

Artículo original

Expresión heteróloga y purificación de la proteína antigénica de superficie CpSUB2 de *Cryptosporidium parvum* para formulaciones vacunales

Heterologous expression and purification of the antigenic surface protein CpSUB2 from Cryptosporidium parvum for vaccine formulations

Yamila Asrin¹, Mónica Florin-Christensen^{1,2,3}, Leonhard Schnittger^{1,2,3,*} y Sabrina Ganzinelli^{2,3}

¹ Escuela Superior de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Morón; ² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET); ³ Instituto de Patobiología Veterinaria, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA-CONICET)

Manuscrito recibido: 10 de febrero de 2025; aceptado para publicación: 08 de abril de 2025

Autor de Contacto: Dr. Leonhard Schnittger. Escuela Superior de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Morón. Machado 854, Morón, Buenos Aires, Argentina. E-mail: schnittger.leonhard@inta.gob.ar

Resumen

Cryptosporidium parvum es el principal agente etiológico de la diarrea neonatal de terneros en Argentina, condición que compromete el rendimiento económico-productivo de los bovinos en las ganaderías lecheras. Es, asimismo, de importancia para la salud pública por ser una especie zoonótica. Por ello, es necesario el desarrollo de métodos de inmunización efectivos contra este parásito. Al igual que otros protozoos del phylum Apicomplexa, *C. parvum* expone en la superficie de la membrana celular antígenos anclados por puentes de glicosilfosfatidilinositol (GPI), que constituyen candidatos vacunales prometedores. En trabajos previos se ha identificado el repertorio de proteínas ancladas a GPI en este parásito. Entre ellas, se encuentra CpSUB2, una proteína inmunodominante, que genera una respuesta humoral en los bovinos infectados por *C. parvum*. El objetivo de este trabajo fue la expresión y purificación de un fragmento del candidato vacunal CpSUB2 que podría ser utilizado en formulaciones vacunales. En primer lugar, mediante el análisis *in silico* se seleccionó un fragmento hidrofílico de 392 aminoácidos de esta proteína para su expresión en un sistema procariota. Luego de la clonación del correspondiente segmento de ADN en un vector adecuado y la transformación de bacterias *Escherichia coli* competentes, se seleccionó un clon recombinante y se determinaron las condiciones óptimas de expresión y purificación de la proteína. Siguiendo el protocolo optimizado, se produjeron 5,8 mg de proteína recombinante a partir de 400 ml de cultivo bacteriano. En futuros estudios, el candidato vacunal expresado será incluido en ensayos vacunales para testear su capacidad de proteger terneros contra la criptosporidiosis bovina.

Palabras clave: *Cryptosporidium parvum*; diarrea neonatal de terneros; vacunas; proteínas ancladas por glicosilfosfatidilinositol; proteínas recombinantes.

Abstract

Cryptosporidium parvum is the main etiological agent of neonatal diarrhea in calves in Argentina, a condition that compromises the economic and productive performance of cattle in dairy farms. It is also important for public health because it is a zoonotic species. Therefore, the development of an effective vaccine against this parasite is necessary. Like other protozoa of the phylum Apicomplexa, *C. parvum* displays glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored antigens on the cell membrane surface, which are promising vaccine candidates. Previous work has identified the repertoire of GPI-anchored proteins in this parasite. Among them is CpSUB2, an immunodominant protein, i.e. that generates a humoral response in *C. parvum*-infected cattle. The aim of this work was the expression and purification of a fragment of the vaccine candidate CpSUB2 so that it can be further used in vaccine formulations. First, a 392 amino acid hydrophilic fragment of this protein was selected by in silico analysis for expression in a prokaryotic system. After cloning the corresponding DNA segment into a suitable vector and transformation of competent *Escherichia coli* bacteria, a recombinant clone was selected and conditions for protein expression and purification were optimized. On a laboratory scale, 5.8 mg of recombinant protein were produced from 400 ml of bacterial culture. In future studies, the recombinantly expressed antigen will be tested in vaccine trials to test its capacity to protect calves against bovine cryptosporidiosis.

Keywords: *Cryptosporidium parvum*; calf neonatal diarrhea; vaccines; glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins; recombinant proteins.

DOI: <http://doi.org/10.34073/423>

1. Introducción

Los protozoos del género *Cryptosporidium* son parásitos entéricos ubicuos de vertebrados, que pertenecen al phylum Apicomplexa. En la Argentina, *Cryptosporidium parvum* es el principal agente causal de la diarrea neonatal de terneros (DNT) con una prevalencia de entre el 25 y el 42% en terneros jóvenes de menos de 20 días de edad en cuencas lecheras (Garro et al., 2021; De Alba et al., 2021, 2023). El ciclo de vida del parásito implica la formación de ooquistes resistentes, de larga duración y altamente infecciosos, que se excretan con las heces del hospedador al medio ambiente. Estos contaminan el agua y/o alimentos de consumo humano ocasionando criptosporidiosis en poblaciones vulnerables, como ser individuos inmunodeprimidos (pacientes con cáncer, SIDA, receptores de trasplantes, entre otros), niños y ancianos (Dupont et al., 1995; Boulter-Bitzer et al., 2007; Dabas et al., 2017). *Cryptosporidium parvum* no sólo representa una amenaza para la salud pública (Pumipuntu & Piratae, 2018), sino que también es causal de pérdidas económicas considerables en la actividad ganadera, debido

a que las infecciones de bovinos con este patógeno se asocian comúnmente con una disminución en la probabilidad de preñez y parto, menores tasas de crecimiento, menor producción de leche en la primera lactancia e incluso, muerte por deshidratación severa (Santín, 2013; Abuelo et al., 2021).

