

Expresión estable de la proteína E2 del virus de la diarrea viral bovina en cultivos *in vitro* de tabaco y análisis de la respuesta inmune humoral en ganado inmunizado con extractos de hojas de tabaco agroinfiltradas que expresan la proteína E2

Melina Laguia-Becher^{1,2 #}, Guillermo Nelson^{1 #}, Valeria Ricco^{1,2}, Martín L. Bari^{1,2,3}, María A. Alvarez^{1,2,3*}

1 Centro de Estudios Biomédicos, Básicos, Aplicados y Desarrollo (CEBBAD), Departamento de Ciencias Bioquímicas y Farmacológicas, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad Maimónides, Hidalgo 775, Ciudad de Buenos Aires, República Argentina.

2 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Godoy Cruz 2290, Ciudad de Buenos Aires, República Argentina.

3 Carreras de Farmacia y Bioquímica, Cátedra de Farmacobotánica y Farmacognosia, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Maimónides, Hidalgo 775, Ciudad de Buenos Aires, República Argentina.

Ambos autores contribuyeron en igual medida

* Autor a quien dirigir la correspondencia: alvarez.mariaalejandra@maimonides.edu

Resumen

Nuestro objetivo fue comparar los niveles de expresión de la proteína E2 del virus de la diarrea viral bovina (VDVB), expresada mediante transformación estable o transitoria, en plantas de tabaco. Además, se determinó la capacidad de inducción de anticuerpos neutralizantes anti-E2 en ganado mediante la inmunización con una vacuna experimental formulada con extracto de hojas de tabaco agroinfiltradas que expresan transitoriamente una versión de la proteína E2 de retención en retículo endoplasmático (E2-ER). Los callos y las suspensiones celulares obtenidos luego de la transformación estable expresaron las versiones de la proteína E2 direccionada al apoplasto (E2-Apo) y de retención en retículo endoplasmático. Los niveles de expresión en callos fueron de 3 µg/g de peso fresco (PF), lo que equivale a 1,15 % de las proteínas totales solubles (PTS). Ambas versiones de la proteína recombinante, E2-Apo y E2-ER, fueron detectadas en la biomasa de las suspensiones celulares, pero en niveles muy inferiores a los obtenidos para callos. La inmunización del ganado con una vacuna experimental, conteniendo extracto de hojas de tabaco agroinfiltradas (60 µg de E2-ER) y el adyuvante Al(OH)₃ Hydrogel (90:10), indujo un alto nivel de anticuerpos anti-E2, con un 87,5 % de seroconversión y un título promedio considerado inmunoprotector. Podemos concluir que los niveles de expresión de la proteína E2 en callos son significativamente mayores que los obtenidos en suspensiones celulares, pero menores que los obtenidos mediante la expresión transitoria en hojas agroinfiltradas. El ganado inmunizado con la vacuna experimental mostró una respuesta humoral fuerte, lo que predice que puede ser utilizada en el desarrollo de una vacuna a subunidades contra VDVB.

Stable expression of the E2 protein from the bovine viral diarrhea virus in *in vitro* cultures from tobacco and the humoral immune response induced in cows by tobacco-agroinfiltrated leaf extracts

Summary

Our goal was to compare transient and stable plant expression strategies for the production of the E2 protein from Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) and to test the ability to induce the production of neutralizing anti-E2 antibodies in cattle from an experimental vaccine containing agroinfiltrated tobacco leaf extracts expressing the E2-ER version. Stably transformed tobacco calluses and cell suspensions expressing the apoplast-directed (E2-Apo) and endoplasmic reticulum-retained (E2-ER) E2 protein versions have been established. The E2 expression levels in calluses were similar for both versions and were estimated to be 3 µg/g fresh weight (FW), corresponding to 1.15 % of total soluble protein (TSP). The E2-Apo and E2-ER proteins were detected in the biomass of cell suspension cultures but only after sample concentration, indicating that calluses produce higher levels of E2 than cell suspension cultures. On the other hand, immunization of cattle with an experimental vaccine constituted by an aqueous extract containing E2 transiently expressed in tobacco leaves (60 µg of E2-ER) and Al(OH)₃ Hydrogel adjuvant (90:10) produced a high level of anti-E2 antibodies (87.5 % seroconversion) with titers considered to be immunoprotective. The E2 expression levels in calluses were significantly higher than those obtained in cell suspension cultures but lower than those attained by transient expression in agroinfiltrated leaves. The immunized cattle developed a strong humoral response showing the potential of the plant-made E2 protein to develop a subunit vaccine against BVDV.

