

# **Diseño y evaluación de un sistema de administración de vacunas orales a ADN utilizando bacterias ácido lácticas como vectores vivos”**

Paula Micaela Wagner

Laboratorio de Inmunología Básica – Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

Ciencias Biológicas - Biotecnología

Grupo: Y (Becado de Fundación Nuevo Banco de Santa Fe)

## **INTRODUCCION**

La cuenca lechera de Argentina está constituida por alrededor de 10 mil establecimientos, que totalizan una producción cercana a los 11.600 millones de litros de leche anuales (Ferreyra A., 2013). En la provincia de Santa Fe, la actividad láctea es significativamente importante, siendo la principal exportadora de productos lácteos. La intensificación en la producción lechera en los últimos años ha sido acompañada con un evidente avance en el control de las enfermedades infecciosas y parasitarias, mediante el uso de programas de vacunación y desparasitación estratégicos (Calvinho LF., 2005). Sin embargo, la mastitis bovina continúa siendo una realidad en los establecimientos lecheros.

La mastitis bovina es considerada una enfermedad multifactorial debido a que su origen envuelve una compleja relación entre el agente microbiano, el hospedero y el medio ambiente, con interacción permanente entre estos tres elementos y un papel preponderante del hombre. *Staphylococcus aureus* es el agente etiológico de mayor prevalencia tanto en Argentina (Calvinho LF., 2005) como en otros países de gran desarrollo lechero (Zecconi A., 2003). Si bien existen métodos de control basados en higiene y terapia antibiótica, las particulares características del microorganismo hacen que éstos no sean totalmente efectivos (Booth JM., 1975).

Teniendo en cuenta que la mejor vacuna es aquella capaz de adaptarse a las necesidades de los productores, tanto respecto a la protección frente una infección, como la de alcanzar la mejor relación costo/beneficio, se presenta como alternativa el uso de bacterias lácticas no invasivas.

Las mismas han generado interés en su uso como vehículos para vacunas tradicionales y para *delivery* de ADN (Wells y Mercenier, 2008) por su status GRAS (Generally Recognized As Safe). Tal estrategia posibilita la administración oral, estimulación del sistema de mucosas, no requiere la preparación y purificación del ADN y cuentan con la presencia de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) en el vector bacteriano que actúan como inmunoestimulantes.

Por tales motivos anteriormente mencionados, proponemos el uso de bacterias lácticas como vehículos para el *delivery* de un plásmido que contenga la secuencia codificante de la proteína  $\beta$ -toxina de *Staphylococcus aureus* y posterior evaluación de la respuesta inmune desencadenada en ratones inmunizados por vía oral. La metodología propuesta podría aplicarse a la formulación de vacunas multicomponentes destinadas a la prevención y control de la mastitis bovina y que, a su vez, sean de gran alcance, fáciles de almacenar y administrar y no agresivas para el receptor.

## **OBJETIVOS**

### **Principal:**

- Obtener bacterias lácticas transformadas con un plásmido de expresión eucariota conteniendo la secuencia codificante para la proteína  $\beta$ -toxina de *Staphylococcus aureus* para ser usadas como vehículo en la formulación de vacunas orales a ADN.

### **Particulares:**

- Subclonar la secuencia codificante de la proteína  $\beta$ -toxina de *Staphylococcus aureus* en un plásmido de expresión eucariota capaz de replicarse en bacterias lácticas.
- Diseñar un plan de inmunización oral con las bacterias lácticas transformadas.
- Inmunizar ratones de la cepa BALB/c siguiendo el plan de inmunización diseñado.
- Evaluar la respuesta inmune humoral desencadenada analizando la presencia de anticuerpos específicos tanto en suero como en mucosa intestinal de los animales inmunizados.

## **METODOLOGÍA**

### **Obtención de un plásmido de expresión eucariota conteniendo el ADN que codifica para la proteína $\beta$ -toxina de *Staphylococcus aureus*.**

El plásmido a utilizarse en el desarrollo de este proyecto es el pKLV1, gentilmente cedido por el Dr. Tao (2011). Este vector posee un origen de replicación en bacterias Gram-positivas y el promotor eucariota del citomegalovirus.

