 20 min, dejar enfriar hasta 55°C y luego agregar la biotina previamente filtrada y el metanol.

3.1.7 Anticuerpos para detección de proteínas recombinantes

Anticuerpos específicos: Para el desarrollo de este trabajo se contó con anticuerpos policlonales contra el CDV, cepa Onderstepoort. Los anticuerpos fueron desarrollados en la Cátedra de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de UNLP, a través de la inoculación experimental de 50 µl de la vacuna por vía intramuscular en ratones BALB/c. Además se utilizó un suero policlonal proveniente de un canino infectado naturalmente.

Anticuerpos conjugados: Para realizar los Western Blots se utilizó un anticuerpo anti-IgG de ratón y también un anti-IgG de perro ambos conjugados con peroxidasa del rábano picante-HRP (Sigma Aldrich).

3.2 METODOS

3.2.1 Cultivos

Cultivos bacterianos: El crecimiento de las cepas bacterianas se realizó en medio LB líquido con agitación a 37°C. En particular para las bacterias recombinantes se utilizó ampicilina sódica (Sigma) con una concentración final de (50-100 µg/ml,) para mantener la presión de selección.

El mantenimiento de las cepas bacterianas y los clones recombinantes se realizó en placas de LB a 4°C durante un mes como máximo. Por otra parte para la conservación a largo plazo se utilizaron cultivos líquidos en medio LB a los que se les agregó 20% de glicerol y se congelaron a -70°C.

Cultivo de levaduras: El crecimiento de las cepas de levaduras se llevó a cabo en medio líquido YPD. El mantenimiento de las cepas y los clones recombinantes, se realizó en placas de YPD a 4°C durante un mes como máximo. Por otra parte para la conservación a largo plazo se utilizaron cultivos líquidos en medio YPD a los que se les agregó 20% de glicerol y se congelaron a -70°C.

3.2.2 Transformación de bacterias competentes

Las bacterias químicamente competentes utilizadas, se obtuvieron inoculando de forma estéril una colonia bacteriana y dejándola crecer *overnight* a 37°C con agitación. Al día siguiente se realizó una dilución del cultivo 1/50 con LB fresco. Se dejó crecer nuevamente a 37°C en agitación durante 2,5 hs hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,5. Luego se centrifugó el cultivo a 3000 rpm durante 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las bacterias en 0,5 ml de una solución 100 mM de MgCl₂. Se incubaron en hielo durante 15 min. A continuación se volvió a centrifugar la suspensión bacteriana en las

condiciones antes descritas. Posteriormente se incubaron en hielo en 0,5 ml de una solución 100 mM de CaCl_2 . Nuevamente se centrifugaron las bacterias y se resuspendieron en una solución mixta conteniendo partes iguales de MgCl_2 100mM y CaCl_2 100mM. Las bacterias químicamente obtenidas se utilizaron en el momento para la transformación o se almacenaron en alícuotas de 100 μl con 15% de glicerol durante un mes a -70°C .

Para realizar las transformaciones de *E.coli* se utilizaron de 100 a 200 ng de los productos de ligación o plásmidos purificados. Se llevaron a cabo en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml conteniendo 100 μl de la suspensión de bacterias químicamente competentes. La mezcla se incubó 10 minutos en hielo, luego se sometió a un choque térmico de 42°C durante 90 segundos y se colocó en hielo nuevamente durante 10 minutos. A continuación se añadieron 500 μl de de medio SOC y se dejó crecer por 2 horas con agitación a 37°C . Posteriormente se sembraron 100 μl del cultivo en placas con medio sólido (selectivo y/o diferencial) las cuales se incubaron a 37°C hasta observar la aparición de colonias.

3.2.3 Extracción de ADN plasmídico

Las extracciones de ADN plasmídico se realizaron a partir de 5 ml de cultivo líquido *overnight* de bacterias (con el antibiótico correspondiente), utilizando metodología previamente descrita por Birnbion y col. (1979).

3.2.4 Cuantificación de ácidos nucleicos

Las medidas de absorbancia se obtuvieron en un espectro SmartSpecTM 3000 (Bio-RAD) con cubetas de cuarzo de 1 cm, utilizando agua tridestilada como blanco.

Los ácidos nucleicos se cuantificaron por la medida directa de la absorbancia a 260 nm (A_{260}). La concentración de la muestra analizada se obtuvo a partir del producto del

valor Abs_{260} multiplicado por el factor de dilución (D) y por el coeficiente de extinción molar ($50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para ADN o de $40\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para el ARN). Por lo tanto la concentración de ácidos nucleicos en $\text{ng}/\mu\text{l}$ fue dada por las siguientes fórmulas:

$$[\text{ADN}] = 50 \text{ ng}/\mu\text{l}\cdot\text{D}$$

$$[\text{ARN}] = 40 \text{ ng}/\mu\text{l}\cdot\text{D}$$

En todos los casos se estimó el grado de pureza de las muestras analizadas mediante el cociente de absorbancias A_{260}/A_{280} . Una relación cercana a 1,8 indicó que una muestra de ADN se encontraba pura, mientras que para el ARN el valor del cociente se acercó a 2. Según Davis y col., (1994) los valores por debajo de 1,6 no son confiables ya que las muestras pueden estar contaminadas, generalmente con proteínas.

Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó midiendo simultáneamente las absorbancias a 260, 280 y 320 nm de una muestra problema. La concentración de las proteínas de la muestra expresada en mg/ml se halló con la siguiente expresión desarrollada por (Layne E., 1957):

$$[\text{Proteínas}] = 1,55(A_{280} - A_{320}) - 0,76(A_{260} - A_{320}) \text{ mg/ml}$$

3.2.5 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

El ADN se analizó mediante electroforesis en minigeles horizontales ($5\times 6,5$ cm) de agarosa D1-LE (Biodynamics) con una concentración de 0,7 al 2%, en función de los fragmentos a analizar. Se utilizó un buffer de corrida TBE 0,5X: 45mM tris (Invitrogen), 45mM ácido bórico (Anedra), 1mM EDTA (Merck) pH: 8. Las muestras se cargaron en el gel luego de agregarles un 20% del volumen de buffer de carga (10mM Tris-Cl-pH 7,6;

0,03% de azul de bormofenol y 60 % de glicerol). Se emplearon distintos marcadores de peso molecular: λ HindIII, λ EcorI-HindIII y el 100bp Marker (Promega) de acuerdo al tamaño del fragmento a analizar.

Para la visualización del ADN luego de la electroforesis, se tiñó el gel por difusión pasiva en una solución 0,1 μ g/ml de bromuro de etidio (Sigma Aldrich) durante 30 minutos. Los geles se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

3.2.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se efectuaron en tubos de 0,2 ml de pared fina con un volumen de 25 μ l de una mezcla de reacción preparada del siguiente modo:

| | |
|--------------------------|----------------|
| Buffer 10X | 2,5 μ l |
| MgCl ₂ (25mM) | 1,5 μ l |
| dNTPs (10mM) | 0,75 μ l |
| Primer F (10 μ M) | 0,5 μ l |
| Primer R (10 μ M) | 0,5 μ l |
| Taq-DNA pol (Fermentas) | 0,25 μ l |
| Molde | |
| Agua | csp 25 μ l |

Las secuencias de los *primers* utilizados para este trabajo se detallan en las secciones (3.3.1 y 3.4.2).

En las PCR realizadas se incorporó un tubo control de contaminación sin molde, un control positivo en caso de contar con uno y un control negativo. Los productos obtenidos se almacenaron a -20°C.

3.3 CONSTRUCCION DE LOS VECTORES DE CLONADO

3.3.1 Diseño de primers

Se diseñaron dos pares de *primers* capaces de amplificar la región comprendida entre los nucleótidos 7079 y 8893 (gen H) y la región comprendida entre los nucleótidos 5328 y 6923 (gen F), del genoma del (CDV) cepa Onderstepoort.

La secuencia del genoma viral utilizada para el diseño de los pares de primers se obtuvo a partir de la base de datos del GenBank.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank?index.html>).

El análisis de secuencias se realizó a partir del genoma completo del CDV cepa Onderstepoort, utilizando el programa Vector NTI 11 (Invitrogen). Una vez obtenidas las secuencias de nucleótidos codificantes para H se diseñaron los siguientes primers:

HF: 5' TGGCGCCATGCTCTCCTACCAAGACAAG 3'

HR; 5' GTGCGGCCGCTTAACGGTTACATGAGAATC 3'

Se mantuvieron los codones de inicio y terminación propios del gen y se agregaron sitios de reconocimiento para endonucleasas de restricción *EheI* y *NotI* en los primers HF y HR respectivamente.

Los primers que se obtuvieron para el gen F corresponden al precursor proteico F₀:

F₀F: 5' AGGCCTATGCCAGTCTCTTTCTTTGTT 3'

F₀R: 5' GCGGCCGCTCAGTGTGATCTCACATA 3'

Se conservaron los codones de inicio y terminación propios del gen y se les agregaron sitios para las endonucleasas de restricción *StuI* y *NotI* para F₀F y F₀R respectivamente.

A partir de las secuencias de los primers obtenidas se realizó un alineamiento local en (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) para comprobar su especificidad.

3.3.2 Obtención del ARN viral

Se realizó la extracción de ARN viral con Trizol (GibcoBRL) utilizando una adaptación del protocolo original. Se tomaron 300µl de una suspensión de virus vacunal cepa Onderstepoort con un título de 10⁵ TCID 50/ml y se le añadieron 500µl de Trizol y 220µl de cloroformo (Merk). La mezcla obtenida se agitó vigorosamente con un vórtex durante 10 minutos. Luego se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido de (600µl) se transfirió a un tubo nuevo conteniendo 750µl de isopropanol (Anedra) y luego de mezclar por inversión se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min a 4°C. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet obtenido con 750µl de etanol al 70%. Finalmente el ARN se resuspendió en 15µl de agua libre de nucleasas. Se estimó la concentración y el grado de pureza por espectrofotometría.

3.3.3 Retrotranscripción

Se realizó la transformación del ARN obtenido anteriormente a ADN complementario cADN mediante una reacción de retrotranscripción, utilizando una enzima retrotranscriptasa del virus de la Leucemia Murina de Moloney MMLV (Promega).

Se partió de 10µl (3,7µg) de ARN extraído al cual se le agregaron 2µl de *Random primers* [2µg/µl] (Biodynamics) y 3µl de agua. Se calentó la mezcla anterior durante 5 min

a 70°C. Luego se colocó en hielo 2 minutos y posteriormente se le agrego una solución compuesta por:

1µl de Enzima MMLV [200]

5µl de buffer 5X provisto con la enzima

1µl de de una solución de dNTPs [200 µM]

1µl de inhibidor de RNAsas (RNAsin) [40U]

2µl de agua

Se incubó la mezcla obtenida anteriormente a 37°C durante una hora y media.

3.3.4 Amplificación por PCR

Las reacciones de amplificación de los fragmentos se llevaron a cabo según el protocolo estándar utilizando la siguiente combinación de primers HF-HR y F₀F- F₀R respectivamente.

En ambos casos se tomaron 5µl del cADN previamente obtenido. El perfil de ciclado para realizar cada PCR se detalla en la siguiente tabla:

Tabla 1: Perfil de ciclado

| | |
|---------------------------|-----------------|
| Desnaturalización Inicial | 4 Min/ 94 °c |
| Desnaturalización | 1:20 min/ 94 °c |
| Annealing | 1:20 min/ 59 °c |
| Extensión | 2 min/ 72 °c |
| Extensión Final | 5 Min/ 72 °c |
| Nº de Ciclos | 30 |

Se utilizó el mismo perfil de ciclado para las PCR de H y F porque las temperaturas de *annealing* de los primers era similar.

Para verificar los resultados obtenidos se sembraron 5µl de los productos de las RT-PCR en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE (Sección 3.2.6)

3.3.5 Ligación en el vector pCR2.1TOPO

Luego de corroborar que el tamaño de los productos de PCR fuera el adecuado, se clonaron directamente en el vector pCR2.1TOPO. Las reacciones de ligación se llevaron a cabo a partir de 4µl del producto de PCR al cual se le agregó 1µl de una solución 1,2M de NaCl y 1µl (vector, buffer y enzima topoisomerasa). Las mezclas de ligación se incubaron durante 20 min a 20-22°C. Inmediatamente después se transformaron bacterias *E.coli* (cepa top 10) químicamente competentes mediante shock térmico. Luego se sembraron en placas de LB Amp, IPTG y X-Gal (Secciones 3.1.6 y 3.2.1).

3.3.6 Análisis de las colonias

Dado que en el sistema de clonado empleado los fragmentos de PCR pueden unirse al vector de dos formas distintas, se generaron dos construcciones para cada uno de los insertos clonados, los cuales se denominaron: pTOPO HI, pTOPO H II, pTOPO FI y pTOPOFII.

Para verificar la presencia y orientación de los productos clonados, se tomaron 10 colonias blancas al azar de cada una de las construcciones y se realizaron cultivos líquidos de 1 ml en medio LB con Amp a 37°C con agitación. A partir de dichos cultivos se extrajo el ADN plasmídico mediante miniprep y posteriormente se digirió con enzimas de restricción para verificar la identidad de los productos clonados.

Las digestiones de las construcciones obtenidas a partir del fragmento H con *XbaI* da dos posibles patrones de bandas: 5122 y 641 bp (TOPO-HI) o 4464 y 1299 bp (TOPO-HII), debido a la orientación en la que ingresó el fragmento. En el caso de F₀ se obtuvo el

siguiente patrón de bandas al digerir el ADN plasmídico con *EcoRV*: 4565 y 994bp (TOPO-FI) o 4887 y 672 bp (TOPO-FII).

Finalmente los ADNs plasmídicos de cada una de las construcciones se purificaron mediante un kit comercial QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Los fragmentos clonados se enviaron a secuenciar para comprobar la identidad y la continuidad del marco de lectura.

Una vez secuenciados, los clones positivos se almacenaron a -70°C hasta el momento de realizar el subclonado y expresión.

3.4 EXPRESION DE LA H Y LA F₀ EN LEVADURAS

3.4.1 Construcción de los vectores de expresión en *P.pastoris*

Se construyeron dos vectores para la expresión de H y F₀ en *P.pastoris* a partir del plásmido pPIC9. En ambos casos los marcos de lectura que codifican para H y F₀ se colocaron bajo el control del promotor AOXI (inducible por metanol). Además las proteínas resultantes quedan fusionadas al factor α (es un péptido señal que dirige la secreción de las proteínas al medio de cultivo).

Para comenzar la construcción de los vectores de expresión se digirieron 2 μg del TOPO-FII previamente obtenido por miniprep, con 2 μl de la enzima *StuI* (10U/ μl) (Promega), 4 μl de buffer en un volumen final de 40 μl . La digestión se incubó durante 18 hs a 37°C . Posteriormente se precipitó el vector digerido con 500 μl de etanol según el protocolo (miniprep). El pellet obtenido se resuspendió en 34 μl y luego se digirió con 2 μl de la enzima *NotI* (10U/ μl) (Promega), 4 μl de buffer y un volumen final de 40 μl . La mezcla obtenida se incubó durante 18hs a 37°C . A continuación se inactivó la enzima a 65°C durante 15 minutos.

Se digirió el vector TOPO-HI con las enzimas *EheI* (Fermentas) y con *NotI* y el pPIC9 con la enzimas *SnaBI* (Promega) y *NotI* (Promega) siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. Posteriormente se sembró la totalidad del volumen de cada digestión en un gel al 1% de agarosa y se separaron los fragmentos de restricción por electroforesis a 100V (sección geles). Las bandas correspondientes a los fragmentos H, F₀ y el vector se obtuvieron a partir del gel y se purificaron utilizando un Kit comercial Wizard SV (Promega) siguiendo las instrucciones apropiadas.