A pesar de su gran impacto, aún no existen tratamientos eficaces para prevenir la criptosporidiosis bovina. El único fármaco actualmente aprobado en Argentina es el lactato de halofuginona, de controvertida eficacia (Silverlås et al., 2009). Por otra parte, terneros recién nacidos inoculados con ooquistes de *C. parvum* irradiados con rayos gamma mostraron protección frente a un desafío a los 21 días de edad (Jenkins et al., 2004). En la búsqueda de candidatos vacunales para el desarrollo de una herramienta para prevenir la criptosporidiosis, pocos antígenos han sido caracterizados y ensayados. Las proteínas de superficie de la membrana ancladas con un puente glicosilfosfatidilinositol (GPI), están involucradas en la invasión de las células del hospedador y constituyen candidatos vacunales prometedores (Plassmeyer et al., 2009; Rodríguez et al., 2014; Florin-Christensen et al.,

2014; Tomazic et al., 2018). En trabajos previos de nuestro grupo de investigación, hemos descripto mediante análisis bioinformático, el repertorio de las proteínas de superficie de *C. parvum* ancladas por puentes GPI y comprobamos que tres de estas, GP60, CpH1 y CpSUB2, son inmunodominantes en terneros naturalmente infectados con el parásito (Tomazic et al., 2018). Más aún, se ha informado que GP60 neutraliza la infección parasitaria de la célula hospedadora *in vitro* (O'Connor et al., 2007). Por su parte, la proteína CpSUB2 es una serina-proteinasa que pertenece a la familia de las subtilisinas (SUB). Se ha demostrado en otros protozoos parásitos que este tipo de proteínas desempeñan un papel clave en la invasión y egreso de la célula hospedadora, como es el caso de PfSUB2 y PfSUB1 de *Plasmodium falciparum*, uno de los agentes causales de la malaria (Harris et al., 2005; Yeoh et al., 2007; Florin-Christensen et al. 2023; Poklepovich et al. 2023).

Recientemente, se ha reportado una estrategia de vacunación pasiva de terneros por inmunización de vacas preñadas con un fragmento de GP60 recombinante, lo cual lleva a la producción de calostro hiperinmune que protege a los terneros de la diarrea severa causada por la infección con *C. parvum*. Esta vacuna, sin embargo, no está disponible en Argentina (Timmermans et al., 2024). Una estrategia alternativa de inmunización de terneros consiste en la administración junto con el alimento de inmunoglobulinas Y (IgY), obtenidas a partir de yema de huevos de gallinas que han sido inoculadas con un antígeno seleccionado. Esto representa un método más rentable y relativamente simple, con la ventaja de que puede utilizarse tanto para prevenir como para tratar enfermedades (Mine & Kovacs-Nolan, 2002; Florin-Christensen et al., 2021). Utilizando esta estrategia, Vega y colaboradores (2020) desarrollaron un producto basado en anticuerpos IgY para proteger a los terneros contra otros agentes etiológicos de la DNT, como ser rotavirus del grupo A, coronavirus, *Escherichia coli* enterotoxigénica y *Salmonella* spp. Más recientemente, esta metodología se ha utilizado para producir IgY contra la proteína p23 de *C. parvum* que, al ser administrada a terneros, resultó en una reducción significativa de la duración de la excreción de ooquistes y de la diarrea tras un desafío con el parásito (Mira et al., 2025). El objetivo del presente trabajo fue la expresión heteróloga de un fragmento de CpSUB2 de *C. parvum* y la producción

de una cantidad suficiente de la proteína purificada que permita la generación de IgY específicas en gallinas.

2. Material y Métodos

2.1. Análisis *in silico* de CpSUB2

Se analizó *in silico* la secuencia aminoacídica de la proteína CpSUB2 de *C. parvum* obtenida del sitio web de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; número de acceso: XP_627713.1). Primero, se localizó el dominio de subtilisina característico de la proteína utilizando el programa InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>). Luego, utilizando los algoritmos de los sitios de internet PredGPI (<https://busca.bio-comp.unibo.it/predgpi/>) y NetGPI-1.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetGPI-1.1/>) se determinó la posible ubicación del sitio omega, es decir, la ubicación del aminoácido al que se une vía etanolamina a GPI y forma parte de la secuencia de la señal de anclaje. Por otro lado, se predijo el sitio de clivaje del péptido señal utilizando SignalP-5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>). Seguidamente, se realizó una predicción *in silico* de epítotos B. La proteína madura carece tanto del fragmento ubicado río abajo del sitio omega (C-terminal), como de péptido señal (N-terminal), por lo que estas regiones fueron excluidas de este análisis. La exploración de las secuencias se realizó con los programas de libre acceso disponibles en internet (Predicted antigenic peptides: <http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl> y SVMtrip: <http://sysbio.unl.edu/SVMTriP/prediction.php>). En base a la predicción bioinformática y los resultados previos sobre inmunorreactividad, se seleccionó el fragmento a expresar de forma recombinante (Tomazic et al., 2018).