El fragmento de ADN que codifica para la proteína  $\beta$ -toxina se encuentra clonado en el plásmido pET32a- $\beta$ -toxina, el cual fue obtenido por digestión con enzimas de restricción e inserto en pLKV1, generando la construcción pLKV1- $\beta$ -toxina. Con el objetivo de multiplicar el ADN plasmídico, se transformaron células de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  con dicha construcción para luego recuperar el plásmido mediante el procedimiento de lisis alcalina (Sambrook J., 2001).

### **Obtención de bacterias lácticas transformadas.**

Las bacterias lácticas (LAB) fueron transformadas por electroporación aplicando el protocolo descrito por Dornan y Collins (1990). Las cepas *Lactococcus lactis* Mo12 y *Lactobacillus paracasei* JP1 fueron gentilmente cedidas por el cepario del Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, UNL-CONICET). El clon de bacterias seleccionado para el protocolo de inmunización fue cultivado durante 16 horas en medio MRS (*Lactococcus*) o M17 (*Lactobacillus*), según corresponda. Posteriormente, las bacterias fueron centrifugadas, lavadas 3 veces con PBS estéril y resuspendidas en buffer bicarbonato a una concentración de 10<sup>9</sup> células/ml.

### **Administración del inóculo a ratones.**

Se emplearon ratones hembras de la cepa BALB/c mantenidos en el bioterio del Laboratorio de Inmunología Básica, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas y suministro de agua y alimento *ad libitum*.

Los animales recibieron las bacterias transformadas con pLKV1- $\beta$ -toxina (n=6) o con pLKV1 (control sin inserto, n=5) por vía oral en 50 $\mu$ l de buffer bicarbonato. Los animales no recibieron alimentos 3 horas previas a la administración ni 4 horas después.

### **Evaluación de la respuesta inmune.**

Los animales que recibieron los diferentes inóculos de bacterias transformadas, fueron sacrificados 10 días después de la última administración. Posteriormente, se

evaluaron los niveles de IgG sérica anti- $\beta$ -toxina inducidos por el inóculo mediante un ensayo de ELISA indirecto utilizando la proteína recombinante obtenida en *E.coli*, y los niveles de IgA secretoria específica en muestras de fluido intestinal, según el protocolo descrito por Chatel y colaboradores (2001).

## RESULTADOS

### Construcción del plásmido pLKV1- $\beta$ -toxina.

El ADN plasmídico recuperado de bacterias *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  transformadas fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa, digestión con enzimas de restricción y secuenciación del inserto clonado. Los resultados obtenidos permitieron evidenciar tanto la presencia, integridad y correcta secuencia nucleotídica del inserto  $\beta$ -toxina en el vector pLKV1.

### Obtención y evaluación de bacterias lácticas transformadas.

A fin de validar el uso de bacterias lácticas como vehículos para *delivery* de vacunas orales a ADN, cepas de *Lactobacillus paracasei* JP1 y *Lactococcus lactis* Mo12 fueron transformadas con el plásmido conteniendo la secuencia codificante de la proteína  $\beta$ -toxina de *Staphylococcus aureus*. Se obtuvieron eficiencias de transformación en el orden de  $10^3$  y  $10^2$  UFC/ $\mu$ g de ADN plasmídico para la cepa *Lactobacillus paracasei* JP1 y *Lactococcus lactis* Mo12, respectivamente.

### Administración de bacterias lácticas transformadas a ratones y evaluación de respuesta inmune.

Los niveles de anticuerpos IgA anti- $\beta$ -toxina en fluido intestinal de animales inmunizados fueron evaluados mediante un ensayo de ELISA indirecto. Tales resultados evidenciaron una diferencia significativa entre el grupo de ratones inmunizados con *Lactococcus lactis* Mo12 transformadas con el plásmido de interés respecto al grupo control inmunizados con el plásmido pLKV1 sin inserto ( $p=0,032$ ; Prueba de Mann Whitney). Por otro lado, no se observan diferencias significativas entre el grupo tratado y el grupo control de animales inmunizados con *Lactobacillus paracasei* JP1 ( $p=1,00$ ; Prueba de Mann Whitney). Así mismo, se observa un incremento de la respuesta humoral específica para  $\beta$ -toxina en fluido intestinal de ratones inmunizados con *Lactococcus lactis* Mo12 respecto a los inmunizados con *Lactobacillus paracasei* JP1 ( $p=0,052$ ; Prueba de Mann Whitney).