Luego se procedió a cuantificar las muestras purificadas mediante espectrofotometría (sección 3.2.5) y en función de los resultados obtenidos se procedió a realizar la ligación de los distintos fragmentos y el vector.

Las ligaciones pPIC9-H y pPIC9-F₀ se realizaron a partir de 100ng de vector (2μl), 180 a 200ng de inserto (5μl), utilizando 1μl (10U) de T4 DNA Ligase (Promega), 1μl de buffer 10X y con un volumen final de 10μl. Se incubaron durante 18 a 20hs a 4°C. Con los productos de ligación (4μl) se transformaron bacterias químicamente competentes (*E.coli* Top 10). Las bacterias se plaquearon en medio LB Amp (sección 3.2.1)

A continuación se extrajo el ADN plasmídico de las colonias obtenidas para pPIC9-H, pPIC9-F₀. Luego se digirieron los plásmidos recobrados con las enzimas de restricción, *XbaI* para el pPIC9-H y *EcoRV* para el pPIC9-F₀ con el fin de verificar la presencia de los insertos.

3.4.2 Obtención de las levaduras recombinantes

A fin de generar la recombinación homóloga entre el genoma de las levaduras y el vector de transferencia, el pPIC9-H y el pPIC9-F₀ se linealizaron con la enzima *BglII*. Para ello se utilizó en cada caso 5μg de vector, 3μl de enzima y 4μl de buffer en un volumen

final de 40 μ l. Cada digestión se incubó durante 18hs a 37°C. Luego se inactivó la enzima a 65°C durante 15 min.

Para obtener las levaduras electrocompetentes, se inoculó una sola colonia de la cepa GS115 en 10 ml de medio YPD contenido en un erlenmeyer de 100 ml con tapa a rosca. Se crecieron las levaduras durante 18 a 20 hs con agitación a 30°C. Al día siguiente se re inoculó el cultivo en 100 ml de YPD y se creció hasta llegar a una DO₆₀₀ de 1,5.

Luego se centrifugaron las levaduras a 2000 rpm a 4°C y se resuspendieron en 20 ml de YPD suplementado con 4 ml de buffer HEPES 1M pH: 8,00. A continuación se les agregó 0,5 ml de DTT 1M, se mezclaron por inversión y se incubaron 15 minutos a 30°C. Posteriormente se llevó el volumen a 50 ml con agua estéril a 4°C. Se centrifugaron y lavaron con 50 ml de agua fría. Nuevamente se centrifugaron y se resuspendieron en 4 ml de sorbitol 1M (Anedra) frío. Se centrifugaron una vez más y se resuspendieron en 0,5 ml de sorbitol frío. El volumen final, incluidas las levaduras, resultó ser de 1,0 ml. Luego se distribuyeron 40 μ l de las levaduras competentes en tubos de microcentrífuga de 1,5ml y se congelaron a -70°C hasta su utilización.

Se procedió a transformar rápidamente las levaduras con las construcciones linealizadas, ya que la eficiencia de transformación disminuye al congelarlas. A cada tubo conteniendo 40 μ l de levaduras GS115 competentes se le agregó 1 μ g de plásmido pPIC9-H o pPIC9-F₀, se transfirieron a una cubeta de electroporación de 2 mm de separación y se incubaron en hielo 5 minutos. Se transformaron las levaduras utilizando un electroporador Cell-Porator (Gibco), mediante un pulso de 480V, con una capacitancia de 10 μ F y baja resistencia (Ω low). Luego de la electroporación se añadió a cada cubeta 1ml de sorbitol frío. De allí se tomaron 600 μ l y se plaquearon en placas MD hasta la aparición de las colonias. Las colonias crecidas en estas placas se repicaron en placas MM (medio mínimo con

metanol sin histidina) y se crecieron durante 48hs a 30°C. Luego de identificar las colonias con el fenotipo adecuado, se confirmó la presencia de los fragmentos H o F₀ mediante colony-PCR con los primers 5AOX y 3AOX. Para ello se tomó con la punta de un tip de micropipeta una porción de cada colonia se solubilizó con 5µl de buffer de reacción de la Taq polimerasa. Por otra parte se preparó la siguiente mezcla: 1µl de dNTPs, 0,5µl de cada primers 5AOX y 3AOX, 1,5µl de MgCl₂ (25mM) y H₂O csp 19,5µl. Posteriormente se agregaron 19,5µl de la mezcla a cada tubo conteniendo una colonia y se incubaron a 95°C durante 7min. Luego se les agregó a cada tubo 0,5µl de la enzima Taq polimerasa y se realizó la PCR utilizando el siguiente ciclado:

Tabla 2: Ciclado PCR-AOXI

| | |
|---------------------------|---------------|
| Desnaturalización Inicial | 5 Min/ 95 °c |
| Desnaturalización | 1 min/ 95 °c |
| Annealing | 1 min/ 57 °c |
| Extensión | 2 min/ 72 °c |
| Extensión Final | 10 Min/ 72 °c |
| Nº de Ciclos | 30 |

Secuencia de los primers AOX utilizados:

5AOXI: 5' GACTGGTTCCAATTGACAAGC 3'

3AOXI: 5' GCAAATGGCATTCTGACATCC 3'

Luego de realizar la PCR, se corrió un gen de agarosa al 1% para verificar la presencia de los genes H o F₀ integrados al ADN de las levaduras. Los clones positivos se almacenaron en medio YPD con glicerol al 20% a -70°C hasta su utilización.

3.4.3 Expresión de H y F₀ en *P.pastoris*

Para comprobar la expresión de las proteínas recombinantes H y F₀, se realizaron cultivos líquidos de los clones GS115-H y GS115-F obtenidos, en 100ml de medio MGY (Sección 3.1.6) en erlenmeyers de 500ml. Los cultivos se incubaron en un agitador orbital a 120 rpm durante 20hs hasta alcanzar un DO₆₀₀ de 4-6. Luego las levaduras se recolectaron en esterilidad y se centrifugaron a 3000 rpm durante 15min a temperatura ambiente.

La inducción de la expresión se realizó en medio BMM (sección 3.1.6). Para ello los pellets celulares se resuspendieron en la décima parte del volumen inicial y fueron cultivados durante 5 días a 30°C con agitación (120 rpm). Cada 24hs se tomaron muestras de los cultivos para analizar los extractos celulares crudos y/o las proteínas secretadas por SDS-PAGE y Western Blot. La inducción de la expresión se mantuvo mediante el agregado de metanol 100% cada 24hs hasta alcanzar una concentración final de 0,5%.

3.4.4 Purificación de las proteínas recombinantes

Una vez realizados los cultivos, se recolectaron los sobrenadantes por centrifugación y se precipitaron las proteínas con SO₄ (NH₄)₂ al 60% mediante centrifugación a 5000 rpm durante 60 minutos. Luego se eliminó el sulfato de amonio realizando una extracción con metanol/cloroformo.

Posteriormente se cuantificaron las proteínas mediante espectrofotometría UV.

3.4.5 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las proteínas se analizaron siguiendo los lineamientos del método de Laemmli y col. (1970); Sambrook y col., (1989). Para las corridas se utilizó un sistema vertical con un gel separador de 5x8,2 cm con una concentración de acrilamida del 10% y un gel de apilamiento de 1,5x8,2 cm con un 5% de acrilamida.

Las electroforesis fueron llevadas a cabo a un voltaje constante de 40 volts (un gel) o 60 volts (dos geles) durante 4-5 horas. Luego de la corrida los geles se tiñeron con una solución de Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma). Al día siguiente los geles se destiñeron en una solución de metanol y ácido acético (40%, 10%), durante 4 horas hasta que las bandas de proteínas fueron visibles.

3.4.6 Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales específicos contra el virus se produjeron en ratones BALB/c de 6 semanas. Para ello se inocularon seis ratones con 50 μ l de la suspensión de la vacuna comercial a virus atenuado (Nobivac Puppy DP) por vía intramuscular en el plexo inguinal.

A continuación se realizaron dos *boosters* cada 15 días. Luego los animales fueron sacrificados, sangrados a blanco y el pool de suero obtenido se conservó a -20 °C para el análisis por Western Blot.

3.4.7 Western Blot

Para transferir las proteínas a las membranas de nitrocelulosa se utilizó el sistema de sándwich semi húmedo Trans-blot Semi Dry Electroforetic Transfer Cell (BioRad). Finalizada la corrida electroforética, se cortó un trozo de membrana de nitrocelulosa de 5x8,2 cm y seis papeles secantes del mismo tamaño. Se formó el sándwich sobre la placa positiva del equipo de transferencia del siguiente modo: 3 papeles secantes, membrana de nitrocelulosa, el gel de corrida y 3 papeles secantes (todos humedecidos con buffer de transferencia).

La transferencia se llevó a cabo durante 30 minutos a 15 v. Luego se retiró la membrana y se la dejó sumergida en solución de bloqueo (PBS, Tween-20 al 0,01%, leche en polvo 5%) durante toda la noche. Al otro día se realizaron tres lavados de 5 min con solución de lavado (PBS, Tween-20 al 0,01%) con agitación moderada. Luego se incubó la membrana con el anticuerpo primario producido en ratones y el suero canino diluidos en solución de bloqueo (dilución 1/50) durante 2 hs en agitación suave. Transcurrido el tiempo se realizaron tres lavados de la membrana y se la incubó durante 90 min con el anticuerpo secundario anti-especie conjugado con peroxidasa. Al cabo de 90 min se realizaron otros tres lavados y posteriormente se incubó la membrana con la solución de revelado (PBS 100ml, DAB 30mg, H₂O₂) durante 15 minutos hasta la aparición de las bandas.

3.5 ENSAYOS DE INMUNOGENICIDAD

3.5.1 Inoculación de las proteínas recombinantes en ratones

Con el fin de evaluar la capacidad inmunogénica de las proteínas recombinantes *in vivo*, se realizó un esquema de inmunización en ratones. Para ello cada una de las proteínas obtenidas se diluyó en PBS estéril hasta alcanzar una concentración final de 10 µg/ml.

Se formaron 5 grupos de 3 ratones BALB/c machos de 6 a 8 semanas. Durante toda la experiencia, los animales fueron mantenidos en un aislador con temperatura controlada de 22 a 24°C, con ciclos de 12 hs de luz y oscuridad. Además se les administró alimento y agua *ad libitum*. Se redujeron al mínimo posible los animales de experimentación, en concordancia con las leyes relacionadas con el bienestar animal.

Las inoculaciones se realizaron por vía intramuscular (im) en el plexo inguinal con cantidades fijas de proteína, administradas de forma individual, combinadas y con adyuvante (Specol), de acuerdo al diseño mostrado en la tabla 3.

Tabla 3: Inoculación de ratones BALB/c con las proteínas H y F₀

| Grupo | Proteína | Cantidad | Ruta | Specol | Vol.Inóculo |
|-------|-----------------------------------|---------------------------|------|--------|-------------|
| A | F ₀ | 0.5µg | i.m | Si | 30 µl |
| B | H | 0.5 µg | i.m | Si | 30 µl |
| C | H/F ₀ | 0.5/0.5 µg | i.m | Si | 30 µl |
| D | Vacuna comercial (virus atenuado) | 10 ⁵ TCID50/ml | i.m | Si | 30 µl |
| E | Control S/inocular | | ---- | | |

Se realizaron 3 inmunizaciones, la primera con el adyuvante y la segunda y tercera sin adyuvante (con 15 y 30 días de intervalo respecto a la primera). Los animales se sacrificaron y se sangraron a los 15 días posteriores a la última inmunización.

Para la obtención de los sueros, la sangre se dejó coagular a temperatura ambiente y luego de formado el coágulo se centrifugaron las muestras a 1000 RPM durante 15 minutos. Los sueros obtenidos se almacenaron a -20°C hasta su utilización en estudios serológicos.

3.5.2 Western Blot

Con el fin de analizar la reactividad de los anticuerpos obtenidos, se realizó un ensayo de Western Blot contra las proteínas virales. Para ello se armó un gel de poliacrilamida al 10% tal como se describe en la (sección 3.4.6). Luego de armado el gel, se sembraron 300 µl de una mezcla por partes iguales de buffer de carga y antígeno viral proveniente de células infectadas con el CDV. El gel se corrió a 50 V durante 4 hs, hasta que el frente de corrida del marcador de peso molecular PageRuler (Prestained Protein Ladder-Fermentas) llegara a la parte inferior del gel.

La transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa se realizó utilizando el sistema sándwich semi-húmedo (Sección 3.4.7). Finalizada la transferencia se incubó la membrana toda la noche a 4°C en solución de bloqueo. Posteriormente se realizaron tres lavados de la membrana de 5 minutos en agitación con buffer de lavado. Luego se cortó la membrana en tiras de aproximadamente 0.5 cm que se colocaron en tubos de ensayo de 1 cm de diámetro por 10 de largo, conteniendo 2 ml de la solución de bloqueo. Los sueros de cada grupo se mezclaron en un único pool y se los rotuló como (A, B, C, D, E) y se utilizaron en dilución 1/100, incubándolos durante 90 minutos en agitación suave, siempre cuidando que las membranas estuvieran sumergidas en la solución de bloqueo. Transcurrido

el tiempo, se realizaron tres lavados y posteriormente se incubaron con una dilución 1/500 del anticuerpo anti-ratón conjugado. Finalmente luego de tres lavados más, se revelaron las tiras con DAB (sección 3.4.7).

3.5.3 Ensayo de neutralización *in Vitro*

Para estudiar la capacidad neutralizante de los sueros obtenidos en un modelo *in Vitro*, se utilizaron células VERO. Las mismas fueron crecidas de acuerdo a lo establecido en la sección (3.1.3).

Para realizar en ensayo de neutralización se utilizaron placas de 96 pocillos, dividida del siguiente modo:

En las columnas 1 y 2 se sembraron diluciones seriadas en base 2 del pool de sueros correspondiente al grupo A (proteína F₀ rec), en las 3 y 4 se sembraron diluciones del pool de sueros correspondiente al grupo B (proteína H rec), en las 5 y 6 las diluciones del pool C (proteínas F₀ rec y H rec). La columna 7 se utilizó como control de virus (V), es decir virus y células. En la columna 8 se sembraron células control sin infectar (C). Los pocillos 10A, 11A y 12A se utilizaron como control de toxicidad de los pooles de sueros (SA, SB y SC). En cada pocillo se sembró el pool de sueros correspondiente y células.

En las columnas A₁ a la A₆ se sembraron 25 µl de cada pool de sueros que se diluyeron en base dos con MEM hasta la fila H. Luego se adicionó 25µl de la dilución del virus correspondiente a 100 partículas virales. (Fig. 8).

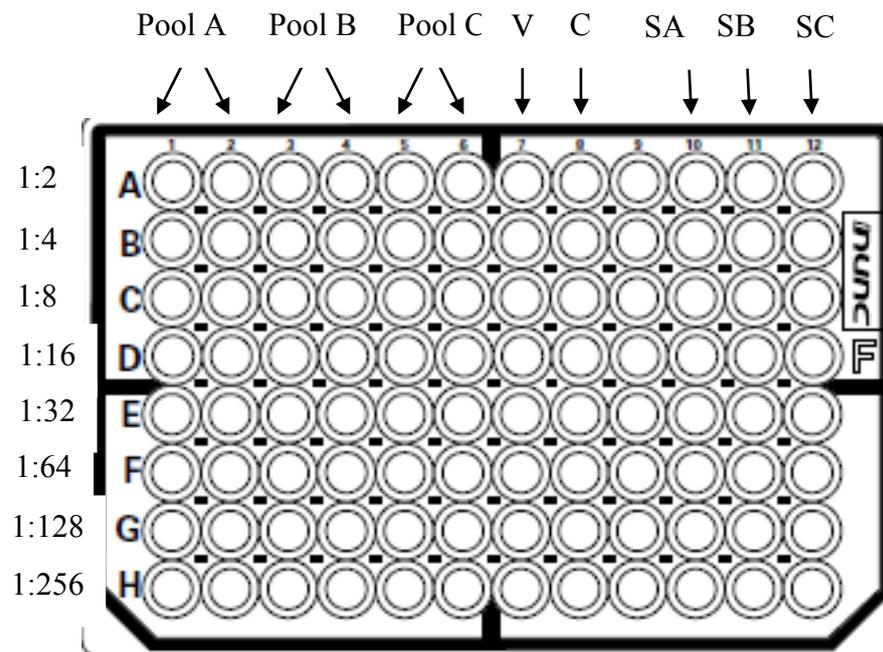


Figura 8: placa de 96 pocillos utilizada para la neutralización viral.