2.2. PCR, clonación en vector de expresión y análisis por secuenciación

Se amplificó por PCR la secuencia nucleotídica codificante del fragmento seleccionado de la proteína CpSUB2 (XM_627713.1; 1183 bp). La mezcla de reacción de PCR se preparó en un volumen final de 25 μ l conteniendo: 0,5 μ M de cada primer (FW 5' CACCATGAATTCTGCCGGAACAA-CATTG' 3; RV 5' ACCTGTCTCGTTCCTAGAGC' 3), 0,2 mM de cada dNTP (Qiagen), 0,04 U/ μ l de polimerasa Pfu (Inbiohigh-

way) y su buffer correspondiente. Como templado se emplearon 1,5 μ l de ADN genómico extraído de ooquistes purificados a partir de heces de terneros de la provincia de Buenos Aires experimentalmente infectados con *C. parvum* (provisto por el Laboratorio de Protozoos Patógenos, INTA) y, como control negativo, se utilizó agua destilada. La reacción de amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min, 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, hibridación a 56 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 2 min, y una extensión final a 72 °C durante 7 min. Los productos de amplificación, junto con un marcador de tamaño de ADN (100 pb Ladder, Productos Bio Lógicos), se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (TransGen) en presencia de EcoGel (Inbiohighway).

El producto de amplificación se clonó en el vector de expresión pET101/D-TOPO (Invitrogen) siguiendo la recomendación del fabricante. Se transformaron las bacterias *E. coli* One Shot TOP10 (Invitrogen) competentes con el vector de expresión recombinante, y se las cultivó durante 1 hora a 37 °C en caldo LB (Luria-Bertani). Luego fueron sembradas en placas de LB agar con ampicilina (100 μ g/ml) e incubadas toda la noche a 37 °C. Los clones positivos fueron identificados por PCR, utilizando como control positivo el ADN genómico analizado previamente. Se purificó el plásmido recombinante a partir de un clon seleccionado, utilizando para ello un kit comercial (PuroPlásmido, Productos Bio-Lógicos), y luego, se determinó su concentración y pureza utilizando un espectrofotómetro (Nanodrop, Thermo Scientific). El plásmido recombinante fue secuenciado en ambas direcciones (Macrogen, Corea del Sur) y las secuencias obtenidas fueron empalmadas utilizando el programa BioEdit (Hall, 1999). Se verificó la identidad del inserto y su ubicación en el marco de lectura codificante de la etiqueta de histidinas C-terminal utilizando

BLASTn

(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) y ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>), respectivamente. Además, se calculó el peso molecular de la proteína recombinante CpSUB2 (rCpSUB2) codificada, utilizando el sitio web Protein Molecular Weight (https://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html).

2.3. Expresión y purificación de rCpSUB2

Luego de la transformación con el vector recombinante de la cepa *E. coli* BL21 Star (DE3) (Invitrogen), se determinaron las condiciones óptimas de expresión de rCpSUB2 en cultivos de 5 ml (caldo LB con ampicilina 100 μ g/ml). Primero se analizaron distintos tiempos de inducción (1, 2, 3, 4 y 20 h) con un valor fijo de IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido de 1 mM) y una temperatura de incubación de 37°C. Una vez hallado el tiempo óptimo de inducción, se ensayaron diferentes concentraciones de inductor (0,5, 0,75 y 1 mM IPTG) y dos diferentes temperaturas de incubación (25 y 37 °C). Las células se cosecharon por centrifugación a 12.000 g durante 30 s y los pellets se resuspendieron en buffer de lisis (400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10% v/v glicerol, 0,5% v/v Triton X 100, 10 mM imidazol, pH 7,8) conteniendo lisozima (1 mg/ml, Sigma) y PMSF (1 mM, Calbiochem). Luego las muestras fueron sonicadas y centrifugadas (12.000 g, 10 min, 4 °C). Las proteínas insolubles (pellet) y solubles (sobrenadante), se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), junto con un marcador de peso molecular (Blue Plus, TransGen). Las proteínas se visualizaron con azul de Coomassie (Sigma), o bien se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa para su inmunodetección (Western blot) con un anticuerpo primario anti-histidina (6xHis, BD Pharmingen) y secundario anti-IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina (Sigma) que permite una detección colorimétrica utilizando el sustrato NBT/BCIP (ThermoFisher). Se utilizó β -galactosidasa recombinante con la etiqueta de 6xHis como control positivo y BSA 0,5% como control negativo.

La producción de rCpSUB2 se indujo bajo las condiciones óptimas de expresión en un volumen de cultivo mayor (400 ml) y la proteína fue purificada utilizando cromatografía de afinidad al níquel (HIS-Select, Sigma) bajo condiciones desnaturalizantes. Brevemente, las células se recolectaron mediante centrifugación y se solubilizaron en 8 ml de buffer de unión (8 M urea, 20 mM fosfato de sodio, 500 mM NaCl, pH 7,8). El lisado bacteriano fue sonicado (6 pulsos de sonicación de 20 s cada uno) y centrifugado (10.000 g, 20 min). El sobrenadante (extracto crudo) se filtró a través de una membrana de 0,45 μ m, y se incubó a 4 °C durante 1 h con la re-

sina de afinidad. Luego, las proteínas que no se unieron (*flow through*) se recolectaron en un tubo, y la columna se lavó dos veces con 8 ml de buffer de unión. Por último, la proteína se eluyó con 4 ml de buffer de elución (8 M urea, 20 mM fosfato de sodio, 500 mM NaCl, pH 4), tomando alícuotas de 1 ml (eluatós). Cada una de las fracciones obtenidas fue analizada por SDS-PAGE y Western blot. La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bradford, siguiendo las instrucciones del proveedor del reactivo (Sigma) y utilizando BSA (Sigma) como estándar.