Palabras clave: Virus de la diarrea viral bovina – proteína E2 – cultivos *in vitro* de tabaco – vacuna a subunidades

Key words: Bovine viral diarrhea virus – E2 protein – tobacco *in vitro* cultures – subunit vaccine

Introducción

El virus de la diarrea viral bovina (VDVB) causa una de las enfermedades virales más comunes en el ganado, responsable de importantes pérdidas económicas en todo el mundo (Richter y col., 2017). Se trata de un virus a ARN de cadena positiva perteneciente al género *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae*. Los VDVB son genética y antigénicamente diversos. La enfermedad infecciosa es controlada mediante dos estrategias principales: la eliminación de los animales persistentemente infectados y la vacunación. Se han desarrollado vacunas a virus inactivados y a virus atenuados, pero poseen desventajas en cuanto a costos, riesgos y efectividad además de ofrecer una protección incompleta contra dicho virus (Ridpath, 2013). Una alternativa atractiva son las vacunas a subunidades utilizando la glicoproteína E2, una proteína de la cubierta que es el principal inmunógeno del virus (Bolin, 1993). Se ha demostrado que los anticuerpos neutralizantes dirigidos contra E2 juegan un rol fundamental en la defensa contra la infección por VDVB (Thomas y col., 2009). Por este motivo, dicho antígeno ha sido expresado en diversas plataformas y su inmunogenicidad evaluada en diferentes modelos animales (Cai y col., 2018; Chung y col., 2018; Hossain y Rowly, 2018; Bellido y col., 2020; Jia y col., 2020).

Las plataformas vegetales ofrecen diversas ventajas sobre otros sistemas de expresión en lo que se refiere a vacunas a subunidades, incluidas el bajo costo de la generación de biomasa y la rápida escalabilidad, los riesgos mínimos de contaminación con patógenos animales y toxinas y la capacidad de producir modificaciones post-traduccionales complejas (Sabalza y col., 2014; Fahad y col., 2015; Moustafa y col., 2016). Por otra parte, una estrategia para incrementar los rendimientos de proteínas recombinantes es la dirección de la expresión de la proteína a diferentes espacios subcelulares tales como el retículo endoplasmático o el apoplasto (Ferraro y col., 2008; Laguia-Becher y col., 2010).

La proteína E2 fusionada a una molécula dirigida a células presentadoras de antígeno ya fue expresada en alfalfa y se obtuvieron niveles altos de anticuerpos neutralizantes específicos en cobayos y ganado (Pérez Aguirreburualde y col., 2013). Por otra parte, nuestro grupo logró la expresión transitoria de una versión truncada de la glicoproteína E2 direccionada al retículo endoplasmático (E2-ER) del VDVB-tipo 1 Singer, una de las variantes que se encuentran en nuestro país infectando al ganado vacuno, en hojas de tabaco (Nelson y col., 2012). La acumulación en las hojas agroinfiltradas fue de 20 µg/g de peso fresco (PF). También formulamos una vacuna experimental conteniendo el extracto de las hojas agroinfiltradas que expresaban E2-ER y un adyuvante acuoso u oleoso que indujo la producción de anticuerpos neutralizantes en cobayos (Nelson y col., 2012).

Está demostrado que los cultivos *in vitro* son una de las plataformas alternativas para la producción de proteínas recombinantes en plataformas vegetales (Martínez y col., 2005; López y col., 2010). Estos sistemas tienen, además de

las ventajas más arriba mencionadas, otras ventajas intrínsecas. Por ejemplo, como el medio de cultivo se caracteriza por tener bajos niveles de proteínas, la extracción de la proteína de interés es más sencilla y económica cuando ésta se secreta al medio ambiente (Doran, 2006). Asimismo, al desarrollarse en ambientes controlados es posible trabajar en condiciones de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y de Laboratorio (BPL) tal como es requerido por la industria farmacéutica (Fischer y col., 2012; Merlin y col., 2014). Por ese motivo, en este trabajo avanzamos en nuestros estudios y además de construir una versión direccionada al apoplasto (E2-Apo) de la glicoproteína E2 truncada, establecimos cultivos *in vitro* (callos y suspensiones celulares) que expresan una de las versiones que desarrollamos y comparamos los niveles de expresión en cada una de las plataformas vegetales establecidas (hojas agroinfiltradas, callos y suspensiones celulares).

Para concluir, avanzamos en los ensayos de inmunización estudiando la inducción de anticuerpos neutralizantes en ganado bovino al que se inoculó la vacuna experimental formulada y ensayada previamente en cobayos.

Materiales y Métodos

El plásmido pK-2S2-tE2-His-KDEL (pK:E2-ER) conteniendo la secuencia codificante para la proteína E2-ER se construyó como fue descrito previamente (Nelson y col., 2012). Para obtener la versión dirigida al apoplasto, la región 2S2-tE2-His (E2-Apo) se amplificó por PCR desde el plásmido pK:E2-ER. La amplificación se realizó con los primers FwE2 5'-aacatggcaacaagaagctcttctc-3' y RvE2 5'-ctcagatcatgatgatgatgatgggactcagcgaagtaac-3', conteniendo los sitios de restricción para *NcoI* y *XhoI* (subrayados). Los productos de PCR fueron clonados en el vector pGEM-T Easy (Promega) y secuenciados. Luego de la digestión con las enzimas *NcoI* y *XhoI*, el fragmento E2-Apo se subclonó en los mismos sitios del vector de entrada pENTR4 (Invitrogen). El plásmido resultante pENTR4:E2-Apo se recombinó con el vector binario de expresión en plantas pK7WG2 (pK) haciendo uso de la tecnología de clonado Gateway (Karimi y col., 2002). Finalmente, el plásmido pK:E2-Apo se introdujo en la cepa EHA101 de *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación.