Posteriormente se incubó la placa a 37°C durante 1 hora. Luego se agregaron las células (2.5×10^5 cél/ml) resuspendidas en medio MEM con 10% SFB, a cada pocillo perteneciente a cada columna.

A continuación se incubó la placa a 37°C durante 72 horas, examinándola periódicamente hasta la aparición de efecto citopático.

Se consideró como título virus-neutralizante a la mayor dilución del suero que protegió del efecto viral a las unidades de prueba.

4. Resultados

4.1 CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES DE CLONADO

El ARN total extraído utilizando el reactivo TRIZOL, se resuspendió en 20 μ l de agua libre de nucleasas y luego de cuantificación mediante espectrofotometría, se estimó su concentración y el grado de pureza en 367 μ g/ml de ARN con una pureza estimada por la relación de $A_{260}/A_{280}= 2,03$.

Con el objeto de obtener copias de cADN de los genes H y F₀ se realizó una reacción de retrotranscripción utilizando 10 μ l del ARN total extraído y 2 μ l de Random primers. Posteriormente, se tomaron 5 μ l del cADN y se utilizaron como molde de PCR para amplificar los fragmentos H y F₀. A fin de confirmar los resultados obtenidos, 5 μ l de cada uno de los productos de las RT-PCR se sembraron en un gel de agarosa al 1%.

Luego de la retrotranscripción y amplificación se pudo observar la presencia de una sola banda de 1,6Kb para el fragmento F₀ y otra de 1,8Kb para el fragmento H. Dichos tamaños coincidieron con los esperados para cada fragmento (1624bp para F₀ y 1832 para H) (Fig. 9).

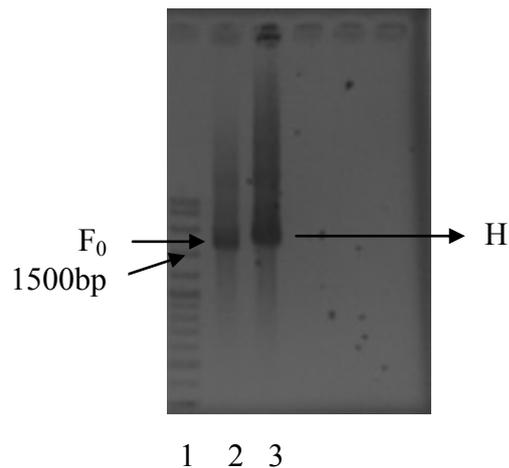


Figura 9: Amplificación por RT-PCR de los fragmentos H y F₀. Calle 1 marcador de peso molecular 100bp, calle 2 F₀ y calle 3 H.

Luego de haber obtenido ambos productos de PCR y habiéndose clonado en el vector pCRTPO2.1 se obtuvieron 120 colonias para la F₀ y 75 colonias para la H. La mayoría de las colonias resultaron ser blancas, demostrando que tenían el fenotipo lac⁻ y por lo tanto contenían al vector de clonado con el inserto ligado. De las colonias tomadas, para confirmar la presencia de los insertos (5 de cada gen), se realizaron extracciones de ADN plasmídico, y el resultado obtenido con las enzimas para confirmar la orientación se muestra en las figuras 10 y 11.

De 3 de los clones pertenecientes a F₀ digeridos con *EcoRV*, se observó un patrón de bandas de 4565 y 994bp (correspondientes a la construcción pTOPO-F1). Los 2 restantes dieron dos bandas de 4887 y 672bp (pTOPO-FII). En el caso de los clones de H digeridos con *XbaI* las bandas observadas fueron de 5122 y 641bp (pTOPO-HI) (Fig. 12).

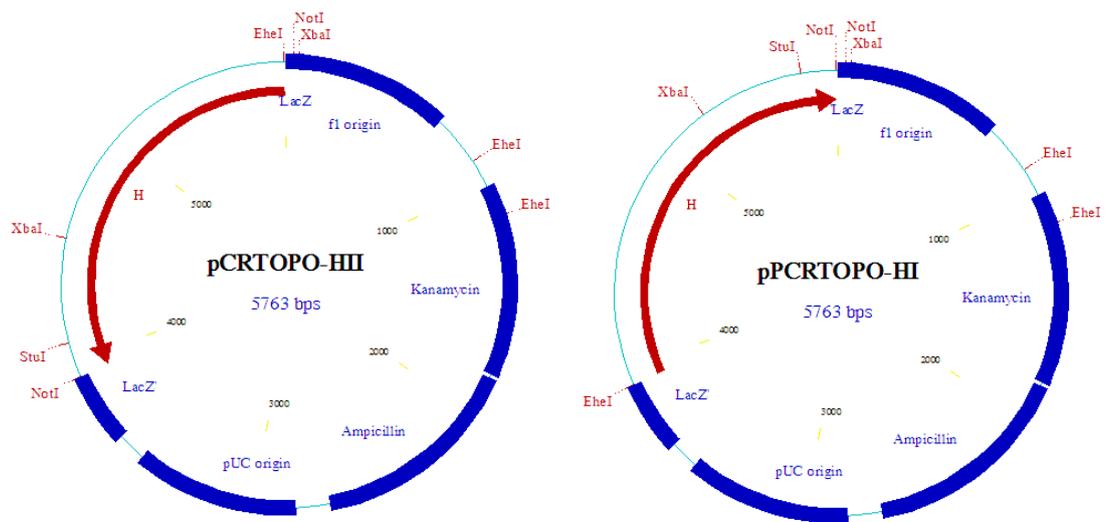


Figura 10: Representación de las 2 posibles construcciones obtenidas luego de clonar el fragmento H. Puede observarse en el esquema los sitios de reconocimiento de las enzimas utilizadas para confirmar la presencia del inserto.

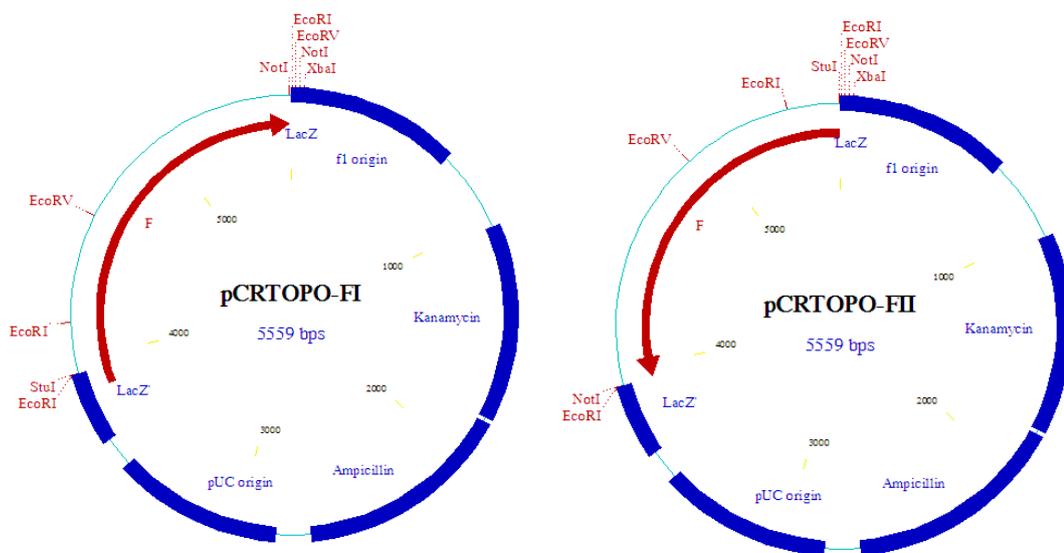


Figura 11: Representación de las 2 posibles construcciones obtenidas luego de clonar el fragmento F₀. Puede observarse en el esquema los sitios de reconocimiento de las enzimas utilizadas para confirmar la presencia del inserto.

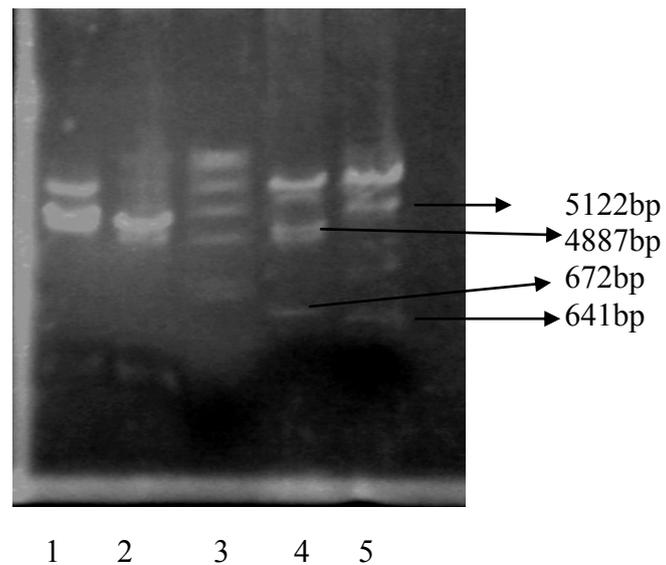


Figura 12: Calle 1 pCRtopo-F s/digerir, calle 2 pCRtopo-H s/digerir, calle 3 marcador λ /Hind III, Calle 4 pCRtopo-F II digerido con *EcoRV*, Calle 5 pCRtopo-H I digerido con *XbaI*.

Los plásmidos pTOPO-FII y pTOPO-HI purificados a partir de uno de los clones identificados anteriormente y secuenciado utilizando los siguientes primers de M13 contenidos en el vector (M13F: 5'GTAAAACGACGGCCAG 3', M13R: 5'CAGGAAACAGCTATGAC 3') permitieron confirmar que la posición de los insertos fue la misma que la determinada por digestión enzimática. Para el fragmento H la secuencia obtenida fue:

```

1    TGGCGCCATG CTCTCCTACC AAGACAAGGT GGGTGCCTTC TACAAGGATA
51   ATGCAAGAGC CAATTCAACC AAGCTGTCCT TAGTGACAGA AGAACATGGG
101  GGCAGGAGAC CACCTTATTT GTTGTGTTGTC CTTCTCATCT TATTGGTTGG
151  AATCCTGGCC TTGCTTGCTA TCACTGGAGT TCGATTTTAC CAAGTATCAA
201  CTAGCAATAT GGAATTTAGC AGATTGCTGA AAGAGGATAT GGAGAAATCA
251  GAGGCCGTAC ATCACCAAGT CATAGATGTC TTGACACCGC TCTTCAAGAT
301  TATTGGAGAT GAGATTGGGT TACGGTTGCC ACAAAGCTA AACGAGATCA
351  AACAAATTTAT CCTTCAAAG ACAAATTTCT TCAATCCGAA CAGAGAATTC
401  GACTTCCGCG ATCTCCACTG GTGCATTAAC CCGCCTAGTA AGGTCAAGGT
451  GAATTTTACT AATTACTGTG AGTCAATTGG GATCAGAAAA GCTATTGCAT
501  CGGCAGCAA TCCATCCTT TTATCAGCCC TATCTGGGGG CAGAAGTGAC
551  ATATTCCCAC CACACAGATG CAGTGGAGCT ACTACTTCAG TAGGCAAAGT
601  TTTCCCCCTA TCAGTCTCAT TATCCATGTC TTTGATCTCA AGAACCTCAG
651  AGATAATCAA TATGCTGACC GCTATCTCAG ACGGCGTGTA TGGCAAAACT

```

```

701   TACTTGCTAG TGCCTGATGA TATAGAAAGA GAGTTCGACA CTCAAGAGAT
751   TCGAGTCTTT GAAATAGGGT TCATCAAAAAG GTGGCTGAAT GACATGCCAT
801   TACTCCAAAC AACCAACTAT ATGGTACTCC CGGAGAATTC CAAAGCCAAG
851   GTATGTACTA TAGCAGTGGG TGAGTTGACA CTGGCTTCCT TGTGTGTAGA
901   AGAGAGCACT GTATTATTAT ATCATGACAG CAGTGGTTCA CAAGATGGTA
951   TTCTAGTAGT GACACTGGGG ATATTTTGGG CAACACCTAT GGATCACATT
1001  GAGGAAGTGA TACCTGTGCG TCACCCATCA ATGGAGAAAA TACATATAAC
1051  AAACCACCAC GGTTTTTATAA AAGATTCAAT TGCAACCTGG ATGGTGCCTG
1101  CCCTGGCCTC TGAGAAACAA GAAGAACAAA AAGGTTGTCT GGAGTCAGCT
1151  TGTCAAAGAA AAACCTACCC CATGTGCAAC CAAACGTCAT GGGAACCCCTT
1201  CGGAGGAAGA CAGTTGCCAT CTTATGGGCG GTTGACATTA CCTCTAGATG
1251  CAAGTGTGGA CCTTCAACTT AACATATCGT TCACATACGG TCCGGTTATA
1301  CTGAATGGAG ATGGTATGGA TTATTATGAA AGCCCACTTT TGAACTCCGG
1351  ATGGCTTACC ATTCTCCCA AAAACGGAAC AATCTCTGGA TTGATAAACA
1401  AAGCAGGTAG AGGAGACCAG TTCACTGTAC TCCCCATGT GTTAACATTT
1451  GCGCCCAGGG AATCAAGTGG AAATTGTTAT TTACCTATTC AAACATCTCA
1501  AATTATAGAT AGAGATGTCC TCATTGAGTC CAATATAGTG GTGTTGCCTA
1551  CACAGAGTTT TAGATATGTC ATAGCAACGT ATGACATATC ACGAAGTGAT
1601  CATGCGATTG TTTATTATGT TTATGACCCA ATCCGGACGA TTTCTTATAC
1651  GCACCCATTT AGACTAACTA CCAAGGGTAG ACCTGATTTT CTAAGGATTG
1701  AATGTTTTGT GTGGGATAAC AATTTGTGGT GTCACCAATT TTACAGATTC
1751  GAGGCTGACA TCGCCAACTC TACAACCAGT GTTGAGAATT TAGTCCGTAT
1801  AAGATTCTCA TGTAACCGTT AAGCGGCCGC ACA

```

Se observó en la secuencia la presencia de los sitios de corte *EheI* y *NotI* (subrayados) incorporados durante la PCR. También se comprobó la continuidad del marco de lectura.

Con un alineamiento local de esta secuencia utilizando el programa Blastn, se obtuvo un 99% de homología con la secuencia F461701.1 almacenada en el GenBank, perteneciente al gen que codifica para la proteína hemoaglutinina de un aislamiento de una cepa vacunal del virus del distemper canino.

La cadena superior desde el nucleótido 1 al 1822 corresponde al fragmento secuenciado. La hebra inferior desde el nucleótido 7079 al 8893 corresponde a la secuencia almacenada en el GenBank.