3. Resultados

3.1. Análisis *in silico* de CpSUB2

La proteína completa CpSUB2 de *C. parvum* tiene una longitud de 2269 aminoácidos y está codificada por un único exón. Se predijo que la proteína madura comprende desde el aminoácido 33 al 2236, y su dominio de subtilisina característico abarca desde el aminoácido 766 al 1026 (261 aminoácidos de longitud). El fragmento seleccionado para su expresión recombinante abarcó desde el aminoácido 676 hasta el 1067 (392 aminoácidos de longitud) incluyendo al dominio catalítico. Por medio de las herramientas SVMTrip y Predicted Antigenic Peptides se predijeron un total de 13 epítomos B en esta región. Estos análisis indican que el fragmento seleccionado es potencialmente capaz de despertar una respuesta humoral, lo que sugiere que CpSUB2 es un buen candidato vacunal. En trabajos previos, se demostró que el fragmento comprendido entre los aminoácidos 729 al 1056 es inmunodominante en el suero de los terneros naturalmente infectados con *Cryptosporidium* spp. (Tomazic et al., 2018). El fragmento seleccionado en este trabajo contiene este segmento inmunorreactivo.

3.2. PCR, clonación en vector de expresión y secuenciación

Se visualizó en el gel de agarosa una banda intensa del tamaño esperado (Figura 1A), por lo que el amplicón se utilizó para producir el vector recombinante (pET101/D-TOPO/CpSUB2). Se obtuvieron 72 colonias en placas selectivas (datos no mostrados) de la cepa *E. coli* TOP10 transformadas con el vector recombinante. El análisis por PCR de las 7 co-

lonias estudiadas se muestra en la Figura 1B. Dado que la mayor intensidad de banda se observó para el clon número 6, éste fue elegido para su propagación y la purificación del plásmido recombinante. Este último presentó una concentración de 50 ng/μl y valores aceptables de pureza con respecto a proteínas (relación 260/280: 1,9) y solventes (relación 260/230: 2,16) por lo que se envió a secuenciar.

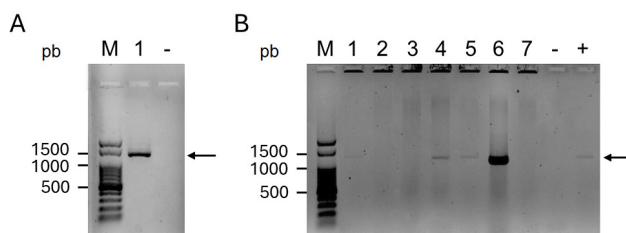


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de productos de amplificación de CpSUB2 obtenidos por PCR a partir de ADN de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* (A, calle 1) y las colonias seleccionadas (B, calles 1-7). Los controles positivo (+) y negativo (-) también se muestran. M: marcador de tamaño de ADN. Las flechas indican los amplicones del tamaño esperado de 1183 pb.

El análisis de la secuencia nucleotídica amplificada mostró un porcentaje de identidad del 99,9% con la secuencia de referencia (XM_627713.1), correspondiente a un aislamiento de *C. parvum* de Iowa, Estados Unidos, debido a una única sustitución (T > C) en la posición nucleotídica 2793 del gen, sin cambio en la secuencia de aminoácidos. Adicionalmente, presentó un porcentaje de identidad del 100% con secuencias pertenecientes a aislamientos de *C. parvum* oriundos de Argentina (números de acceso MF576528-31), evidenciando un posible polimorfismo. Por otra parte, se comprobó la inserción del fragmento de interés en el vector en el marco de lectura correcto, codificando para una proteína recombinante de 425 aminoácidos (incluyendo la etiqueta de histidinas), con un peso molecular calculado de 47 kDa.

3.3. Expresión y purificación de rCpSUB2

Se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa BL21 con el vector recombinante y se evaluó la expresión de la proteína de interés bajo diferentes condiciones de cultivo mediante SDS-PAGE y Western blot. Cuando se analizaron las fraccio-

nes proteicas solubles e insolubles en los geles de poliacrilamida, solo se observó un resultado positivo en las fracciones insolubles (datos no mostrados). En el análisis por Western blot de los extractos proteicos insolubles se observó i) una banda con un peso molecular aparente de ~ 50 kDa, ii) una banda tenue de aproximadamente 2 kDa menos (~ 48 kDa), iii) dos bandas mayoritarias de menor peso molecular (~ 35 y 33 kDa) y iv) múltiples bandas de mayor peso molecular (**Figura 2**). En relación a las variables óptimas de cultivo, se optó por un tiempo de inducción de 20 h, y 0,75 mM de IPTG a 37°C , condiciones que resultaron en una mayor expresión de las bandas deseadas (**Figura 2A y 2B**, respectivamente). Cuando la temperatura de incubación fue de 25°C , no se observó expresión de la proteína recombinante (datos no mostrados).