Transformación y establecimiento de callos

Las líneas de *A. tumefaciens* transformadas con los plásmidos pK:E2-ER y pK:E2-Apo se crecieron a 28 °C en medio YEB. Las células se cosecharon por centrifugación y se resuspendieron en buffer MMA (sales MS, MES 10 mM, sacarosa 20 g/l, acetosiringona 200 µM, pH 5,6) hasta una DO₆₀₀ de 0,8 (Nelson y col., 2012; Laguia-Becher y col., 2019). Como explantos se emplearon discos de hojas maduras de plantas

de *Nicotiana tabacum* cv. Xhanti crecidas *in vitro*. Dichos explantos fueron sumergidos en una suspensión de *A. tumefaciens* recombinante, secados en papel de filtro y transferidos a medio sólido MS (Murashige y Skoog, 1962). Luego de 48 h los explantos fueron transferidos a medio MSRT sólido (Nigra y col., 1989) suplementado con: 2 mg/ml de ácido naftalenacético (ANA) y 0,2 mg/l de kinetina (Kin) para inducir la desdiferenciación y desarrollo de callos, 50 mg/l de kanamicina para seleccionar aquellas células portadoras del transgén, y 200 mg/l de cefotaxima para eliminar a *A. tumefaciens*. Luego de 4-6 semanas los callos resistentes a kanamicina fueron separados y transferidos a idéntico medio fresco sin cefotaxima. Los callos fueron subcultivados a medio fresco cada 3 semanas por 3 meses.

Análisis de las líneas celulares

El ADN genómico se extrajo de las líneas de callos resistentes a kanamicina como se describió previamente (Laguia-Becher y col., 2019). La presencia de los transgenes E2 en el genoma de los callos se verificó por PCR empleando los primers FwE2 y RvE2. Finalmente, la expresión de las proteínas E2-Apo y E2-ER en los callos que dieron positivo por PCR se analizó mediante ELISA sandwich y se realizó una semi-cuantificación por Western blot tal como se describe más abajo.

Suspensiones celulares

Para iniciar los cultivos en medio líquido se utilizó un inóculo de 5 % (p/v) de callos friables en su etapa de crecimiento exponencial, los cuales fueron transferidos a medio MSRT conteniendo como reguladores de crecimiento ANA (2 mg/l) y Kin (0,2 mg/l). Estas suspensiones fueron mantenidas en Erlenmeyers en un agitador orbital (100-120 rpm) y subcultivadas cada 3 semanas. Para realizar la curva de crecimiento se tomaron muestras por triplicado los días 1, 4, 7, 10, 14, 17 y 24. La biomasa obtenida en cada punto se evaluó por peso seco (PS). La expresión de E2-Apo y E2-ER se analizó por Western blot.

Extracción de proteínas

Las proteínas totales solubles (PTS) se extrajeron de los callos o de las suspensiones celulares (biomasa) utilizando 2 volúmenes (p/v) de buffer PELP frío (PBS 1X, leupeptina 10 mg/l, PMSF 5 mM, EDTA 50 mM, pH 7,0-7,2). Los extractos se centrifugaron a 17000 xg por 20 minutos a 4 °C. Los niveles de PTS en el sobrenadante se estimaron por el método de Bradford (1976).

ELISA sandwich

La detección de E2 en las líneas de callos transgénicos se realizó tal como describimos anteriormente (Nelson y col., 2012). Brevemente, se sensibilizaron placas de 96 pocillos con el anticuerpo monoclonal (mAb) anti-E2 2.9H y se adicionaron los

extractos de proteínas tanto de las líneas de callos transgénicos como salvaje (WT, *wild type*) por duplicado. La proteína recombinante E2 expresada en baculovirus (bE2) fue usada como control positivo (Marzocca y col., 2007). Luego, las placas se incubaron con suero VDVB positivo de vacas infectadas, y se usó IgG anti-bovino-HRP (*horseradish peroxidase*) como anticuerpo secundario. Los inmunocomplejos se revelaron con H₂O₂/ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylenbenzothioline-6-sulfonic acid)). Finalmente, la reacción se detuvo con SDS 5 % (p/v) y se midió la DO₄₀₅. Los resultados se expresaron como porcentaje de positividad (PP) relativa al control positivo usando la fórmula: $PP = [DO(\text{callos}) - DO(\text{WT})] / [DO(\text{bE2}) - DO(\text{WT})] \times 100$. Los valores de $PP \geq 14$ se consideraron positivos.

Western blot

Se realizó tal como se describió previamente (Marzocca y col., 2007). Brevemente, las muestras de proteínas fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) 10 % y transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Estas membranas fueron tratadas con el mAb anti-E2 2.9H y el anticuerpo IgG anti-ratón-HRP. Los complejos inmunoreactivos se detectaron por quimioluminiscencia (Bio-lumina, P-BL). La acumulación de las versiones E2-Apo y E2-ER de la proteína E2 se estimaron semi-cuantitativamente empleando concentraciones conocidas de bE2 como proteína estándar para confeccionar una curva de calibración y el software Gel-Pro analyzer (Media Cybernetics) (Del L Yácono y col., 2012; Albarracín y col., 2015; Laguia-Becher y col., 2019).