En amarillo se marcaron los cambios de nucleótidos en las secuencias:

```

1      ATGCTCTCCTACCAAGACAAGGTGGGTGCCTTCTACAAGGATAATGCAAGAGCCAATTCA
      |
7079  ATGCTCTCCTACCAAGACAAGGTGGGTGCCTTCTACAAGGATAATGCAAGAGCCAATTCA

      ACCAAGCTGTCCTTAGTGACAGAAGAACATGGGGGCAGGAGACCACCTTATTTGTTGTTT
      |
      ACCAAGCTGTCCTTAGTGACAGAAGAACATGGGGGCAGGAGACCACCTTATTTGTTGTTT

      GTCCTTCTCATCTTATTGGTTGGAATCCTGGCCTTGCTTGCTATCACTGGAGTTCGATTT
      |
      GTCCTTCTCATCTTATTGGTTGGAATCCTGGCCTTGCTTGCTATCACTGGAGTTCGATTT

      CACCAAGTATCAACTAGCAATATGGAATTTAGCAGATTGCTGAAAGAGGATATGGAGAAA
      |
      CACCAAGTATCAACTAGCAATATGGAATTTAGCAGATTGCTGAAAGAGGATATGGAGAAA

      TCAGAGGCCGTACATCACCAAGTCATAGATGTCTTGACACCGCTCTTCAAGATTATTGGA
      |
      TCAGAGGCCGTACATCACCAAGTCATAGATGTCTTGACACCGCTCTTCAAGATTATTGGA

      GATGAGATTGGGTTACGGTTGCCACAAAAGCTAAACGAGATCAAACAATTTATCCTTCAA
      |
      GATGAGATTGGGTTACGGTTGCCACAAAAGCTAAACGAGATCAAACAATTTATCCTTCAA

      AAGACAAATTTCTTCAATCCGAACAGAGAATTCGACTTCCGCGATCTCCACTGGTGCATT
      |
      AAGACAAATTTCTTCAATCCGAACAGAGAATTCGACTTCCGCGATCTCCACTGGTGCATT

      AACCCGCCTAGTAAGGTCAAGGTGAATTTTACTAATTACTGTGAGTCAATTGGGATCAGA
      |
      AACCCGCCTAGTAAGGTCAAGGTGAATTTTACTAATTACTGTGAGTCAATTGGGATCAGA

      AAAGCTATTGCATCGGCAGCAAATCCTATCCTTTTATCAGCCCTATCTGGGGGCAGAAGT
      |
      AAAGCTATTGCATCGGCAGCAAATCCTATCCTTTTATCAGCCCTATCTGGGGGCAGAAGT

      GACATATTTCCACCACACAGATGCAGTGGAGCTACTACTTCAGTAGGCAAAGTTTCCCC
      |
      GACATATTTCCACCACACAGATGCAGTGGAGCTACTACTTCAGTAGGCAAAGTTTCCCC

      CTATCAGTCTCATTATCCATGTCTTTGATCTCAAGAACCTCAGAGATAATCAATATGCTG
      |
      CTATCAGTCTCATTATCCATGTCTCTGATCTCAAGAACCTCAGAGATAATCAATATGCTG

      ACCGCTATCTCAGACGGCGTGTATGGCAAACCTTACTTGCTAGTGCCTGATGATATAGAA
      |
      ACCGCTATCTCAGACGGCGTGTATGGCAAACCTTACTTGCTAGTGCCTGATGATATAGAA

      AGAGAGTTCGACACTCAAGAGATTCGAGTCTTTGAAATAGGGTTCATCAAAGGTGGCTG
      |
      AGAGAGTTCGACACTCAAGAGATTCGAGTCTTTGAAATAGGGTTCATCAAAGGTGGCTG

```

AATGACATGCCATTACTCCAAACAACCAACTATATGGTACTCCCGGAGAATTCCAAAGCC
 |||
 AATGACATGCCATTACTCCAAACAACCAACTATATGGTACTCCCGGAGAATTCCAAAGCC

AAGGTATGTACTATAGCAGTGGGTGAGTTGACACTGGCTTCCTTGTGTGTAGAAAGAGAGC
 |||
 AAGGTATGTACTATAGCAGTGGGTGAGTTGACACTGGCTTCCTTGTGTGTAGAAAGAGAGC

ACTGTATTATTATATCATGACAGCAGTGGTTCACAAGATGGTATTCTAGTAGTGACACTG
 |||
 ACTGTATTATTATATCATGACAGCAGTGGTTCACAAGATGGTATTCTAGTAGTGACACTG

GGGATATTTGGGCAACACCTATGGATCACATTGAGGAAGTGATACCTGTCGCTCACCCA
 |||
 GGGATATTTGGGCAACACCTATGGATCACATTGAGGAAGTGATACCTGTCGCTCACCCA

TCAATGGAGAAAATACATATAACAAACCACCGGGTTTTATAAAAGATTCAATTGCAACC
 |||
 TCAATGGAGAAAATACATATAACAAACCACCGTGGTTTTATAAAAGATTCAATTGCAACC

TGGATGGTGCCTGCCCTGGCCTCTGAGAAACAAGAAGAACAAAAAGGTTGTCTGGAGTCA
 |||
 TGGATGGTGCCTGCCCTGGCCTCTGAGAAACAAGAAGAACAAAAAGGTTGTCTGGAGTCA

GCTTGTCAAAGAAAAACCTACCCCATGTGCAACCAAACGTCATGGGAACCCCTTCGGAGGA
 |||
 GCTTGTCAAAGAAAAACCTACCCCATGTGCAACCAAACGTCATGGGAACCCCTTCGGAGGA

AGACAGTTGCCATCTTATGGGCGGTTGACATTACCTCTAGATGCAAGTGTTGACCTTCAA
 |||
 AGACAGTTGCCATCTTATGGGCGGTTGACATTACCTCTAGATGCAAGTGTTGACCTTCAA

CTTAACATATCGTTCACATACGGTCCGGTTATACTGAATGGAGATGGTATGGATTATTAT
 |||
 CTTAACATATCGTTCACATACGGTCCGGTTATACTGAATGGAGATGGTATGGATTATTAT

GAAAGCCCACCTTTGAACTCCGGATGGCTTACCATTCCCTCCCAAAAACGGAACAATC TC
 |||
 GAAAGCCCACCTTTGAACTCCGGATGGCTTACCATTCCCTCCCAAAAACGGAACAATC GT

TGGATTGATAAACAAAGCAGGTAGAGGAGACCAGTTCACTGTACTCCCCCATGTGTTAAC
 |||
 TGGATTGATAAACAAAGCAGGTAGAGGAGACCAGTTCACTGTACTCCCCCATGTGTTAAC

ATTTGCGCCCAGGGAATCAAGTGGAATTGTTATTTACCTATTCAAACATCTCAAATTAT
 |||
 ATTTGCGCCCAGGGAATCAAGTGGAATTGTTATTTACCTATTCAAACATCTCAAATTAT

AGATAGAGATGTCCTCATTGAGTCCAATATAGTGGTGTGCCTACACAGAGTTTTAGATA
 |||
 AGATAGAGATGTCCTCATTGAGTCCAATATAGTGGTGTGCCTACACAGAGTTTTAGATA

TGTCATAGCAACGTATGACATATCACGAAGTGATCATGCGATTGTTTATTATGTTTATGA
 |||
 TGTCATAGCAACGTATGACATATCACGAAGTGATCATGCGATTGTTTATTATGTTTATGA

```

CCCAATCCGGACGATTTCTTATACGCACCCATTTAGACTAACTACCAAGGGTAGA CCTGA
|||||
CCCAATCCGGACGATTTCTTATACGCACCCATTTAGACTAACTACCAAGGGTAGG CCTGA

TTTCCTAAGGATTGAATGTTTTGTGTGGGATAACAATTTGTGGTGTACCAATTTTACAG
|||||
TTTCCTAAGGATTGAATGTTTTGTGTGGGATGACAATTTGTGGTGTACCAATTTTACAG

ATTCGAGGCTGACATCGCCAACCTCTACAACCAGTGTTGAGAATTTAGTCCGTATAAGATT
|||||
ATTCGAGGCTGACATCGCCAACCTCTACAACCAGTGTTGAGAATTTAGTCCGTATAAGATT

CTCATGTAACCGTTAA 1822
|||||
CTCATGTAACCGTTAA 8893

```

Para la construcción de la proteína de fusión se obtuvo la siguiente secuencia:

```

1   AGGCCTATGG CCAGTCTCTT TCTTTGTTCC AAGGCTCAGA TACATTGGAA
51  TAATTTGTCA ACTATTGGGA TTATCGGGAC TGATAGTGTC CATTACAAGA
101 TCATGACTAG GCCCAGTCAC CAGTACTTGG TCATAAAACT GATGCCTAAT
151 GTTTCACTTA TAGATAATTG TACCAAAGCA GAATTAGGTG AGTATGAGAA
201 ATTATTGAAT TCAGTCCTCG AACCAATCAA CCAAGCTTTG ACTCTAATGA
251 CCAAGAATGT GAAGCCCCTG CAGTCATTAG GGTCAGGTAG GAGACAAAGG
301 CGTTTTGTAG GAGTGGTACT TGCAGGTGCA GCTTTAGGAG TGGCTACAGC
351 TGCACAAATC ACTGCAGGAA TAGCTTTACA TCAATCCAAC CTCAATGCTC
401 AAGCAATCCA ATCTCTTAGA ACCAGCCTTG AACAGTCTAA CAAAGCTATA
451 GAAGAAATTA GGGAGGCCAC CCAAGAAACC GTCATTGCCG TTCAGGGAGT
501 CCAGGACTAC GTCAACAACG AACTCGTCCC TGCCATGCAA CATATGTCAT
551 GTGAATTAGT TGGGCAGAGA TTAGGGTTAA GACTGCTTCG GTATTATACT
601 GAGTTGTTGT CAATATTTGG CCCGAGTTTA CGTGACCCTA TTTCAGCCGA
651 GATATCAATT CAGGCACTGA GTTATGCTCT TGGAGGAGAA ATTCATAAGA
701 TACTTGAGAA GTTGGGATAT TCTGGAGGTG ATATGATTGC AATCTTGGAG
751 AGTCGGGGGA TAAAAACAAA AATAACTCAT GTTGATCTCC CCGGGAAATT
801 CATCATCCTA AGTATCTCAT ACCCAACTTT ATCAGAAGTC AAGGGGGTTA
851 TAGTCCACAG GCTGGAAGCA GTTTCCTTACA ACATAGGATC ACAAGAGTGG
901 TACACCACTG TCCCGAGGTA TATTGCAACT AATGGTTACT TAATATCTAA
951 TTTTGATGAG TCATCTTGTG TATTCGTCTC AAAGTCAGCC ATTTGTAGCC
1001 AGAACTCCCT GTATCCCATG AGCCCCTCT TACAACAATG TATTAGGGGC
1051 GACACTTCAT CTTGTGCTCG GACCTTGGTA TCTGGGACCA TGGGCAACAA
1101 ATTTATTCTG TCAAAAGGTA ATATCGTCGC AAATTGTGCT TCTATACTAT
1151 GTAAGTGTTA TAGCACAAGC ACAATTATTA ATCAGAGTCC TGATAAGTTG
1201 CTGACATTTA TTGCCCTCCGA TACCTGCCCA CTGGTTGAAA TAGATGGTGT
1251 TACTATCCAA GTTGGAGGCA GGCAATACCC TGATATGGTA TACGAAGGCA
1301 AAGTTGCCTT AGGCCCTGCT ATATCACCTG AGAGGTTAGA TGTAGGTACA
1351 AATTTAGGGA ACGCCCTTAA GAACTGGAT GATGCTAAGG TACTGATAGA
1401 CTCCTCTAAC CGGATCCTTG GGACGGTTAG GCGCTCTTCC TTTAATTTTG
1451 GCAGTCTCCT CAGCGTTCCT ATATTAAGTT GTACAGCCCT GGCTTTGTTG
1501 TTGCTGATTT ACTGTTGTAA AAGACGCTAC CAACAGACAC TCGAGCAGCA
1551 TACTAAGGTC GATCCGGCAT TTAAACCTGA TCTAACTGGA ACTTCGAAAT
1601 CCTATGTGAG ATCACACTGA GCGGCCGC

```

Al igual que en el caso anterior, se comprobó la continuidad del marco de lectura y la presencia de los sitios *StuI* y *NotI* (subrayados).

El análisis de la secuencia mediante el Blast (n) dio como resultado un 99% de homología con la secuencia AF305419.1 del GenBank, perteneciente al gen de la proteína de fusión del virus de distemper canino correspondiente a un aislamiento de la cepa Onderstepoort. La hebra superior corresponde al fragmento secuenciado.

La hebra inferior corresponde a la secuencia almacenada en el Gen Bank. Los cambios observados en los nucleótidos se resaltaron en amarillo:

```

1      ATGGCCAGTCTCTTTCTTTGTTCCAAGGCTCAGATACATTGGAATAATTTGTCAACTATT
      |
5310  ATGGCCAGTCTCTTTCTTTGTTCCAAGGCTCAGATACATTGGAATAATTTGTCAACTATT

      GGGATTATCGGGACTGATAGTGTCCATTACAAGATCATGACTAGGCCAGTCACCAGTAC
      |
      GGGATTATCGGGACTGATAGTGTCCATTACAAGATCATGACTAGGCCAGTCACCAGTAC

      TTGGTCATAAAACTGATGCCTAATGTTTCACTTATAGATTAATTGTACCAAAGCAGAATTA
      |
      TTGGTCATAAAACTGATGCCTAATGTTTCACTTATAGAGAAATTGTACCAAAGCAGAATTA

      GGTGAGTATGAGAAATTATTGAATTCAGTCCTCGAACCAATCAACCAAGCTTTGACTCTA
      |
      GGTGAGTATGAGAAATTATTGAATTCAGTCCTCGAACCAATCAACCAAGCTTTGACTCTA

      ATGACCAAGAATGTGAAGCCCCTGCAGTCATTAGGGTCAGGTAGGAGACAAAGGCGTTTT
      |
      ATGACCAAGAATGTGAAGCCCCTGCAGTCATTAGGGTCAGGTAGGAGACAAAGGCGTTTT

      GTAGGAGTGGTACTTGCAGGTGCAGCTTTAGGAGTGGCTACAGCTGCACAAATCACTGCA
      |
      GCAGGAGTGGTACTTGCAGGTGTAGCTTTAGGAGTGGCTACAGCTGCACAAATCACTGCA

      GGAATAGCTTTACATCAATCCAACCTCAATGCTCAAGCAATCCAATCTCTTAGAACCAGC
      |
      GGAATAGCTTTACATCAATCCAACCTCAATGCTCAAGCAATCCAATCTCTTAGAACCAGC

      CTTGAACAGTCTAACAAAGCTATAGAAGAAATTAGGGAGGCTACCCAAGAAACCGTCATT
      |
      CTTGAACAGTCTAACAAAGCTATAGAAGAAATTAGGGAGGCTACCCAAGAAACCGTCATT

      GCCGTTTCAGGGAGTCCAGGACTACGTCAACAACGAACTCGTCCCTGCCATGCAACATATG
      |
      GCCGTTTCAGGGAGTCCAGGACTACGTCAACAACGAACTCGTCCCTGCCATGCAACATATG

```

TCATGTGAATTAGTTGGGCAGAGATTAGGGTTAAGACTGCTTCGGTATTATACTGAGTTG
 |||
 TCATGTGAATTAGTTGGGCAGAGATTAGGGTTAAGACTGCTTCGGTATTATACTGAGTTG

 TTGTCAATATTTGGCCCGAGTTTACGTGACCCTATTTTCAGCCGAGATATCAATTCAGGCA
 |||
 TTGTCAATATTTGGCCCGAGTTTACGTGACCCTATTTTCAGCCGAGATATCAATTCAGGCA

 CTGAGTTTATGCTCTTGGAGGAGAAATTCATAAGATACTTGAGAAGTTGGGATATTCTGGA
 |||
 CTGATTTTATGCTCTTGGAGGAGAAATTCATAAGATACTTGAGAAGTTGGGATATTCTGGA

 GGTGATATGATTGCAATCTTGGAGAGTCGGGGGATAAAAACAAAAATAACTCATGTTGAT
 |||
 AGTGATATGATTGCAATCTTGGAGAGTCGGGGGATAAAAACAAAAATAACTCATGTTGAT