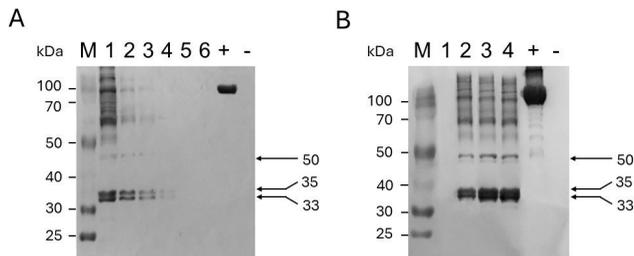


Figura 2. Western blot usando un anticuerpo primario anti-6xHis y secundario anti-IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina para analizar los extractos proteicos insolubles de cultivos incubados a 37°C . Resultados a (A) diferentes tiempos de inducción (calles 1 a 6: 20, 4, 3, 2, 1 y 0 h, respectivamente; 1 mM IPTG) y (B) diferentes concentraciones de IPTG (calles 1 a 4: 0, 0,5, 0,75 y 1 mM, respectivamente; inducción por 20 h). También se muestran los controles positivo (+) y negativo (-). M: marcador de peso molecular. Las flechas indican los pesos moleculares aparentes en kDa de las bandas señaladas.

La purificación de la proteína de interés se realizó con una columna de afinidad de níquel-agarosa gracias al agregado de una etiqueta de histidinas en la porción C-terminal de la proteína recombinante. Todas las fracciones de purificación fueron analizadas por SDS-PAGE y Western blot (**Figura 3A y 3B**, respectivamente). Si bien una pequeña parte de la proteína rCpSUB2 se pierde en los lavados, se obtuvieron fracciones enriquecidas en la proteína de interés con una masa

estimada de 5,8 mg a partir de 400 ml de cultivo bacteriano (**Figura 3B**, calles 5 y 6).

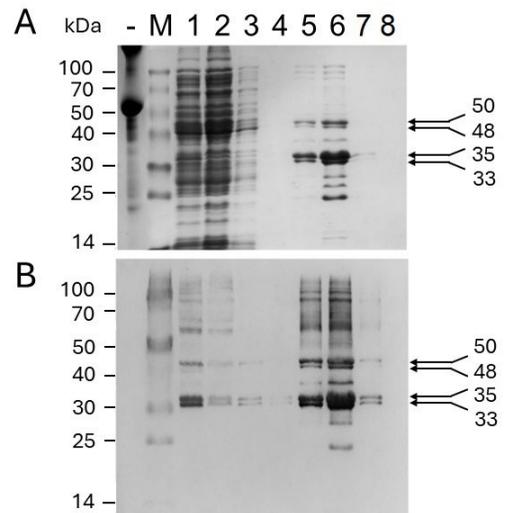


Figura 3. SDS-PAGE (A) y Western blot (B) usando un anticuerpo primario anti-6xHis y secundario anti-IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina para analizar las fracciones de purificación de rCpSUB2. Extracto crudo (calle 1), flow through (calle 2), primer lavado (calle 3), segundo lavado (calle 4), eluatos 1 a 4 (calle 5 a 8). También se muestra el control negativo (-) y el marcador de peso molecular (M). Las flechas indican los pesos moleculares aparentes en kDa de las bandas destacadas.

4. Discusión

Cryptosporidium parvum es un parásito que causa diarrea en los terneros recién nacidos, lo que en ocasiones provoca la muerte, afectando significativamente a las industrias ganaderas de todo el mundo. La ausencia de un tratamiento adecuado contra la criptosporidiosis ha impulsado a los investigadores a desarrollar estrategias eficaces de control y prevención, como lo es la vacunación. En trabajos previos se ha descrito a la proteína de superficie CpSUB2 como posible candidato vacunal, identificada como miembro del proteoma anclado a GPI de *C. parvum* (Tomazic et al., 2018). Se ha demostrado que CpSUB2 representa un homólogo de las subtilisinas, las que, en parásitos de este phylum, han revelado ser funcionalmente importantes para la invasión de

las células hospedadoras (Florin-Christensen et al., 2023; Poklepovich et al., 2023). En este trabajo, mediante análisis bioinformático, se predijo la existencia de epítomos B, lo que sugiere su importancia funcional.

Otro antígeno identificado en el proteoma anclado a GPI de *C. parvum* es GP60. La transferencia de anticuerpos anti-GP60 en el calostro a través de la inmunización de las madres ha resultado una estrategia confiable de inmunización pasiva contra este parásito (Timmermans et al., 2024). Esto permite hipotetizar que rCpSUB2 podría tener un efecto similar. Por otra parte, la suplementación alimentaria con anti-CpSUB2-IgY obtenida por inmunización de gallinas podría ser otro enfoque para utilizar a esta proteína en un esquema de inmunización pasiva. Esta estrategia se ha aplicado con éxito contra infecciones virales y bacterianas que causan diarrea en terneros neonatos (Vega et al., 2020), y mostró resultados muy prometedores en infecciones por *C. parvum* utilizando p23 como antígeno (Mira et al., 2025).

Los sistemas de expresión procariotas son de los más utilizados, debido a su bajo costo y fácil acceso y por permitir una transformación simple y altamente eficiente (Baneyx, 1999; Cantoia et al., 2021). Entre las bacterias, *E. coli* es el hospedador predominante para la producción de proteínas recombinantes (Rosano et al., 2019; Aguilar Lucero et al., 2021; Zhang et al., 2024). En este trabajo, se utilizó la cepa *E. coli* BL21 Star (DE3) para expresar un fragmento de 392 aminoácidos de la proteína CpSUB2 de *C. parvum* (17,3 % de la proteína completa) y se determinaron las condiciones óptimas para su producción. En estudios previos, también se ha utilizado *E. coli* como sistema de expresión para producir proteínas de *C. parvum*. Por un lado, Tomazic y colaboradores (2018) utilizaron la cepa de *E. coli* Rosetta 2DE3 pLacI para expresar un fragmento de menor tamaño de CpSUB2 (328 aminoácidos, 14,5 % de la proteína completa), y hallaron la proteína recombinante en cuerpos de inclusión insolubles, hecho que concuerda con lo observado en el presente trabajo. La producción de proteínas recombinantes en cuerpos de inclusión es un fenómeno común en *E. coli*, especialmente para proteínas de origen eucariota (Singh & Panda, 2005; Chew et al., 2020). Por otro lado, Miura y colaboradores (2017) expresaron GP60, proteína anclada a GPI, que está relacionada con la adhesión a la célula hospedadora en *C. hominis* y *C. parvum*. En dicho estudio fue necesario,