Formulación de la vacuna e inmunización del ganado

Se agroinfiltraron plantas de *N. tabacum* cv. Xhanti con *A. tumefaciens* conteniendo el plásmido pK:E2-ER tal como se describió previamente (Nelson y col., 2012). Las hojas agroinfiltradas se cosecharon al 4^{to} día y las PTS se extrajeron con buffer PELP. La concentración de E2-ER en los extractos se cuantificó por Western blot y ELISA como se describió más arriba. Ocho vacas Aberdeen Angus seronegativas para VDVB de 3 años de edad se inmunizaron subcutáneamente con 3 ml de extracto de hojas de tabaco conteniendo 60 µg de E2-ER combinado con el adyuvante acuoso Al(OH)₃ Hydrogel en una relación 90:10. A los 15 días se realizó una inmunización de refuerzo. Como control, los animales fueron inoculados ambas veces con 0,5 ml de extracto de hojas de tabaco salvajes más el adyuvante. Se tomaron muestras de sangre los días 30 y 45 para obtener suero. Durante todo el ensayo los animales fueron evaluados clínicamente.

Detección de anticuerpos por ELISA

Los ensayos se realizaron de acuerdo con Marzocca y col. (2007), con ligeras modificaciones. Brevemente, se sensibilizaron placas de 96 pocillos con el mAb anti-E2 2.9H y se incubó a 4 °C durante 16 h. La proteína bE2 se agregó de manera alternada en los pocillos de las placas y se incubó durante 1 h a 37 °C. Luego, se adicionaron

las muestras de suero de las vacas inmunizadas (tanto en los pocillos recubiertos como no con el antígeno bE2) en diluciones seriadas 1:4, desde 1:4 hasta 1:4096, y se incubó durante 1 h a 37 °C. Se incluyeron controles positivo y negativo en cada placa. Como anticuerpo secundario se utilizó IgG anti-bovino-HRP (30 min a 37 °C). Finalmente, la reacción se desarrolló con H₂O₂/ABTS, se detuvo con SDS 5 % (p/v) y se midió la DO₄₀₅. Los valores de DO de cada suero se determinaron restando a la DO de los pocillos recubiertos la DO de los pocillos no recubiertos con bE2. Cada suero se analizó por duplicado. Los títulos de los sueros se determinaron como la recíproca de la dilución en la que la DO correspondió al doble del valor de la DO del suero control negativo. Cuando el título fue mayor a 0,6 se consideró al suero positivo.

Análisis estadístico

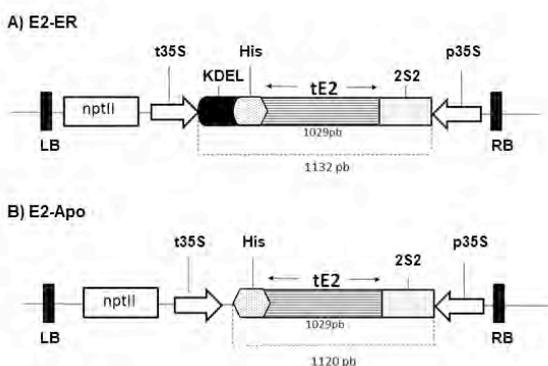
Los datos se analizaron con el software GraphPad Prism 5.0. Las diferencias entre los grupos se evaluaron por ANOVA seguida de la prueba Tukey. Se consideró significativo a valores de $p < 0,05$.

Resultados y Discusión

Construcción E2-Apo

El transgén E2-Apo contiene, además de la secuencia para la expresión de la glicoproteína E2 truncada (Nelson y col., 2012), la secuencia consenso Kozak para promover la iniciación de la traducción y la secuencia señal 2S2 de semilla de *Arabidopsis thaliana* para dirigir a la proteína hacia el apoplasto. La secuencia E2-Apo se clonó entre el promotor y el terminador 35S del virus del mosaico del coliflor (CaMV) en el vector de expresión binario pK. La figura 1 muestra una representación esquemática de la construcción.

Figura 1.- Representación esquemática de las regiones del ADN de transferencia (ADN-T) de *A. tumefaciens* usadas para expresar las proteínas E2-ER y E2-Apo en plantas de tabaco



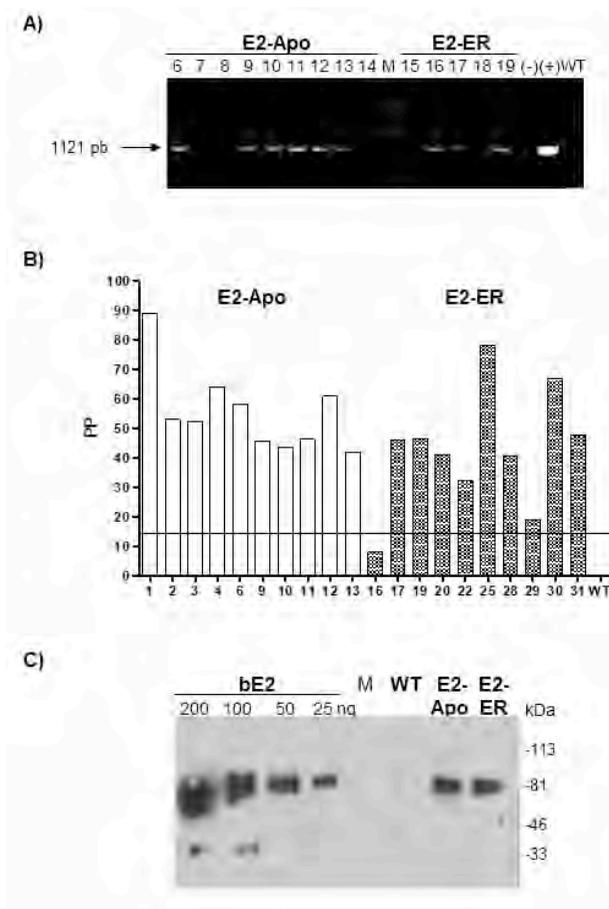
A: proteínas E2-ER; **B:** proteína E2-Apo. tE2, versión truncada de la glicoproteína E2 sin su dominio transmembrana; 2S2, péptido señal de la proteína de almacenamiento en semilla de *A. thaliana*; His, tag de 6 histidinas; KDEL, secuencia de retención en el retículo endoplasmático; RB y LB, bordes derecho e izquierdo del ADN-T; p35S y t35S, promotor y terminador del 35S del CaMV; nptII, neomicina fosfotransferasa II (gen de resistencia a kanamicina).