 CTCCCCGGGAAATTCATCATCCTAAGTATCTCATACCCAACCTTATCAGAAGTCCAGGGG
 |||
 CTTCCCCGGGAAATTCATCATCCTAAGTATCTCATACCCAACCTTATCAGAAGTCAAGGGG

 GTTATAGTCCACAGACTGGAAGCAGTTTCTTACAACATAGGATCACAAGAGTGGTACACC
 |||
 GTTATAGTCCACAGACTGGAAGCAGTTTCTTACAACATAGGATCACAAGAGTGGTACACC

 ACTGTCCCAGGTATATTGCAACTAATGGTTACTTAATATCTAATTTTGGATGAGTCATCT
 |||
 ACTGTCCCAGGTATATTGCAACTAATGGTTACTTAATATCTAATTTTGGATGAGTCATCT

 TGTGTATTTCGTCTCAAAGTCAGCCATTTGTAGCCAGAACTCCCTGTATCCCATGAGCCCA
 |||
 TGTGTATTTCGTCTCAAGTCAGCCATTTGTAGCCAGAACTCCCTGTATCCCATGAGCCCA

 CTCTTACAACAATGTATTAGGGGCGACACTTCATCTTGTGCTCGGACCTTGGTATCTGGG
 |||
 CTCTTACAACAATGTATTAGGGGCGACACTTCATCTTGTGCTCGGACCTTGGTATCTGGG

 ACCATGGGCAACAAATTTATTCTGTCAAAGGTAATATCGTCGCAAATTGTGCTTCTATA
 |||
 ACTATGGGCAACAAATTTATTCTGTCAAAGGTAATATCGTCGCAAATTGTGCTTCTATA

 CTATGTAAGTGTTATAGCACAAGCACAATTATTAATCAGAGTCCTGATAAGTTGCTGACA
 |||
 CTATGTAAGTGTTATAGCACAAGCACAATTATTAATCAGAGTCCTGATAAGTTGCTGACA

 TTTATTGCCTCCGATACCTGCCCACTGGTTGAAATAGATGGTGCTACTATCCAAGTTGGA
 |||
 TTTATTGCCTCCGATACCTGCCCACTGGTTGAAATAGATGGTGCTACTATCCAAGTTGGA

 GGCAGGCAATACCCTGATATGGTATACGAAGGCAAAGTTGCCTTAGGCCCTGCTATATCA
 |||
 GGCAGGCAATACCCTGATATGGTATACGAAGGCAAAGTTGCCTTAGGCCCTGCTATATCA

 CCTGATAGGTTAGATGTAGGTACAACTTAGGGAACGCCCTTAAGAACTGGATGATGCT
 |||
 CCTGATAGGTTAGATGTAGGTACAACTTAGGGAACGCCCTTAAGAACTGGATGATGCT

```

AAGGTAAGTACTGATAGACTCCTCTAACCGGATCCTTGAGACGGTTAGGCGCTCTTCCTTTAAT
|||||
AAGGTAAGTACTGATAGACTCCTCTAACCAGATCCTTGAGACGGTTAGGCGCTCTTCCTTTAAT

TTTGGCAGTCTCCTCAGTGTTCCCTATATTAAGTTGTACAGCCCTGGCTTTGTTGTTGCTG
|||||
TTTGGCAGTCTCCTCAGTGTTCCCTATATTAAGTTGTACAGCCCTGGCTTTGTTGTTGCTG

ATTTACTGTTGTAAAAGACGCTACCAACAGACACTCGAGCAGCATACTAAGGTCGATCCG
|||||
ATTTACTGTTGTAAAAGACGCTACCAACAGACACTCAAGCAGCATACTAAGGTCGATCCG

GCATTTAAACCTGATCTAACTGGAACCTTCGAAATCCTATGTGAGATCACACTGA 1620
|||||
GCATTTAAACCTGATCTAACTGGAACCTTCGAAATCCTATGTGAGATCACTCTGA 6923

```

Mediante la utilización del software Vector NTI versión 11(Invitrogen), con los que se tradujeron los marcos de lectura abierta correspondientes a H y F₀, se obtuvieron dos secuencias de 604 aa para H y 537 aa para F₀ y se estimaron los pesos moleculares de dichos polipéptidos en 66,44 y 59,07 KDa respectivamente.

H:

```

1   MLSYQDKVGA FYKDNARANNS TKLSSLVTEEH GRRPPYLLF VLLILLVGIL
51  ALLAITGVRF HQVSTSNMEF SRLLKEDMEK SEAVHHQVID VLTPLFKIIG
101 DEIGLRLPQK LNEIKQFILQ KTNFFNPNRE FDFRDLHWCI NPPSKVKVNE
151 TNYCESIGIR KAIASAANPI LLSALSGGGRS DIFPPHRCSG ATTSVGKVFP
201 LSVSLSMSLI SRTSEIINML TAISDGVYGK TYLLVPDDIE REFDTQEIRV
251 FEIGFIKRWL NDMPLLQTTN YMVLPENSKA KVCTIAVGEL TLASLCVEES
301 TVLLYHDSSG SQDGILVVTL GIFWATPMDH IEEVIPVAHP SMEKIHITNH
351 HGFIKDSIAT WMVPALASEK QEEQKGCLES ACQRKTYPMC NQTSWEPFGG
401 RQLPSYGRLT LPLDASVDLQ LNISFTYGPV ILNGDGMDYY ESPLLNSGWL
451 TIPPKNGTIS GLINKAGRGD QFTVLPHVLT FAPRESSGNC YLPIQTSQII
501 DRDVLIESNI VVLPTQSFRY VIATYDISRS DHAIVYYVYD PIRTISYTHP
551 FRLTTKGRPD FLRIECFVWD NNLWCHQFYR FEADIANNSTT SVENLVRIRF
601 SCNR

```

En amarillo se resaltan los potenciales sitios de glicosilación de H. Los residuos subrayados corresponden a la triada (Y₅₂₅, D₅₂₆, R₅₂₉)

F:

```

1     MASLFLCSKA QIHWNLLSTI GIIGTDSVHY KIMTRPSHQY LVIKLMPNVS
51    LIDNCTKAEL GEYEKLLNSV LEPINQALTL MTKNVKPLQS LGSGRRQRRF
101   VGVVLAGAAL GVATAAQITA GIALHQSNLN AQAIQSLRST LEQSNKAIEE
151   IREATQETVI AVQGVQDYVN NELVPAMQHM SCELVGQRLG LRLRLRYYTEL
201   LSIFGPSLRD PISAEISIQ A LSALGGEIH KILEKLGYSG GDMIAILES R
251   GIKTKITHVD LPGKFIILSI SYPTLSEVKG VIVHRLEAVS YNIGSQEWYT
301   TVPRYIATNG YLISNFDESS CVFVSKSAIC SQNSLYPMSP LLQQCIRGDT
351   SSCARTLVSG TMGNKFILSK GNIVANCASI LCKCYSTSTI INQSPDKLLT
401   FIASDTCPLV EIDGVTIQVG GRQYPDMVYE GKVALGPAIS PERLDVGTNL
451   GNALKKLDDA KVLIDSSNRI LGTVRRSSFN FGSLLSVPIL SCTALALLLL
501   IYCCKRRYQQ TLEQHTKVDP AFKPDLTGTS KSYVRSH

```

4.2 EXPRESION DE H Y F EN LEVADURAS

Para realizar la expresión de las proteínas H y F₀ en *P.pastoris*, se construyeron los vectores denominados: pPIC9-H y pPIC9-F₀. Los fragmentos obtenidos se purificaron a partir de un gel de agarosa y se ligaron obteniéndose las siguientes construcciones de los vectores de transferencia, tal como se representa en las figuras 13 y 14:

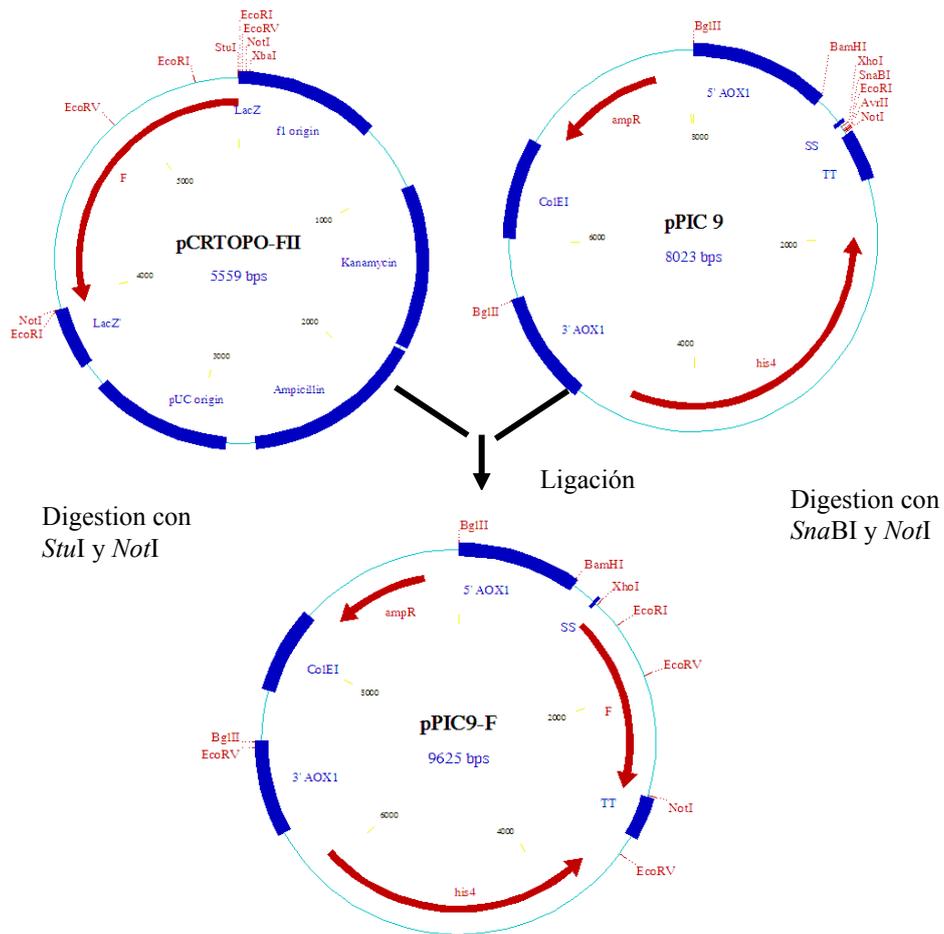


Figura 13: Esquema de los pasos seguidos para la obtención del vector pPIC9-F

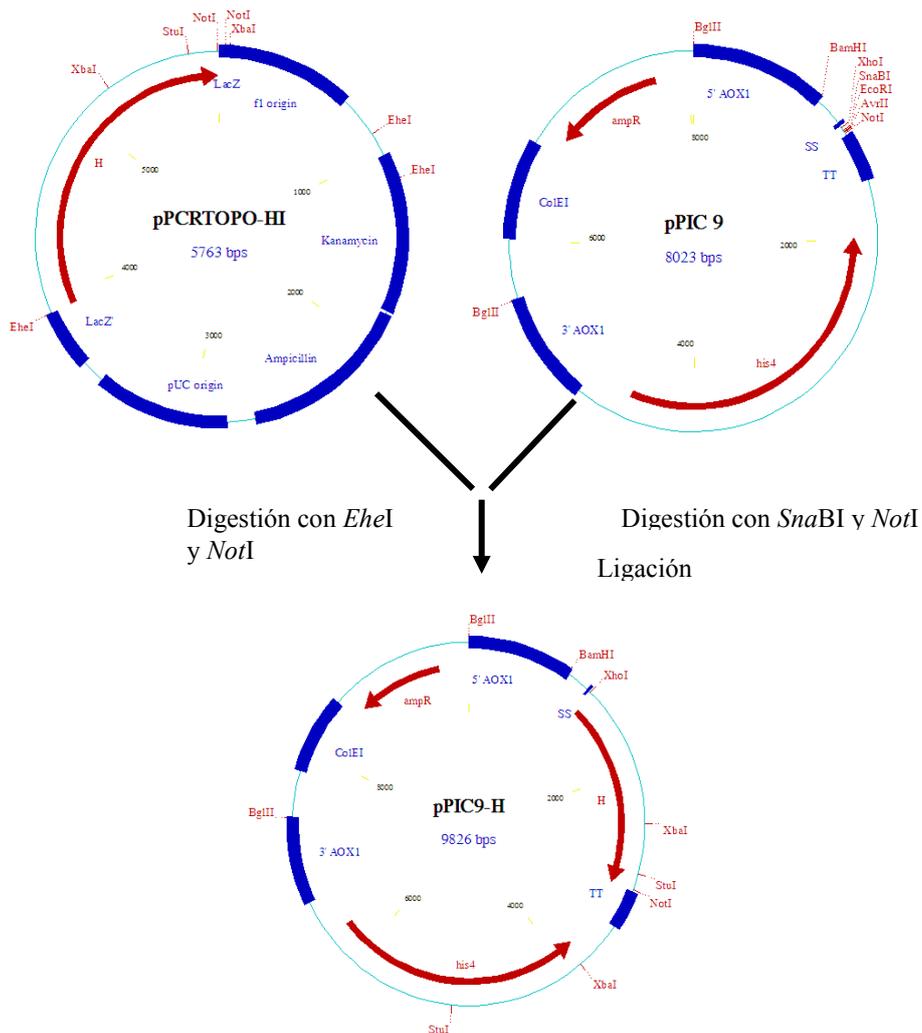


Figura 14: Esquema de los pasos seguidos para la obtención del vector pPIC9-H

Luego de la transformación de las dos construcciones en bacterias Top10 se obtuvieron 4 colonias para el vector pPIC9-F y 6 colonias para el pPIC9-H. La baja eficiencia de transformación de las bacterias se debió potencialmente al tamaño elevado de los vectores.

Para verificar la presencia de los productos de ligación se tomaron 4 colonias de cada construcción, se les realizó una miniprep y posterior digestión con la enzima *EcoRV* para pPIC9-F y pPIC9-H.

En el caso del pPIC9-F se observó un patrón de tres bandas de 4315, 3825 y 1485bp. Mientras que para el pPIC9-H de dos bandas de 6001 y 3825bp. Tal como se indica en la fig. 15:

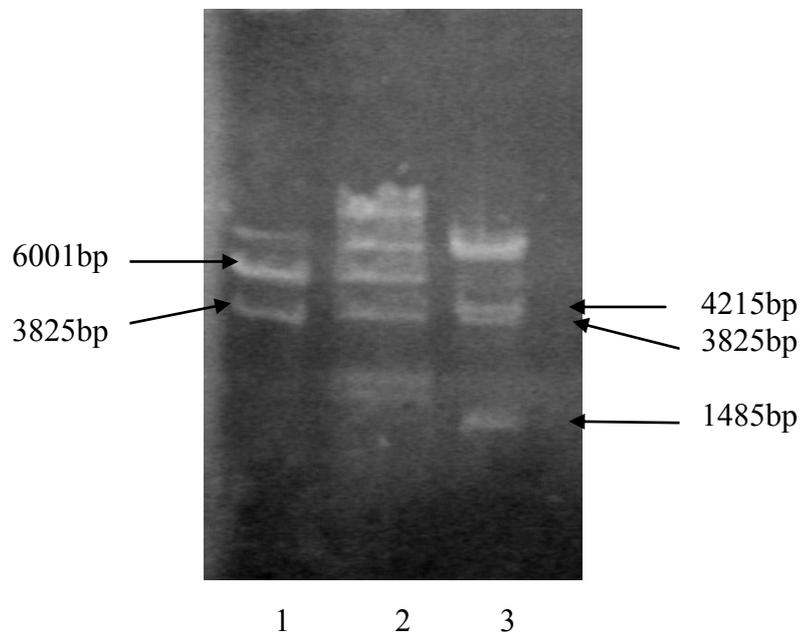


Figura 15: Digestiones de los vectores pPIC9-H y pPIC9-F. Calle 1 pPIC9-H digerido con *EcoRV*, calle 2 marcador de peso molecular λ HindIII, calle 3 pPIC9-F digerido con *EcoRV*.