al igual que en este trabajo, la optimización de diferentes variables obteniendo resultados similares (Miura et al., 2017). A su vez, se logró aislar la proteína de interés del resto de las proteínas bacterianas mediante una técnica de cromatografía de afinidad al níquel en condiciones desnaturalizantes, en las que la proteína pierde su estructura secundaria y terciaria, y eluye al disminuir el pH del buffer (Qiagen, 2003). En los ensayos de SDS-PAGE y Western blot se observó una banda relativamente intensa con un peso molecular aparente de 50 kDa, lo cual se corresponde con el peso molecular calculado para rCpSUB2 (47 kDa). Además, se observaron bandas de menor y mayor peso molecular. Dado que en los ensayos de Western blot se utilizó un anticuerpo específico contra la etiqueta de histidinas en la región C-terminal, las bandas de peso molecular 33, 35 y 48 kDa corresponderían a fragmentos del C-terminal de la proteína expresada. Se ha reportado previamente en otros estudios de expresión en *E. coli* la obtención de fragmentos proteicos producto del accionar de proteinasas bacterianas (Falero et al., 2008; Gibisch et al., 2024), por lo que, es probable que rCpSUB2 posea sitios de corte para este tipo de enzimas próximos a su extremo N-terminal que expliquen la degradación observada. En relación a las bandas de mayor peso molecular, es posible que correspondan a agregados proteicos de la proteína completa y/o sus fragmentos (Qiagen, 2003). Por otro lado, Tomazic y colaboradores (2018) purificaron la proteína recombinante CpSUB2 también por cromatografía de afinidad al níquel, pero en condiciones nativas, utilizando para la elución diferentes concentraciones de imidazol. Considerando el costo económico que implica utilizar altas concentraciones de imidazol, en este trabajo se logró establecer un método de purificación de rCpSUB2 de manera más económica y rentable.

La proteína recombinante producida podría utilizarse en formulaciones vacunales. Como se mencionó anteriormente, la suplementación alimentaria con anti-CpSUB2-IgY obtenida por inmunización de gallinas podría ser otro enfoque promisorio de inmunización pasiva. La bibliografía es variada en cuanto a la cantidad de proteína y el número de refuerzos necesarios para los ensayos de inmunización de gallinas. Según estas variables, se utilizan entre 300 y 1250 μg para completar el programa de inmunización de una gallina (Nasiri et al., 2016; Zhang et al., 2016; Kim et al., 2017; Miura et

al., 2017). En este trabajo, se obtuvieron 5,8 mg de la proteína rCpSUB2 purificada que servirían para inmunizar hasta 19 gallinas para generar IgY anti-CpSUB2, utilizando un programa reduccionista.

El desarrollo de un esquema de inmunización pasiva de terneros para combatir la criptosporidiosis bovina constituye una herramienta novedosa y atractiva. Por un lado, aporta un nuevo medio para mejorar la salud de los terneros recién nacidos, beneficiando a la industria ganadera y garantizando un mejor bienestar del ganado. Además de esto, dado que el uso de drogas está muy extendido como tratamiento de la criptosporidiosis en terneros (Fayer & Ellis, 1993), la vacunación y la mejora de la inmunidad específica podrían reducir la necesidad de intervenciones con antibióticos y/o halofuginona, promoviendo prácticas de gestión más sostenibles y responsables. Por el otro lado, permitiría, además, disminuir la dispersión de ooquistes que comprometen la salud pública.

5. Conclusión

Se logró expresar un fragmento de la proteína rCpSUB2 de *C. parvum* utilizando *E. coli* como sistema de expresión y se purificó masa suficiente para establecer un plan de inmunización de gallinas para generar IgY anti-CpSUB2. Mostramos que el sistema de expresión y purificación establecido generó una cantidad de rCpSUB2 suficiente para la inmunización de hasta diecinueve gallinas.

Agradecimientos

Se agradece al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA, 2019-PD-E5-I102001 y 2023-PD-L06-I116), al Ministerio de Ciencia y Tecnología (MINCyT, PICT-2018_03314) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, PIP-2021_11220200101925CO y PUE-2019-2024_22920180100066CO) de Argentina por brindar el financiamiento necesario para la realización de este trabajo. Se agradece a la Lic. Paloma de Alba por la provisión de una muestra de ADN de *C. parvum*.