Análisis de las líneas de callos transgénicas

Los plásmidos pK:E2-Apo y pK:E2-ER (Fig. 1) se introdujeron separadamente en explantos de hojas de tabaco por transformación estable mediada por *A. tumefaciens*. Luego de 3 meses en cultivo en medio sólido conteniendo kanamicina para la selección de las líneas transformadas, se establecieron un total de 17 líneas de callos independientes para la construcción E2-Apo (1 a 17) y de 14 líneas de callos independientes para la construcción E2-ER (18 a 32). Los clones 1, 19, 25, 28 y 30 mostraron el mejor rendimiento en términos de morfología y crecimiento celular. Los clones resistentes a kanamicina fueron analizados por PCR para detectar la presencia del transgén E2. El fragmento esperado de 1121 pb fue amplificado en 10/17 clones E2-Apo y en 10/14 clones E2-ER (Fig. 2A). La expresión de las proteínas recombinantes E2-Apo y E2-ER en las líneas de callos transgénicos se evaluaron por ELISA sandwich (Fig. 2B). Sólo la línea 16 resultó negativa para E2, mientras que la línea 1 (E2-Apo) y la línea 25 (E2-ER) mostraron los niveles mayores de expresión. Estas dos líneas fueron caracterizadas por Western blot (Fig. 2C). Bajo condiciones no reductoras las proteínas E2-Apo y E2-ER se expresaron como dímeros de aproximadamente 80 kDa al igual que el control positivo bE2. Un patrón de expresión similar se observó luego de la expresión transitoria de la proteína E2-ER en hojas de tabaco (Nelson y col., 2012). El nivel de acumulación de E2 en los callos fue estimado de manera relativa comparando las bandas inmunoreactivas correspondientes a E2-Apo y E2-ER con la curva de calibración confeccionada a partir de cantidades conocidas de la proteína bE2. Los niveles de expresión de ambas líneas fueron similares y se estimaron en 3 µg/g PF, lo que corresponde a 1,15 % PTS (Fig. 2C). Estos valores resultaron menores a los obtenidos previamente mediante expresión transitoria (20 µg/g PF) (Nelson y col., 2012).

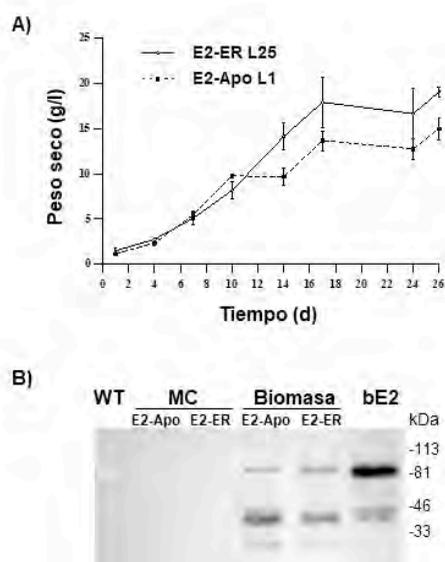
Análisis de las suspensiones celulares

Las líneas de callos transgénicos 1 y 4 (E2-Apo) y 19, 25 y 30 (E2-ER) fueron seleccionadas para iniciar cultivos en medio líquido en base a su crecimiento y los niveles de expresión de E2. Solamente los cultivos establecidos a partir de las líneas 1, 25 y 30 se adaptaron al cultivo en medio líquido en Erlenmeyers. De ellas, se seleccionaron las líneas 1 de E2-Apo y 25 de E2-ER para los ensayos subsiguientes. Se realizó una curva de crecimiento para cada una de dichas líneas, determinando el PS durante 24 días (Fig. 3A). Ambas líneas mostraron un comportamiento semejante caracterizado por la ausencia de una fase lag y un período de crecimiento continuo hasta el día 17 del cultivo. En el caso de la línea 1 de E2-Apo la velocidad específica de crecimiento (μ) fue de 0,24 d⁻¹ y el tiempo de duplicación (td) de 4,2 días. Por otra parte, para la línea 25 de E2-ER los valores fueron de 0,168 d⁻¹ y 6 días, respectivamente. Se analizó el contenido de proteínas en el medio de cultivo por Western blot durante la fase de crecimiento exponencial sin detectarse la presencia de la proteína E2. Cuando se concentraron las muestras, se observó una señal débil en la biomasa al día 14 (Fig. 3B). En este caso, las proteínas se corrieron en condiciones reductoras y se vio la presencia de E2 monomérica (40 kDa) y dimérica (80 kDa). El control positivo bE2 mostró el mismo patrón. La banda de menor peso molecular podría