Posteriormente, se evaluaron los niveles de anticuerpos IgG anti- $\beta$ -toxina en suero mediante un ensayo de ELISA. El mismo fue realizado repetidas veces empleando distintas diluciones y/o suero puro de los ratones inmunizados. Sin embargo no fue posible detectar respuesta inmune humoral IgG anti- $\beta$ -toxina en el suero de los animales inmunizados.

## CONCLUSIONES

En base a los resultados presentados en el presente proyecto, se considera haber realizado un exitoso clonado obteniéndose el plásmido pLKV1 conteniendo el ADN codificante para la proteína  $\beta$ -toxina de *Staphylococcus aureus*. Los ensayos con enzimas de restricción, electroforesis en gel de agarosa y secuenciación del inserto clonado

permitieron corroborar la presencia, integridad y correcta secuencia del fragmento  $\beta$ -toxina inserto en el sitio de múltiple clonado del vector pLKV1.

Por otro lado, los parámetros de electroporación empleados para la transformación de bacterias lácticas permitieron obtener eficiencias en el orden de  $10^3$  y  $10^2$  UFC/ $\mu$ g de ADN plasmídico para la cepa *Lactobacillus paracasei* JP1 y *Lactococcus lactis* Mo12, respectivamente.

Por último, los resultados informados evidenciaron respuesta inmune humoral IgA específica en fluido intestinal en aquellos animales inmunizados con la cepa *Lactococcus lactis* Mo12 transformados con el plásmido pLKV1- $\beta$ -toxina. Por otro lado, no fue posible detectar respuesta inmune humoral IgG anti- $\beta$ -toxina en el suero de ninguno de los grupos de animales inmunizados con las bacterias transformadas. Cabe destacar que ambos grupos controles de ratones inmunizados con el plásmido sin inserto no generaron respuesta humoral ni en fluido intestinal ni en suero.

Considerando estos resultados, sugerimos que la vía de administración oral podría ser capaz de generar respuesta humoral en mucosas pero no logra inducir una potente respuesta humoral sistémica. Es por ello que proponemos el diseño de una vacuna que involucre la administración oral en conjunto con otras vías. Se sugiere la posibilidad de inmunizar vía intramuscular o subcutánea la proteína recombinante  $\beta$ -toxina en combinación con la administración oral de bacterias lácticas *L. lactis* Mo12 transformadas con el plásmido de interés. De esta manera sería posible obtener una respuesta inmune sistémica y en mucosas mediante el empleo de vacuna a subunidad y vacuna génica. A su vez, consideramos interesante estudiar el perfil de citoquinas inducido como así también las poblaciones celulares que puedan contribuir a la eficiencia de la vacuna.

## BIBLIOGRAFIA

**Booth JM.**, 1975. Mastitis control in the field: some results of two large field trials. In: Proc. Natl. Mastitis Council, Arlington, VA. pp. 19-31.

**Calvinho LF** et al., 2005. Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en argentina en los últimos 25 años. Anuario 2005. Revista FAVE. Sección Ciencias Veterinarias.

**Chatel JM** et al., 2001. Induction of mucosal immune response after intranasal or oral inoculation of mice with *Lactococcus lactis* producing bovine beta-lactoglobulin. Clin Diagn Lab Immunol. 8:545-551.

**Dornan S** et al., 1990. High efficiency electroporation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LM0230 with plasmid pGB301. Lett Appl Microbiol. 11:62-64.

**Ferreira A.**, 2013. Universidad Nacional de Río Cuarto. Facultad de Ciencia Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Últimos ensayos de una vacuna contra la mastitis bovina.

Disponible en:

[http://infouniversidades.siu.edu.ar/noticia.php?titulo=%DAltimos\\_ensayos\\_de\\_una\\_vacuna\\_contra\\_la\\_mastitis\\_bovina&id=1721#.U0bje1WSyvg](http://infouniversidades.siu.edu.ar/noticia.php?titulo=%DAltimos_ensayos_de_una_vacuna_contra_la_mastitis_bovina&id=1721#.U0bje1WSyvg)

**Sambrook J** et al., 2001. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Third edn. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Tao L** et al., 2011. A novel plasmid for delivering genes into mammalian cells with noninvasive food and commensal lactic acid bacteria. Plasmid 65:8-14.

**Wells JM** et al., 2008. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. Nat Rev Microbiol. Vol 6, p.349-362.

**Zecconi A** et al., 2003. Epidemiologic study of intramammary infections with *Staphylococcus aureus* during the program control in nine commercial dairy herds. J. Am. Vet. Med. Assoc. 223(5), 684-688.