Luego de verificada la presencia de cada inserto en los vectores, se tomaron 5 μ g de cada ADN plasmídico y se linealizó con la enzima *Bgl*III. Posteriormente se transformaron por electroporación la cepa GS115 de *P.pastoris*, las cuales se plaquearon luego en medio mínimo sin histidina con glucosa como única fuente de carbono (MD).

Las placas debieron ser incubadas durante 48 hs a 30°C hasta la aparición de las colonias, con lo que se confirmó el fenotipo Mut^S (Asimilación lenta del metanol) de las mismas.

Por otra parte la capacidad de crecer en placas con medios mínimos (MD, MM) confirmó que hubo recombinación de los plásmidos con los genomas de las levaduras y que las mismas adquirieron la capacidad de crecer en medio sin histidina (fenotipo His⁺). Mientras que la cepa *wild type* no fue capaz de crecer en ausencia de histidina.

De tres colonias de la construcción pPIC9-F y de 2 colonias de la pPIC9-H, las PCR utilizando los *primers* 5AOX y 3AOX dieron como resultado una banda de 2,0kb para el pPIC9-F y una banda de 2,3Kb para el pPIC9-H. (figs. 16 y 17) Lo anterior evidenció que los insertos se integraron al genoma de las levaduras.

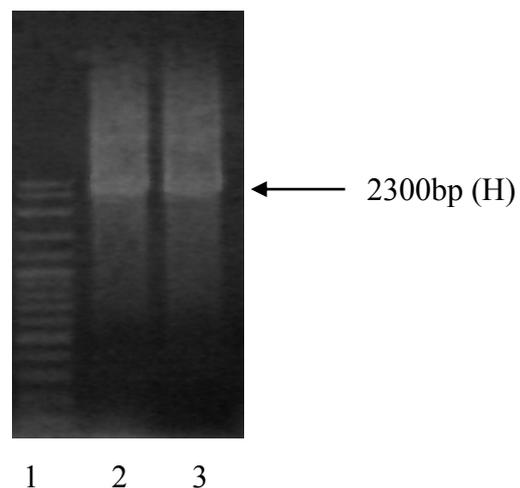


Figura 16: PCR de las levaduras recombinantes para el gen H. Calle 1 marcador de peso molecular 100bp, calle 2 clon H₃, calle 3 clon H₁₀.

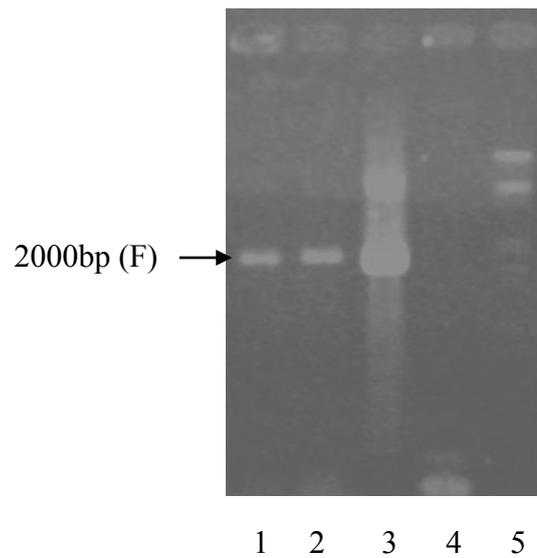


Figura 17: PCR de las levaduras recombinantes para el gen F. Calle 1 clon 4, calle 2 clon 5, calle 3 clon 6, calle 4 clon negativo, calle 5 marcador de peso molecular λ /Hind III.

Los clones recombinantes cultivados en medio mínimo con metanol (BMM) de GS115-F, GS115-H y en medio BMM suplementado con histidina para las GS115 *wild tipe* y mantenidos durante 5 días, se analizaron a partir de muestras tomadas cada 24hs para medir el crecimiento de las levaduras DO600 y las cantidades de proteínas obtenidas con espectrofotometría.

En los geles de poliacrilamida correspondientes a las proteínas totales de las levaduras no se evidenció la presencia de bandas correspondientes a las proteínas expresadas. Esto se puede deber a la gran cantidad de proteínas presentes en las levaduras. Por otra parte en los geles realizados con las proteínas presentes en los sobrenadantes de las levaduras, tampoco se evidenció la presencia de bandas correspondientes a las proteínas recombinantes.

Sin embargo cuando las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se utilizó la técnica de Western Blot para revelar las proteínas H y F₀ recombinante (la membrana revelada con anticuerpos específicos contra el virus), pudo observarse una banda

de peso molecular relativo de aproximadamente 58KDa correspondiente a F_0 , tal como se indica en la figura 18:

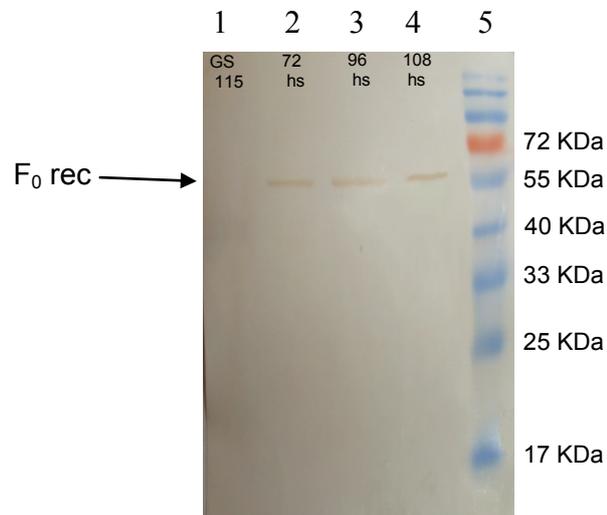


Figura 18: Western Blot de las levaduras recombinantes para el gen F a las 72, 96 y 108 hs post inducción. En la calle 1 se sembró el sobrenadante de levaduras GS115 wt (control negativo). En la calle 5 se sembró el marcador de peso molecular (PAGERuler-Fermentas).

Para la proteína H con la que se procedió de igual modo utilizando el suero policlonal canino, se observó una banda de aproximadamente 70 a 72 KDa, como se indica en la figura 19.

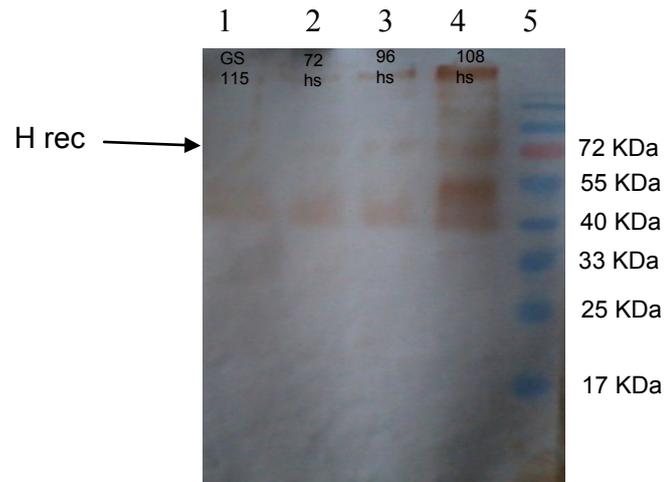


Figura 19: Western Blot de las levaduras recombinantes para el gen H a las 72, 96 y 108 hs post inducción. En la calle 1 se sembró el sobrenadante de levaduras GS115 wt (control negativo). En la calle 5 se sembró el marcador de peso molecular (PAGERuler-Fermentas).

Anticuerpos policlonales

Los resultados obtenidos luego de realizar los Western Blots a partir de células infectadas, revelados con los sueros policlonales, demostraron que los ratones produjeron anticuerpos específicos principalmente contra las proteínas de envoltura del virus.

Se pudo observar la presencia de una banda de aproximadamente 72 KDa que correspondería a la hemagutina y una banda de aproximadamente 58 KDa del precursor F_0 , tal como puede apreciarse en la figura 20:

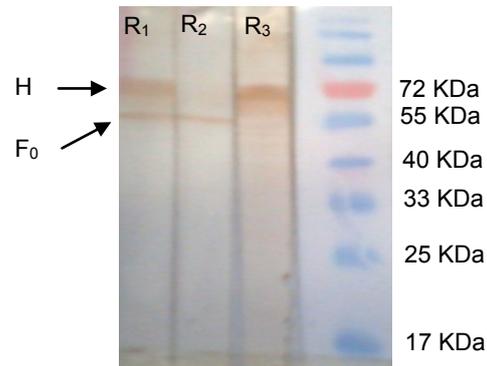


Figura 20: Western Blot con los sueros policlonales de los ratones, calle 1 (suero R₁), calle 2 (suero R₂), calle 3 (suero R₃)

Se observó además que las bandas de las proteínas virales reveladas con el suero R₁ fueron más intensas, lo cual sugiere un alto nivel de anticuerpos producidos por este ratón. Por lo tanto se utilizó dicho suero para los experimentos siguientes.

4.3 ENSAYOS SEROLÓGICOS

Western Blot

Luego del revelado se comprobó la capacidad inmunogénica de las proteínas recombinantes H y F₀ inoculadas por separado y juntas, tal como se observa en la figura 21:

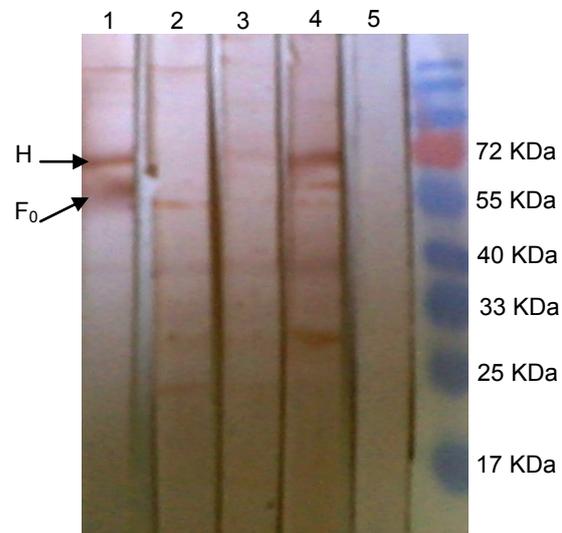


Figura 21: Western Blot con los sueros policlonales de los ratones inoculados con las proteínas recombinantes obtenidas: calle 1 (suero pool virus vacuna), calle 2 (suero pool Proteína F₀), calle 3 (suero pool Proteína H), calle 4 (Suero pool H y F₀), calle 5 (suero pool Blanco).

Se observó en la calle 1, la aparición de las bandas correspondientes a la proteína H y la F₀. En la calle 2 se observó una banda de aproximadamente 58 KDa correspondiente a F₀ del virus, con lo cual se demostró que la proteína recombinante inoculada con el adyuvante (Specol) por la vía intramuscular, produjo anticuerpos que se unieron de forma específica con la proteína homóloga perteneciente al virus. En la calle 3 se observó una banda de aproximadamente 72 KDa correspondiente la hemagutinina del virus. Por lo tanto la proteína H recombinante inoculada del mismo modo también produjo anticuerpos contra su homóloga de origen viral. Sin embargo la cantidad de anticuerpos producida por esta última fue menor que para la F₀, aún cuando la cantidad de proteína inoculada fue la misma.

En la calle 4 se observan las bandas correspondientes a las dos proteínas H y F₀ virales. Por consiguiente, la inoculación de una combinación de ambas proteínas recombinantes generó anticuerpos contra las proteínas homólogas virales. Además, el tenor de ambas bandas se vio incrementado. En cambio en la calle 5 no se observó la aparición de ninguna banda.

Neutralización viral

Se utilizaron los pools de sueros A (anti-F₀ rec), B (anti-Hrec) y C (anti-F₀rec y anti-Hrec) previamente chequeados por inmunoblotting, en un ensayo de neutralización viral, para determinar su capacidad neutralizante (Sección 3.5.3).

Luego de 48hs post-infección se observó al microscopio la aparición de efecto citopático (formación de sincicios y lisis) en los pocillos pertenecientes al control de infección (columna 7 de la placa). A las 72 hs fue evidente la destrucción de la monocapa (Fig.22).

En las columnas 1 y 2 (correspondientes al pool A) se observó la aparición de efecto citopático a partir de la dilución 1:16 (título 1/8) luego de 72hs. En cambio en las columnas 3 y 4 (pool B) se observó efecto citopático a partir de la dilución 1: 8 (título 1/4).

Por otra parte, en las columnas pertenecientes al pool C (5 y 6), los anticuerpos anti-F₀rec y anti-Hrec fueron capaces de neutralizar el virus pasadas 72hs post-infección hasta la dilución 1:32 (Fig. 22).

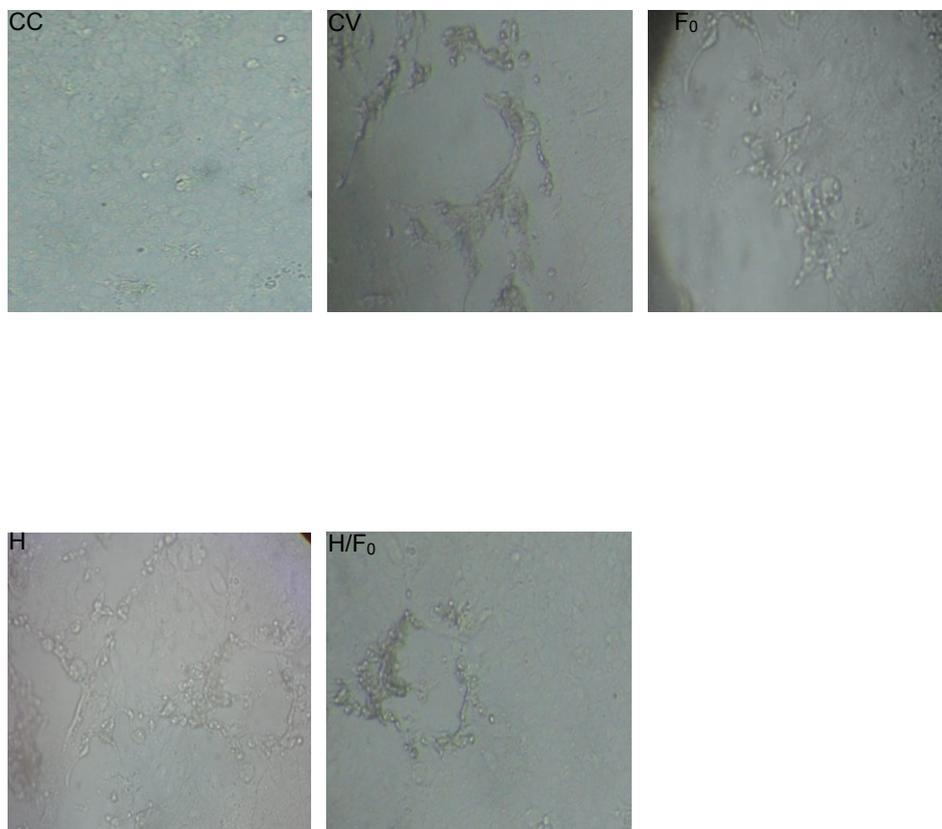


Figura 22: Ensayo de neutralización *in Vitro*. Fotografía por microscopía óptica (10X) de los cultivos de células VERO a las 72hs post-infección. CC (control células sin infectar y con suero control-ratón sin inocular); CV (control virus, sin suero); F₀ (pool A-F₀rec con specol); H (pool B-Hrec con specol); H/F₀ (pool C-H/F₀ con specol).