Referencias Bibliográficas

- Abuelo, A., Cullens, F., & Brester, J. L. (2021). Effect of pre-weaning disease on the reproductive performance and first-lactation milk production of heifers in a large dairy herd. *Journal of Dairy Science*, *104*(6), 7008-7017. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19791>
- Aguilar Lucero, D., Cantoia, A., Ceccarelli, E. A., & Rosano, G. L. (2021). Starting a new recombinant protein production project in *Escherichia coli*. *Methods in enzymology*, *659*, 3-18. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2021.08.019>
- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, *10*(5), 411-421. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(99\)00003-8](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(99)00003-8)
- Boulter-Bitzer, J. I., Lee, H., & Trevors, J. T. (2007). Molecular targets for detection and immunotherapy in *Cryptosporidium parvum*. *Biotechnology Advances*, *25*(1), 13-44. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.08.003>
- Cantoia, A., Aguilar Lucero, D., Ceccarelli, E. A., & Rosano, G. L. (2021). From the notebook to recombinant protein production in *Escherichia coli*: Design of expression vectors and gene cloning. *Methods in enzymology*, *659*, 19-35. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2021.07.008>
- Chew, F. N., Abidin, N. H. Z., Yusof, N. H. M., Rafi, N. M., & Chua, G. K. (2020). Recovery of inclusion body protein in *Escherichia coli*: Effects of solubilization methods and process condition. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, *736*(2), 022120. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/736/2/022120>
- Dabas, A., Shah, D., Bhatnagar, S., & Lodha, R. (2017). Epidemiology of *cryptosporidium* in pediatric diarrheal illnesses. *Indian Pediatrics*, *54*(4), 299-309. <https://doi.org/10.1007/s13312-017-1093-3>
- De Alba, P., Garro, C., Florin-Christensen, M., & Schnittger, L. (2023). Prevalence, risk factors and molecular epidemiology of neonatal cryptosporidiosis in calves: The Argentine perspective. *Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases*, *4*, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.crpvbd.2023.100147>
- De Alba, P., Florin-Christensen, M., & Schnittger, L. (2021). Situación epidemiológica de la criptosporidiosis bovina en Argentina. *Revista de Investigación Científica de la Universidad de Morón*, *8*, 51-65.

- Dupont, H. L., Chappell, C. L., Sterling, C. R., Okhuysen, P. C., Rose, J. B., & Jakubowski, W. (1995). The Infectivity of *Cryptosporidium parvum* in Healthy Volunteers. *The New England Journal of Medicine*, 332(13), 855-859. <https://doi.org/10.1056/NEJM199503303321304>
- Falero, A., Suzarte, E., Águila, B., Campos, J., & Fando, R. (2008). Expresión heteróloga de la proteína OmpU de *Vibrio cholerae* y su purificación por cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 39(2), 109-114.
- Fayer, R., & Ellis, W. (1993). Paromomycin is effective as prophylaxis for cryptosporidiosis in dairy calves. *The Journal of Parasitology*, 79(5), 771-774.
- Florin-Christensen, M., Suarez, C. E., Rodriguez, A. E., Flores, D. A., & Schnittger, L. (2014). Vaccines against bovine babesiosis: where we are now and possible roads ahead. *Parasitology*, 141(12), 1563-1592. <https://doi.org/10.1017/S0031182014000961>
- Florin-Christensen, M., Schnittger, L., Bastos, R. G., Rathinasamy, V. A., Cooke, B. M., Alzan, H. F., & Suarez, C. E. (2021). Pursuing effective vaccines against cattle diseases caused by apicomplexan protozoa. *CABI Reviews*, 16(24), 1-23. <https://doi.org/10.1079/PAVSNR202116024>
- Florin-Christensen, M., Sojka, D., Ganzinelli, S., Šnebergerová, P., Suarez, C.E., & Schnittger, L. (2023). Degrade to survive: the intricate world of piroplasmid proteases. *Trends Parasitol.* 39(7), 532-546. <https://doi: 10.1016/j.pt.2023.04.010>
- Garro, C. J., Morici, G. E., Tomazic, M. L., Vilte, D., Encinas, M., Vega, C., Bok, M., Parreño, V., & Schnittger, L. (2021). Occurrence of *Cryptosporidium* and other enteropathogens and their association with diarrhea in dairy calves of Buenos Aires province, Argentina. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 24, 100567. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2021.100567>
- Gibisch, M., Müller, M., Tauer, C., Albrecht, B., Hahn, R., Cserjan-Puschmann, M., & Striedner, G. (2024). A production platform for disulfide-bonded peptides in the periplasm of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 23(1), 166. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02446-6>
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Harris, P. K., Yeoh, S., Dluzewski, A. R., O'Donnell, R. A., Withers-Martinez, C., Hackett, F., Bannister, L. H., Mitchell, G. H., & Blackman, M. J. (2005). Molecular Identification of a Malaria Merozoite Surface Sheddase. *PLoS Pathogens*, 1(3), 241-251. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010029>
- Jenkins, M., Higgins, J., Kniel, K., Trout, J., & Fayer, R. (2004). Protection of Calves Against Cryptosporiosis by Oral Inoculation with Gamma-Irradiated *Cryptosporidium parvum* Oocysts. *Journal of Parasitology*, 90(5), 1178-1180. <https://doi.org/10.1645/GE-3333RN>
- Kim, H. S., Lee, B., Han, S. Y., & Jung, Y. T. (2017). Expression of bovine rotavirus VP8 and preparation of IgY antibodies against recombinant VP8. *Acta Virologica*, 61(2), 143-149. https://doi.org/10.4149/av_2017_02_03
- Mine, Y., & Kovacs-Nolan, J. (2002). Chicken Egg Yolk Antibodies as Therapeutics in Enteric Infectious Disease: A Review. *Journal of Medicinal Food*, 5(3), 159-169. <https://doi.org/10.1089/10966200260398198>
- Mira, A.; Garro, C. J.; de Alba, P.; Monti, D.; Lang, M. C.; Vivas, A.; Medina, E.; Franco, J. C.; Gutierrez, Á.; Schnittger, L.; Wigdorovitz, A.; Parreño, V.; & Bok, M. (2025). P23-Specific IgY Significantly Reduces Diarrhea and Oocyst Shedding in Calves Experimentally Infected with *Cryptosporidium parvum*. *Vaccines*, 13(2), 162. <https://doi.org/10.3390/vaccines13020162>
- Miura, V. C., Aoki, S. M., Peitl Junior, P., Pires, L. C., Dalmagro, P., Nakamura, A. A., & Meireles, M. V. (2017). Evaluation of recombinant *Cryptosporidium hominis* GP60 protein and anti-GP60 chicken polyclonal IgY for research and diagnostic purposes. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 26(2), 205-210. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612017032>
- Nasiri, K., Nassiri, M. R., Tahmoorespur, M., Haghparast, A., & Zibae, S. (2016). Production and characterization of egg yolk antibody (IgY) against recombinant VP8-S2 antigen. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 19(2), 271-279. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2016-0034>
- O'Connor, R. M., Wanyiri, J. W., Cevallos, A. M., Priest, J. W., & Ward, H. D. (2007). *Cryptosporidium parvum* glycoprotein gp40 localizes to the sporozoite surface by association with gp15. *Molecular and biochemical parasitology*, 156(1), 80-83. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.07.010>
- Plassmeyer, M. L., Reiter, K., Shimp, R. L., Kotova, S.,