Figura 2.- Expresión de las proteínas E2-Apo y E2-ER en callos

A: amplificación por PCR del genoma de los callos transgénicos E2-Apo (6 a 14) y E2-ER (15 a 19); (-), control negativo de PCR; (+), control positivo: plásmido pGEM:E2-Apo; WT, callo de *N. tabacum wild type*; M, marcador de peso molecular (1 Kb plus DNA). La flecha indica el tamaño esperado del producto de amplificación (1121 pb). **B:** ELISA sandwich para determinar la presencia de las proteínas E2-Apo (1 a 13) y E2-ER (16 a 31) en callos transgénicos. Los extractos de proteínas fueron diluidos 1:100. Cada barra corresponde al porcentaje de positividad relativa (PP) respecto al control positivo. La línea horizontal indica el punto de corte (*cut off* = 14). **C:** Análisis por Western blot de las líneas de callos 1 (E2-Apo) y 25 (E2-ER). Se separaron 3,5 μ g de proteínas por electroforesis en condiciones no reductoras en un SDS-PAGE 10 %. La acumulación de las proteínas E2-Apo y E2-ER se calculó por densitometría usando una curva de calibración confeccionada con bE2 (25, 50, 100, y 200 ng). Los resultados mostrados corresponden a uno de tres experimentos independientes. WT, callos *wild type* de *N. tabacum*; M, marcador de peso molecular.

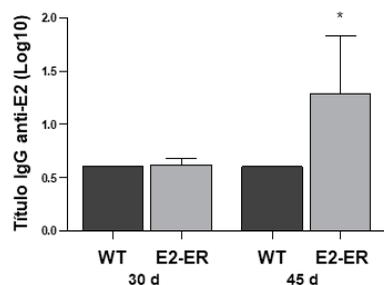
deberse a la degradación ocasionada por el proceso de concentración de la muestra. Se deben realizar más estudios tendientes a analizar el motivo por el que no se detectó la proteína E2-Apo en el medio de cultivo. Estos resultados muestran que los niveles de expresión de las proteínas E2-Apo y E2-ER en suspensiones celulares no son comparables al de los callos, esto podría deberse a la heterogeneidad de los mismos (James y Lee, 2006). Experimentos futuros serán dirigidos a aumentar los rendimientos de la proteína E2 en suspensiones celulares optimizando, por ejemplo, las condiciones de cultivo.

Figura 3.- Cultivos en suspensión de la línea 1 (E2-Apo) y la línea 25 (E2-ER)

A: Curva de crecimiento. La biomasa se determinó como peso seco (PS). Cada punto representa la media \pm DS de tres réplicas. El experimento se realizó por duplicado. **B:** Análisis por Western blot. Tanto el medio de cultivo (MC) como la proteína total soluble extraída de la biomasa se concentraron por ultrafiltración (MWCO: 15 kDa). Las proteínas (40 μ g) se sometieron a electroforesis en condiciones reductoras en un SDS-PAGE 10 %. Los resultados mostrados son representativos de dos experimentos independientes y corresponden al día 10 de iniciado el cultivo. bE2, 2 μ g.

Inmunización de ganado

Ya demostramos que el extracto de hojas de plantas de tabaco que expresan de manera transitoria la proteína E2-ER es capaz de inducir una respuesta inmune humoral específica en cobayos (Nelson y col., 2012). En este caso, analizamos si esta capacidad se mantenía al inocular dicho extracto en ganado bovino. Para iniciar el estudio se realizó una selección de aquellos individuos que no se hubieran expuesto anteriormente al VDVB mediante la detección por ELISA de anticuerpos anti-E2 de tipo IgG en sangre. Las vacas seronegativas fueron inmunizadas subcutáneamente con la vacuna experimental que contenía extracto de hojas expresando E2-ER y como adyuvante $Al(OH)_3$ Hydrogel. El plan de inmunización consistió en una administración inicial seguida de un refuerzo a los 15 días. Este adyuvante se eligió debido a que en combinación con extracto de hojas E2-ER dio la respuesta más robusta en cobayos (Nelson y col., 2012). La figura 4 muestra que el título promedio de anticuerpos anti-E2 es significativo en los animales vacunados luego de 45 días de iniciado el esquema de inmunización, correspondiente a un 85,7 % de seroconversión. Cabe desatacar la importancia de la segunda dosis de refuerzo en el incremento del título de anticuerpos. Por otro lado, los niveles de anticuerpos específicos neutralizantes en los animales control mostraron títulos por debajo de 0,6. No se observó una reacción local ni sistémica adversa en los animales. El título promedio en vacunos (1,38) fue mayor al obtenido previamente en cobayos

Figura 4.- Respuesta inmune humoral en ganado

Las vacas ($n = 8$) fueron inmunizadas a los días 0 y 15 con extracto de hojas de tabaco agroinfiltradas conteniendo 60 μg de E2-ER y el adyuvante $\text{Al}(\text{OH})_3$ Hydrogel. El grupo control recibió extracto de hojas de tabaco WT con $\text{Al}(\text{OH})_3$ Hydrogel. A los días 30 y 45 se midió en suero la respuesta específica de IgG anti-E2 por ELISA. Cada barra representa la media del título \pm 95 % intervalo de confianza. * $p < 0,05$.