5. DISCUSION Y CONCLUSIONES

El Distemper canino es considerado como una de las enfermedades infecciosas más severas de los cánidos domésticos y silvestres. El control y la prevención se basan principalmente en la vacunación. Dado que la enfermedad es altamente contagiosa y con una alta tasa de mortalidad, se deben adoptar rápidas medidas, tales como el diagnóstico temprano, tratamiento y reclusión de los animales infectados tendientes a minimizar la diseminación de la enfermedad. Por otra parte, cabe destacar que existen especies salvajes que actúan como reservorio del virus, lo cual dificulta la eliminación total del virus circulante.

El control y la prevención se basan principalmente en la vacunación. La utilización de vacunas para el control de esta enfermedad se ha extendido por todo el mundo, siendo rutinario su uso en cachorros. El uso de vacunas atenuadas desarrolladas durante los años '50 ha contribuido a la prevención de la infección (Bolt y col., 1997; Iwatsuki y col., 2000). Sin embargo, últimamente se ha registrado a nivel mundial un incremento de casos clínicos en animales vacunados (Blixenkronne-Moller y col., 1993; Ek-Kommonenet y col., 1997; Haas y col., 1997; Iwatsuki y col., 2000; Summers and Appel, 1999; Uema y col., 2005). Algunas de las vacunas disponibles en nuestro país son manufacturadas con cepas virales atenuadas por pasajes sucesivos en huevos embrionados o cultivos celulares. Estas requieren de varios pasos de concentración y purificación, lo cual incrementa los costos de producción. Además, han demostrado traer algunas consecuencias secundarias tales como encefalitis post vacunales o enfermedad clínica si se las inocula en especies salvajes susceptibles (Hartey y col., 1974). Estas evidencias sugieren que se deberían desarrollar

nuevas metodologías en la elaboración de vacunas para hacerlas más efectivas, seguras y económicas. Como se expresó en la introducción, una alternativa es la utilización de proteínas virales obtenidas mediante la tecnología del ADN recombinante, lo que permitiría eliminar las proteínas celulares, reduciendo las reacciones adversas o alérgenos asociados a las vacunas producidas en embriones de pollo o cultivos celulares.

La protección contra el CDV mediante la vacunación se basa principalmente en la respuesta del sistema inmune contra las glicoproteínas de envoltura (la hemaglutinina y proteína de fusión), por lo que se consideró que las mismas deben ser componentes esenciales de una vacuna recombinante (Cherpillod y col., 1999). Es por eso que el principal objetivo de este trabajo de tesis fue el de producir las proteínas de envoltura del CDV mediante la tecnología del ADN recombinante y evaluar su capacidad inmunogénica teniendo a la vista el desarrollo de una vacuna.

En el caso particular de la proteína de fusión F, la cual esta constituida por dos subunidades (originadas a partir de un precursor proteico preF₀), se decidió expresar el precursor F₀, eliminando el péptido señal ubicado en el extremo NH₂-terminal de la F₀ porque dicho péptido no forma parte de la proteína madura (Plattet y col., 2007).

Por otra parte, se decidió expresar la glicoproteína H completa dado que es otra proteína de suma importancia inmunológica y además se encuentra distribuida uniformemente sobre la envoltura viral.

El sistema de expresión utilizado para obtener las proteínas H y F₀, basado en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*, resultó ser relativamente simple y eficiente por diversas razones. Primero, la sencillez para manipular genéticamente al sistema y la selección de las levaduras recombinantes por auxotrofia a histidina. Esto último permitió el clonado de los genes de forma simple y rápida. Además, la inserción de los genes de interés

dentro del genoma de la levadura ofreció la ventaja de poder realizar cultivos de alta densidad celular sin requerir de una presión de selección constante como la de un antibiótico.

Dado que el metabolismo de *P.pastoris* es principalmente aeróbico (a diferencia de *S.cerevisiae*) puede crecer en fermentadores en cultivos a gran escala, alcanzando densidades celulares muy elevadas. (Cino y col., 1999; Cregg y col., 1993). Además una de las mayores ventajas del sistema de expresión es que puede realizar modificaciones post-traduccionales muy parecidas a las de organismos eucariotas superiores. En diversas proteínas expresadas en *P.pastoris* no se han observado los fenómenos de hiperglicosilación, que sí se observan en otras levaduras y que puede generar una respuesta inmune exacerbada impidiendo su utilización terapéutica (Cregg y col., 1993).

Por otra parte, la utilización dual del metanol como fuente de carbono e inductor, por parte de *P.pastoris*, y el elevado nivel de transcripción de los genes controlados por el promotor AOX1, hacen de este sistema una alternativa económica y confiable para la producción de proteínas heterólogas (Vassileva y col., 2001).

A la fecha de realización de este trabajo, no hay información disponible que se hayan expresado alguna de estas proteínas en otros sistemas de levaduras, con lo cual todos los datos obtenidos son de suma importancia para estudios posteriores relacionados con la elaboración de una vacuna recombinante mediante esta metodología.

En el presente trabajo los niveles de expresión obtenidos para las proteínas H y F₀ fueron bajos (35 y 60 µg/ml); sin embargo, el sistema de expresión en *P.pastoris* permitió la obtención de ambos polipéptidos recombinantes, sin la necesidad de tantos pasos de optimización de la expresión como los que se requieren para otros sistemas de expresión.

Pudo observarse que la F₀ obtenida de forma recombinante mostró un peso molecular de aproximadamente 58 KDa y dicho valor se correspondió con el estimado por Iwatsuki y col. (1997), para la forma glicosilada. Esto sugiere que la F₀ recombinante obtenida contiene algún tipo de modificación postraduccional.

En el caso de la H recombinante el peso molecular obtenido resultó el esperado (72KDa forma glicosilada), lo cual sugiere que se realizaron modificaciones postraduccionales. Además, al analizar la potencial secuencia de la proteína H (Sección 4.1) observamos que los sitios posibles de glicosilación se encontraban intactos. Sin embargo se observaron algunas bandas adicionales a las 108 hs de aproximadamente 55 KDa que podría deberse a una síntesis incompleta de la proteína.

Con la metodología empleada se consiguió la secreción de ambas proteínas con un elevado nivel de pureza, para lo cual se utilizaron condiciones sencillas de cultivo y purificación. Estos resultados ponen de manifiesto que los sistemas de expresión basados en levaduras son perfectamente implementables al momento de desarrollar una nueva vacuna y producirla a gran escala.

Con el objetivo de evaluar la capacidad inmunogénica de las proteínas expresadas mediante el análisis de la respuesta inmune de dichas proteínas se usó el ratón BALB/c como modelo *in vivo*.

Se decidió inocular ambas proteínas recombinantes obtenidas, combinadas con un adyuvante oleoso (Specol) para mejorar la respuesta inmune en los animales de experimentación, dado que muchas proteínas recombinantes suelen ser pobres como inmunógenos. Algunos autores (Leenars y col., 1995; Stills y col., 2005) lo han empleado como una alternativa al Adyuvante de Freund, dado que produce menos efectos adversos al administrarlo en diversas vías pero en este trabajo dicho adyuvante no fue evaluado.

En base a los resultados obtenidos por Western Blot se concluyó que, tanto los ratones inoculados con la proteína H, como aquellos inoculados con la F₀ y los inoculados con ambos polipéptidos, produjeron anticuerpos que reconocieron a las proteínas homónimas del CDV. El uso del adyuvante oleoso Specol permitió incrementar la respuesta del sistema inmune de dichos ratones.

Las bandas accesorias en las calles (1- 4) mostradas en la figura 20, pudieron deberse a la presencia de impurezas, tanto en la vacuna como en las proteínas recombinantes inoculadas en los ratones, las cuales también pudieron haber producido anticuerpos que reaccionaron de manera inespecífica con algunas proteínas celulares. Cabe destacar que en las 4 calles se visualizó un patrón similar de bandas inespecíficas. Sin embargo cuando observamos la calle 5 (suero control negativo-ratones sin inocular) no se visualizó ninguna banda, con lo cual podríamos decir que sólo los ratones inoculados generaron anticuerpos, que además reaccionaron de forma inespecífica con proteínas celulares.

Por otra parte, otra posible explicación de la inespecificidad observada pudo ser debida a que los anticuerpos específicos contra las proteínas virales producidos en los ratones hayan reaccionado con los productos proteicos expresados en las células infectadas, pero que dichos productos no se encontraran completamente sintetizados o bien parcialmente degradados.

Al analizar la capacidad neutralizante de los sueros obtenidos, se pudo determinar que el pool A (anti-F₀ rec) fue capaz de neutralizar al virus hasta dilución 1:16, el pool B neutralizó hasta la dilución 1:8. Sin embargo el pool C neutralizó al virus hasta la dilución 1:32. Esta diferencia pudo deberse, a que en el caso del pool C, los anticuerpos contra las dos proteínas recombinantes tuvieron un efecto cooperativo a la hora de neutralizar al virus.

Por otro lado, al observar la monocapa de células infectadas incubadas con el pool C, se pudo constatar que el efecto citopático en dicha monocapa no era tan extensivo y era proporcionalmente menor que para A y B.

Cabe destacar que los niveles de neutralización viral para CDV se consideran completamente protectivos en caninos domésticos, si son mayores a 1:100 y son parcialmente protectivos cuando son menores a 1:100, cuando se utilizan vacunas a virus vivo atenuado (Bronson y col., 2007).

Si bien en el presente trabajo no hemos podido lograr títulos de esa magnitud, debemos destacar que el modelo murino empleado para la producción de anticuerpos específicos no representa el mejor modelo para el estudio del distemper canino. Dado que no contamos con bioterios que puedan producir caninos libres de patógenos, sólo se podrían haber utilizado como modelo para el estudio del distemper canino algunos miembros de la familia Mustelidae tales como *Mustela visson*, *Mustela mink* o *Mustela plutorius* (hurón), que son susceptibles a infectarse con CDV. Sin embargo, cualquiera de estos últimos son muy costosos de mantener en cautiverio, además, tampoco contamos con las instalaciones apropiadas para su mantenimiento y cuidado. Por lo tanto, en nuestro trabajo tuvimos que limitarnos al uso de roedores como animales de experimentación.

A pesar de lo expuesto con anterioridad, algunos autores como Pardo y col., (1997) han descrito que en sus estudios, en los cuales analizaron vacunas recombinantes c9ontra CDV, hallaron que los niveles de los anticuerpos obtenidos post-vacunación fueron menores que para las vacunas a virus vivo modificado. Sin embargo estas vacunas recombinantes demostraron que fueron capaces de brindar una protección efectiva en caninos desafiados con una cepa viral patógena.

En función de la bibliografía referente al tema, se puede afirmar que la inmunidad contra el CDV está relacionada principalmente con los anticuerpos producidos contra las proteínas de la envoltura viral. Sin embargo, la inmunidad obtenida como resultado de la infección natural con el virus implica una respuesta inmune humoral y celular. La mejor forma de homologar la inmunidad lograda luego de la infección natural es la utilización de vacunas a virus atenuado. Sin embargo, el uso de las mismas ha sido vinculado a casos graves de encefalitis post vacunal (Hartey y col., 1974). El método de producción empleado implica sucesivos pasajes del virus por células o cultivos celulares, por lo que se considera muy trabajoso. Además, la eficiencia de producción es baja debido a la baja tasa de replicación de las cepas empleadas. Otro problema es la reversión de cepas vacunales a virulentas. Una manera de subsanar estos inconvenientes es la elaboración de una vacuna recombinante, más efectiva, segura y económica, acorde a los modernos sistemas de producción de productos biotecnológicos.

El mayor desafío en el desarrollo de una vacuna recombinante estaría dado por la posibilidad de obtener una buena respuesta inmune (humoral y celular), superior a la lograda por medio de la vacuna convencional. En este trabajo no se evaluó la respuesta inmune a nivel celular.

En el año 2003., Hirama y col. han reportado que la hemaglutinina contiene epítopes que son blanco de las células-T citotóxicas. Por otra parte Ghosh y col., (2001) encontraron epítopes T helper en la proteína de fusión. Por lo tanto se considera que los anticuerpos producidos por ambas proteínas pueden proveer de una buena inmunidad humoral y celular contra el virus.

Con los resultados obtenidos en este trabajo pudimos demostrar que:

- A) Las proteínas H y F₀ expresadas en levaduras fueron capaces de producir anticuerpos en ratones.
- B) Los anticuerpos presentes en los sueros de dichos ratones se unieron específicamente a las proteínas virales homónimas.
- C) Los anticuerpos producidos y analizados resultaron poseer actividad neutralizante *in vitro*.

En conclusión, los resultados obtenidos indican que el sistema de expresión en levaduras *P.pastoris* debería considerarse una alternativa muy promisorio para la elaboración de una vacuna más sencilla, segura y económica. También, puede abrir camino a futuros desarrollos de vacunas más eficientes, por ejemplo la combinación de ISCOM con las proteínas recombinantes o la utilización de otros adyuvantes menos agresivos, tales como las emulsiones en agua de Squalene (AddaVax™), las cuales han demostrado que incrementan la respuesta inmune respecto de los adyuvantes oleosos y las sales de aluminio. Este trabajo deja planteada la necesidad futura de realizar ensayos exhaustivos sobre la capacidad inmunogénica de ambas proteínas recombinantes, principalmente estudios de protección *in vivo* y desafío a alguna especie susceptible con diferentes cepas virales.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Amude AM, Alfieri AF, Alfieri AA. Clinical courses and neurological signs of distemper virus infection in dogs. *Cur. Res. Tech. and Edu. Top. in Appl Mric. and Microb. Biotechnology A. Mendez-Vilas. Brazil. 2010.*
2. An DJ, Kim TY, Song DS, Kang BK, Park BK. An immunochromatography assay for rapid antemorten diagnosis of dogs suspected to have canine distemper. *J. of V. Methods. 2008; 147:244-249.*
3. Anderson DE, Von Messling V. Region between the canine distemper virus m and F genes modulates virulence by controlling fusion protein expresion. *J. Virol. 2008; 82: 10510-10518.*
4. Appel MJG. Reversion of virulence of attenuated canine distemper virus *In Vivo* and *In Vitro*. *J. Gen. Virology. 1978; 41: 385-393.*
5. Appel MJ, Summers BA. Recents advances in canine infectious diseases. *Int. Vet. Inf. Service. (www.Ivis.org), Ithaca, New York.1999.*
6. Astete Torrejón JM. Patogenia del virus del moquillo canino. Revisión bibliográfica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina Veterinaria.
7. Barrett T. Morbillivirus Infections, with special emphasis on Morbillivirus of carnivores. *V. Microbiology. 1999; 69: 3-13.*
8. Beineke A, Puff C, Seehusen F, Baumgärtner W. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *J of Vet. Immunology and Immunopathology. 2009; 127: 1–18.*

9. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979; 7(6): 1513-22.
10. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Micrograms Quantities of Proteins Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-54.
11. Bronson E, Deem SL, Sanchez C, Murray S. Serologic response to a Canarypox-vectored canine distemper virus vaccine in the giant panda. *J. of Zoo and Wildlife Medicine.* 2007 38(2): 363-366.
12. Carpenter MA, Appel MJG, Roelke-Parker ME, Munson L, Hofer H, East M, O'Brien SJ. Genetic characterization of canine distemper virus in serengeti carnivores. *J. of Vet. Immunology and Immunopathology.* 1998; 65: 259-266.
13. Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. of FEMS Microbiol Rev.* 2000; 24(1):45-66.
14. Cherpillod P, Beck K, Zurbriggen A, Wittek R. sequence analysis and expression of attachment and fusion proteins of canine distemper virus Wild-Type Strain A75/15. *J. of Virology.* 1999; 73: 2263-2269.
15. Cino J. high yield protein production from *pichia pastoris* yeast. a protocol for benchtop fermentation. Product Manager, New Brunswick Scientific, PO Box 4005, Edison, NJ. Web: www.nbsc.com.
16. Cregg JM, Vedvick TS, Rasehke WC. recent advances in expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *J. of Biotechnology (N Y).* 1993; 11(8):905-10.
17. Cruz CD, Palossari H, Parisien JP, Devaux P, Cattaneo R, Ouchi T, Horvath CM. Measles virus V protein inhibits p53 family member p73. *J. of Virol.* 2006; 80: 5644-50.