(0,7), empleando la misma formulación de vacuna. La seroconversión también fue mayor en vacunos que en cobayos (85,7 % vs 75 %, respectivamente). Se considera que títulos de anticuerpos anti-E2 mayores a 1,2 son inmunoprotectores (Bolin y Ridpath, 1996; Fernández y col., 2009). En estudios futuros se optimizará la formulación de la vacuna (concentración de E2, número de dosis) y se analizará la respuesta inmune celular luego de una ronda de desafío con el virus.

Agradecimientos

Agradecemos al Sr. O. Periolo (CEVAN) por su apoyo técnico. MAA y MLB son miembros del Consejo Nacional de Investigación Científica y Técnica (CONICET). MVR y MB son becarios CONICET-Universidad Maimónides. Los autores desean agradecer la guía y apoyo que nos brindó el Dr. J. Latorre [†].

Referencias

Albarracín, R.M.; Becher, M.L.; Farran, I.; Syer, V.A.; Corigliano, M.G.; Yácono, M.L.; Pariani, S.; López, E.S.; Veramendi, J.; Clemente, M. (2015). "The fusion of *Toxoplasma gondii* SAG1 vaccine candidate to *Leishmania infantum* heat shock protein 83-kDa improves expression levels in tobacco chloroplasts". *Biotechnol. J.* 10 (5): 748-759.

Bradford, M.M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal. Biochem.* 72 (1-2): 248-254.

Bellido, D.; Baztarrica, J.; Rocha, L.; Pecora, A.; Acosta, M.; Escribano, J. M.; Parreño, V.; Wigdorovitz, A. (2021). "A novel MHC-II targeted BVDV subunit vaccine induces a neutralizing immunological response in guinea pigs and cattle". *Transbound. Emerg. Dis.* 68 (6): 3474-3481.

Bolin, S.R. (1993). "Immunogens of bovine viral diarrhoea virus". *Vet. Microbiol.* 37 (3-4): 263-271.

Bolin, S.R.; Ridpath, J.F. (1996). "Glycoprotein E2 of bovine viral diarrhoea virus expressed in insect cells provides calves limited protection from systemic infection and disease". *Arch. Virol.* 141 (8): 1463-1477.

Cai, D.; Song, Q.; Duan, C.; Wang, S.; Wang, J.; Zhu, Y. (2018). "Enhanced immune responses to E2 protein and DNA formulated with ISA 61 VG administered as a DNA prime-protein boost regimen against bovine viral diarrhoea virus". *Vaccine* 36 (37): 5591-5599.

Chung, Y. C.; Cheng, L. T.; Zhang, J. Y.; Wu, Y. J.; Liu, S. S.; Chu, C. Y. (2018). "Recombinant E2 protein enhances protective efficacy of inactivated bovine viral diarrhoea virus 2 vaccine in a goat model". *BMC Vet. Res.* 14 (1): 194.

Del L Yácono, M.; Farran, I.; Becher, M. L.; Sander, V.; Sánchez, V. R.; Martín, V.; Veramendi, J.; Clemente, M. (2012). "A chloroplast-derived *Toxoplasma gondii* GRA4 antigen used as an oral vaccine protects against toxoplasmosis in mice". *Plant Biotechnol. J.* 10 (9): 1136-1144.

Doran, P.M. (2006). "Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures". *Trends Biotechnol.* 24 (9): 426-432.

Fahad, S.; Khan, F. A.; Pandupuspitasari, N. S.; Ahmed, M. M.; Liao, Y. C.; Waheed, M. T.; Sameeullah, M.; Darkhshan, Hussain, S.; Saud, S.; Hassan, S.; Jan, A.; Jan, M. T.; Wu, C.; Chun, M. X.; Huang, J. (2015). "Recent developments in therapeutic protein expression technologies in plants". *Biotechnol. Lett.* 37 (2): 265-279.

Fernández, F.; Costantini, V.; Barranteguy, M.; Parreño, V.; Schiappacassi, G.; Maliandi, F.; Leunda, M.; Odeón, A. (2009). "Evaluation of experimental vaccines for bovine viral diarrhoea in bovines, ovines and guinea pigs". *Rev. Argent. Microbiol.* 41 (2): 86-91.

Ferraro, G.; Becher, M. L.; Angel, S. O.; Zelada, A.; Mentaberry, A. N.; Clemente, M. (2008). "Efficient expression of a *Toxoplasma gondii* dense granule Gra4 antigen in tobacco leaves". *Exp. Parasitol.* 120 (1): 118-122.

Fischer, R.; Schillberg, S.; Hellwig, S.; Twyman, R. M.; Drossard, J. (2012). "GMP issues for recombinant plant-derived pharmaceutical proteins". *Biotechnol. Adv.* 30 (2): 434-439.

Hossain, M. M.; Rowland, R. R. (2018). "Replicon Particle Expressing the E2 Glycoprotein of Bovine Viral Diarrhoea Virus Immunization and Evaluation of Antibody Response". *Viral Immunol.* 31 (1): 55-61.

James, E.; Lee, J. M. (2006). "Loss and recovery of protein productivity in genetically modified plant cell lines". *Plant Cell Rep.* 25 (7): 723-727.

Jia, S.; Huang, X.; Li, H.; Zheng, D.; Wang, L.; Qiao, X.; Jiang, Y.; Cui, W.; Tang, L.; Li, Y.; Xu, Y. (2020). "Immunogenicity evaluation of recombinant *Lactobacillus casei* W56 expressing bovine viral diarrhoea virus E2 protein in conjunction with cholera toxin B subunit as an adjuvant". *Microb. Cell Factories* 19 (1): 186.

Karimi, M.; Inzé, D.; Depicker, A. (2002). "GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation". *Trends Plant Sci.* 7 (5): 193-195.

Laguia-Becher, M.; Martín, V.; Kraemer, M.; Corigliano, M.; Yácono, M. L.; Goldman, A.; Clemente, M. (2010). "Effect of codon optimization and subcellular targeting on *Toxoplasma gondii* antigen SAG1 expression in tobacco leaves to use in subcutaneous and oral immunization in mice". *BMC Biotechnol.* 10: 52.

- Laguia-Becher, M.; Zaldúa, Z.; Xu, W.; Marconi, P.L.; Velandier, W.; Alvarez, M.A. (2019). "Co-expressing Turnip Crinkle Virus-coat protein with the serine protease-thrombin precursor (pFIIa) in *Nicotiana benthamiana* Domin". *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 55 (1): 88-98.
- López, J.; Lencina, F.; Petrucci, S.; Marconi, P.; Alvarez, M.A. (2010). "Influence of the KDEL signal, DMSO and mannitol on the production of the recombinant antibody 14D9 by long-term *Nicotiana tabacum* cell suspension culture". *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 103: 307-314.
- Martínez, C.; Petrucci, S.; Giulietti, A.; Alvarez, M.A. (2005). "Expression of the antibody 14D9 in *Nicotiana tabacum* hairy roots". *Electron. J. Biotechnol.* 8 (2): 170-176.
- Marzocca, M. P.; Seki, C.; Giambiagi, S. M.; Robiolo, B.; Schauer, R.; Dus Santos, M. J.; Scodeller, E. A.; La Torre, J. L.; Wigdorovitz, A.; Grigera, P. R. (2007). "Truncated E2 of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) expressed in *Drosophila melanogaster* cells: a candidate antigen for a BVDV ELISA". *J. Virol. Methods* 144 (1-2): 49-56.
- Merlin, M.; Gecchele, E.; Capaldi, S.; Pezzotti, M.; Avesani, L. (2014). "Comparative evaluation of recombinant protein production in different biofactories: the green perspective". *Biomed Res. Int.* 2014: 136419.
- Moustafa, K.; Makhzoum, A.; Trémouillaux-Guiller, J. (2016). "Molecular farming on rescue of pharma industry for next generations". *Crit. Rev. Biotechnol.* 36 (5): 840-850.
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962). "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures". *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nelson, G.; Marconi, P.; Periolo, O.; La Torre, J.; Alvarez, M. A. (2012). "Immunocompetent truncated E2 glycoprotein of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) expressed in *Nicotiana tabacum* plants: a candidate antigen for new generation of veterinary vaccines". *Vaccine* 30 (30): 4499-4504.
- Nigra, H. M.; Alvarez, M. A.; Giulietti, A. M. (1989). "The influence of auxins, light and cell differentiation on solasodine production by *Solanum eleagnifolium* Cav. Calli". *Plant Cell Rep.* 8 (4): 230-233.
- Pérez Aguirreburualde, M. S.; Gómez, M. C.; Ostachuk, A.; Wolman, F.; Albanesi, G.; Pecora, A.; Odeon, A.; Ardila, F.; Escibano, J. M.; Dus Santos, M. J.; Wigdorovitz, A. (2013). "Efficacy of a BVDV subunit vaccine produced in alfalfa transgenic plants". *Vet. Immunol. Immunopathol.* 151 (3-4): 315-324.
- Richter, V.; Lebl, K.; Baumgartner, W.; Obritzhauser, W.; Käsbohrer, A.; Pinior, B. (2017). "A systematic worldwide review of the direct monetary losses in cattle due to bovine viral diarrhoea virus infection". *Vet. J.* 220: 80-87.
- Ridpath, J.F. (2013). "Immunology of BVDV vaccines". *Biologicals* 41 (1): 14-19.
- Sabalza, M.; Christou, P.; Capell, T. (2014). "Recombinant plant-derived pharmaceutical proteins: current technical and economic bottlenecks". *Biotechnol. Lett.* 36 (12): 2367-2379.
- Thomas, C.; Young, N. J.; Heaney, J.; Collins, M. E.; Brownlie, J. (2009). "Evaluation of efficacy of mammalian and baculovirus expressed E2 subunit vaccine candidates to bovine viral diarrhoea virus". *Vaccine* 27 (17): 2387-2393.