18. Curran M, Clarke DK, Rima K. The nucleotic sequence of the gene encoding the attachment protein h of canine distemper virus. *J. Gen. Virol.* 1991; 72: 443-447.
19. Davis LG, Kuehl WM, Battery JF. *Methods in molecular biology*. 2nd ed. Norwalk: Appleton& Lange; 1994.
20. Deem SL, Spelman L, Yates RA, Montali RJ. canine distemper in terrestrial carnivores: A Review. *J. of Zoo and Wildlife Medicine*. 2000; 31: 441-451.
21. Diallo A. Morbillivirus group: genome organization and proteins. *J. of V. Microbiology*.1990. 23; 155-163.
22. Dietzel E, Anderson DE, Castan A, Von Messling V, Maisner A. Canine distemper virus matrix protein influences particle infectivity, particle composition, and envelope distribution in polarized epithelial cells and modulates virulence. *J. Of Virology*. 2011; 85: 7162-7168.
23. Evans SA, Belsham GJ, Barret T. The role of 5' nontranslated regions of the fusion protein mRNAs of canine distemper virus and rinderpest virus. *J. of Virology*. 1990; 177: 317-323.
24. Frisk AL, König M, Moritz A, Baumgärtner W. Detection of canine distemper virus nucleoprotein rna by Reverse Transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *J. Clin. Microbiology*. 1999; 37(11): 3634-3643.
25. Frölich K, Czupalla O, Haas L, Hentschke J, Dedek J, Fickel J. Epizootiological investigation of canine distemper virus in free-ranging carnivores from Germany. *J. of Vet. Microbiol.* 2000; 74: 283-292.
26. Gallo Calderon M, Remorini P, Periolo O, Iglesias M, Mattion N, La Torre J. Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine distemper virus from

- vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina. *J. of V. Microbiology*. 2007; 125: 341-349.
27. Gardner AE, Dutch R. A conserved region in the F₂ subunit of *Paramyxovirus* fusion proteins is involved in fusion regulation. *J. Of Virology*. 2007; 81(15): 8303-8314.
28. Gencay A, Oncel T, Karaoglu T, Sancak AA, Demir AB, Ozkul A. Antibody prevalence to canine distemper virus (CDV) in Turkey. *J. of Rev. Med. Vet.* 2004; 155(8-9): 432-434.
29. Gillespie JH. The virus of canine distemper. Veterinary Virus Research Institute, New York State Veterinary College, Cornell University, Ithaca N.Y.
30. Ghosh S, Walker J, Jackson DC. Identification of canine T-cell Epitopes from the fusion protein of canine distemper virus. *J. of Immunology*. 2001; 104: 58-66.
31. Harder TC, kenter M, Siebelink Vos K, Huisman W, Van Amerongen G, Örvell C, Barrett T, Appel MJG, Osterhaus ADME. Canine distemper virus form diseased large felids: Biological properties and phylogenetic relationship. *L. J. of Gen. Virol.* 1996; 77: 397-405.
32. Hernandez LD, Hoffman LR, Wolfberg TG, White JM. Virus-cell and cell-cell fusion. *J. of Annu. Rev Cell Dev. Biol.* 1996; 12: 627-661.
33. Hirama K, Togashi K, Wakasa C, Yoneda M, Nishi T, Endo Y, Miura R, Tsukiyama-Kohara K, Kai C. Cytotoxic T-Lymphocyte activity specific for hemagglutinin (H) protein of canine distemper virus in dogs. *J.of Med. Vet. Sci.* 2003; 65 (1): 109-112.

34. information sheet canine distemper virus(CDV). [Online]; 2006. Citado en agosto de 2011. Disponible en URL:
http://www.sheltermedicine.com/portal/is_canine_distempervirus.shtml.
35. Institute of Laboratory Animal Resources. Guide for the care and use of Laboratory Animals. National Research Council. Washington, DC USA. National Academy Press, 2011. Disponible en URL: <http://www.nap.edu>.
36. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Universal database, versión 3.00.046. Paramixoviridae. [Online]; 2004. Citado en junio de 2011. Disponible en URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB>.
37. Iorio RM, Mahon PJ. Paramyxoviruses: different receptor-diferent mechanism of fusion. *J. of Trends Microbiol.* 2008; 16: 135-137.
38. Iwatsuki K, Miyashita N, Yoshida E, Gemma T, Shin YS, Mori T, Hirayama N, Kai C, Mikami T. Molecular and philogenetic análisis of the haemagglutinin (H) proteins of field isolates of canine distemper virus virus from naturally infected dogs. *J. Of General Virology.* 1997; 78: 373-380.
39. Iwatsuki K, Tokiyoshi S, Hirayama N, Nakamura K, Ohashi K, Wakasa C, Mikami T Kai C. Antigenic diferences in the H proteins of canine distemper viruses. *J. of V. Microbiology.* 2000; 71: 281-286.
40. Jensen TH, Nielsen L, Aasted B, Blixenkrome-Møller M. Early life DNA vaccination with the H gene of canine distemper virus induces robust protection against distemper. *Vaccine.* 2009; 27: 5178-5183.
41. Kövamees J, Blixenkronne-Møller M, Norrby E. The nucleotide and predicted amino acid sequence of attachment protein of canine distemper virus. *J. of V. Research.* 1991; 19: 223-234.

42. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of head of Bacteriophage T₄. *Nature* 1970; 227(5259): 680-5.
43. Layne E. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *J. of methods of Enzimology*. 1957; 10: 447-455.
44. Lee JK, Prussia A, Paal T, White LK, Snyder JP, Plemper RK. Functional interaction between Paramyxovirus fusion and attachment proteins. *J. of Biol. Chemistry*. 2008; 283(24): 16561-16572.
45. Leenars PPAM, Hendriksen CFM, Koedam MA, Claassen I, Claassen E. Comparison of adjuvants for immune potentiating properties side effects in mice. *J. of V. Immunol and Immunopathology*. 1995; 48: 123-138.
46. Llang CT, Chuehd LL, Lee KH, Huang HS, Uema M, Watanabe A, miura R, Kai C, Llang SC, Yu CK, Liu CH. Phylogenetic analysis and isolation of canine distemper viruses in Taiwan. *Taiwan Vet. Journal*. 2008; 34(4): 198-210.
47. Makrides SC. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *J. of Microbiol. Rev.* 1996 Sep; 60(3):512-38.
48. Martella V, Cirone F, Elia G, Lorusso E, Decaro N, Campolo M, Desario C, Lucente MS, Bellacicco AL, Blixenkron-Møller M, Carmichael LE, Buonavoglia C. V. Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. *J of Microbiology*. 2006; 116: 301-309.
49. Merz DC, Schied A, Choppin PW. Importance of antibodies to fusion glycoprotein of Paramyxovirus in the prevention of spread of infection. *J. of Exp. Medicine*. 1980; 151: 275-288.

50. Mochisuki M, Hashimoto M, Hagiwara S, Yoshida Y, Ishiguro S. Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of hemagglutinin genes of recent isolates from dogs in Japan. *J. of Clinical Microbiology*. 1999; 37(9): 2936-2942.
51. Mochisuki M, Motoyoshi M, Maeda K, Kai K. Complement-Mediated neutralization of canine distemper virus *in Vitro*: Cross-Reaction between vaccine Onderstepoort and field KDK-1 strain with different hemagglutinin gene characteristics. *J. of Clin and Diag. Lab. Immunology*. 2002; 9(4): 921-924.
52. Moritz A, Frisk AL, Baungartner W. The evaluation of diagnostic procedures for detection of canine distemper virus infection. *Eur.J. Comp. Anim. Pract.* 2000; 10: 37-47.
53. Morrison TG. Structure and function of a Paramyxovirus fusion protein. *J. of Biochim. Biophys. Acta*. 2003; 1614: 73-84.
54. Nielsen L, Søgaard M, Jensen TH, Andersen MK, Aasted B, Blixenkronne-Møller M. Lymphotropism and host response during acute Wild-type canine distemper virus infections in a highly susceptible natural host. *J. of Gen. Virology*. 2009; 90: 2157-2165.
55. Norrby E, Utter G, Örvell C, Appel Mj. Protection against canine distemper virus in dogs after immunization with isolated fusion protein. *J. of Virology*. 1986; 58(2): 536-541.
56. Okita M, Yanai T, Ochikubo F, Gemma T, Mori T, Maseki T, Yamanouchi K, Mikami T, Kai C. Histopathological features of canine distemper recently observed in Japan. *J. of Comp. Pathol.* 1997; 116: 403-408.
57. Pardo, M. C, J. E. Bauman, and M. Mackowiak. Protection of dogs against canine distemper by vaccination with a canarypox virus recombinant expressing canine

- distemper virus fusion and hemagglutinin glycoproteins. *Am. J. Vet. Res.* 1997; 58: 833-836.
58. Paterson RG, Lamb RA. Ability of the hydrophobic fusion-related external domain of a Paramyxovirus F protein to act as a membrane anchor. *Cell.* 1987; 48: 441-452.
59. Pearce-Kelling S, Mitchell WJ, Summers BA, Appel MJ. Growth of canine distemper virus in cultured astrocytes: Relationship to *in Vivo* Persistence and Disease. *J. of Microb. Pathog.* 1990; 8: 71-82.
60. Pecoraro MR, Teodoroff T, Massone A, Echeverria MG, Etcheverrygaray ME. Detección de la infección por distemper canino en un león (*Phantera leo*) en cautiverio. XIII Reunión Científica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. Merlo, San Luis. 15-17 de Noviembre del 2000.
61. Plattet P, Rivals JP, zuber B, Brunner JM, Zubriggen A, Wittek R. The fusion protein of Wild-Type canine distemper virus is a major determinant of persistent infection. *J. of Virology.* 2005; 337: 312-326.
62. Plattet P, Cherpillod P, Weiner D, Zipperle L, Vandeveldel M, Wittek R, Zubriggen A. Signal peptide and helical blundle domains of virulent canine distemper virus fusion protein restrict fusogenicity. *J. of Virology.* 2007; 81(20): 11413-11425.
63. Plemper RK, Lakdawala AS, Gernert KM, Snyder JP, Compans RW. Structural features of Paramyxovirus F protein required for fusion initiation. *J. of Biochemistry.* 2003; 42: 6645-6655.
64. Pomeroy LW, Bjornstad ON, holmes EC. The evolutionary and epidemoiological dynamics of the Paramyxoviridae. *J. Mol. Evol.* 2008; 66(2): 98-106.
65. Reed, L.J., Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty per cent end points. *The American Journal of Hygiene* 27, 493-497.

66. Rima BK. The proteins of Morbillivirus. *J. Gen. Virol.* 1983; 64: 1205-1219.
67. Roelke-Parker M, Munson EL, Packer C, Kock R, Cleaveland S, Carpenter M, O'Brein SJ, Pospischil A, Hofman-Lehmann R, Lutz H. A canine distemper virus epidemic in Serengeti Lions (*Pantheras Leo*). *Nature.* 1996; 379: 441-445.
68. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press; 1989.
69. Santos-López G, Hernandez J, Borraz-Argüello MT, Ramirez-Mendoza H, Vallejo V, Reyes-Leyva J. Proteins of porcine Rubulavirus: Structure, function and pathological implications. *J. of Arch. Med. Vet.* 2004; 36(2): 119-136.
70. Sato T, Yangi M, Yamanouchi K. Analysis of structural proteins of measles, canine distemper and rinderpest viruses. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 1981; 34: 355-364.
71. Schmid E, zurbriggen A, Gassen U, Rima B, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J. Antibodies to CD9, a tetraspan transmembrane protein, inhibit canine distemper virus-induced cell-cell fusion but not virus-cell fusion. *J. Virol.* 2000; 74: 7554-7561.
72. Seki F, Ono N, Yamaguchi R, Yanagi Y. Efficient isolation of Wild strains of canine distemper virus in VERO cells expressing SLAM (CD150) and their adaptability to Marmoset B95a cells. *J. Virol.* 2003; 77: 9943-9950.
73. Sidhu MS, Menonna JP, Cook SD, Dowling PC, Udem SA. Canine distemper virus L gene: Sequence and comparison with related viruses. *J. of Virology.* 1993; 193: 50-65.
74. Stern LB, Greenberg M, Ghshoni JM, Rozenblatt S. The Hemagglutinin envelope protein of canine distemper virus (CDV) confers cell tropism as illustrated by CDV and Measles virus Complementation analysis. *J. Virol.* 1995; 71: 1661-1668.

75. Stills HF. Adjuvants and Antibody Production: Dispelling the myths associated with Freund's complete and others adjuvants. *J of ILAR* . 2005; 46(3): 280-293.
76. Tatsuo H, Ono N, Yanagi Y. Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. *J. of Virology*. 2001; 75(13): 5842-5850.
77. Taylor J, Pincus S, Tartaglia J, Richardson C, Alkhatib G, Briedis D, Appel M, Norton E, Paoletti E. Vaccinia virus recombinants expressing either the Measles virus fusion or hemagglutinin glycoprotein protect dogs against canine distemper virus challenge. *J of Virology*. 1991; 65(8): 4263-4274.
78. TenOever BR, Servant MJ, Grandvaux n, Lin R, Hidcott J. Recognition of the Measles virus nucleocapsid as a mechanism of IRF-3 activation. *J. of Virology*. 2002; 76(8): 3659-3669.
79. Vagnozzi A, Carrillo C. Análisis comparativo del gen P de Rinderpest virus (RPV). *J. of In. Vet.*2006; 8(10): 67-91.
80. Varsanyi TM, Jornvall H, Örvell C, Norrby E. F₁ polypeptides of two canine distemper virus strains: variation in the conserved N-terminal hydrophobic region. *J. of Virology*. 1987; 157: 241-244.
81. Vassileva A, Chugh DA, Swaminathan S, Khanna N. Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* using the GAP promoter. *J. of biotechnology*. 2001; 88: 21-35.
80. Von Messling V, Harder TC, Moennig V, Rautenberg P, Nolte I, Haas L. Rapid and sensitive detection of immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies against canine distemper virus by a new recombinant nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. *J. of Clin. Microbiology* 1999 Apr 37 (4) 1049–1056

81. Von Messling V, Cattaneo R. Amino-Terminal Sequence Modulates Canine Distemper Virus Fusion Protein function. *J. of Virology*. 2002; 76(9): 4172-4180.
82. Von Messling V, Zimmer G, Herrler, Haas L, Cattaneo R. The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *J. of Virology*. 2001; 75(14): 6418-6427.
83. Von Messling V, Milosevic D, Devaux P, Cattaneo R. Canine distemper virus and Measles virus fusion glycoprotein trimers: Partial membrane-proximal ectodomain cleavage enhanced function. *J. of Virology*. 2004;78(15): 7894-7903.
84. Von Messling V, Springfield C, Devaux P, Cattaneo R. A Ferret model of canine distemper virus virulence and immunosuppression. *J. of virology*. 2003; 77(23): 12579-12591.
85. Welter J, Taylor J, Tartaglia J, Paoletti E, Stephensen CB. Mucosal vaccination with recombinant poxvirus vaccines protects ferrets against symptomatic CDV infection. *Vaccine*. 1999; 17: 308-318.
86. Zipperle L, Langedijk JPM, Örvell C, Vandeveld M, Zubriggen A, Plattet P. Identification of key residues in virulent canine distemper virus hemagglutinin that control CD150/SLAM-binding activity. *J. of Virology*. 2010; 84(18): 9618-9624.