- Smith, P. D., Hurt, D. E., House, B., Zou, X., Zhang, Y., Hickman, M., Uchime, O., Herrera, R., Nguyen, V., Glen, J., Lebowitz, J., Jin, A. J., Miller, L. H., MacDonald, N. J., Wu, Y., & Narum, D. L. (2009). Structure of the *Plasmodium falciparum* Circumsporozoite Protein, a Leading Malaria Vaccine Candidate. *Journal of Biological Chemistry*, 284(39), 26951-26963. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.013706>
- Poklepovich, T.J., Mesplet, M., Gallenti, R., Florin-Christensen, M., & Schnittger L. (2023). Comparative degradome analysis of the bovine piroplasmid pathogens *Babesia bovis* and *Theileria annulata*. *Pathogens*. 12(2), 237. doi: 10.3390/pathogens12020237.
 - Pumipuntu, N., & Piratae, S. (2018). Cryptosporidiosis: A zoonotic disease concern. *Veterinary World*, 11(5), 681-686. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.681-686>
 - Qiagen. (2003). *The QIAexpressionist: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins* (5.a ed.).
 - Rodriguez, A. E., Florin-Christensen, M., Flores, D. A., Echaide, I., Suarez, C. E., & Schnittger, L. (2014). The glycosylphosphatidylinositol-anchored protein repertoire of *Babesia bovis* and its significance for erythrocyte invasion. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5(3), 343-348. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.12.011>
 - Rosano, G. L., Morales, E. S., & Ceccarelli, E. A. (2019). New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Science*, 28(8), 1412-1422. <https://doi.org/10.1002/pro.3668>
 - Santín, M. (2013). Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals. *New Zealand Veterinary Journal*, 61(1), 1-10. <https://doi.org/10.1080/00480169.2012.731681>
 - Silverlås, C., Björkman, C., & Egenvall, A. (2009). Systematic review and meta-analyses of the effects of halofuginone against calf cryptosporidiosis. *Preventive Veterinary Medicine*, 91(2-4), 73-84. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.05.003>
 - Singh, S. M., & Panda, A. K. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(4), 303-310. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.303>
 - Timmermans, M., Hubers, W., Schroer, D., Gevers, K., Segers, R. P., Niessen, R., & Van Roosmalen, M. H. (2024). The first commercially approved efficacious *cryptosporidium* vaccine protecting New-Born calves from severe diarrhea. *Veterinary Vaccine*, 3(1), 100054. <https://doi.org/10.1016/j.vetvac.2024.100054>
 - Tomazic, M. L., Rodriguez, A. E., Lombardelli, J., Poklepovich, T., Garro, C., Galarza, R., Tiranti, K., Florin-Christensen, M., & Schnittger, L. (2018). Identification of novel vaccine candidates against cryptosporidiosis of neonatal bovines by reverse vaccinology. *Veterinary Parasitology*, 264, 74-78. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.11.007>
 - Vega, C. G., Bok, M., Ebinger, M., Rocha, L. A., Rivolta, A. A., González Thomas, V., Muntadas, P., D'Aloia, R., Pinto, V., Parreño, V., & Wigdorovitz, A. (2020). A new passive immune strategy based on IgY antibodies as a key element to control neonatal calf diarrhea in dairy farms. *BMC Veterinary Research*, 16(1), 264. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02476-3>
 - Yeoh, S., O'Donnell, R. A., Koussis, K., Dluzewski, A. R., Ansell, K. H., Osborne, S. A., Hackett, F., Withers-Martinez, C., Mitchell, G. H., Bannister, L. H., Bryans, J. S., Kettleborough, C. A., & Blackman, M. J. (2007). Subcellular Discharge of a Serine Protease Mediates Release of Invasive Malaria Parasites from Host Erythrocytes. *Cell*, 131(6), 1072-1083. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.049>
 - Zhang, M., Zheng, Y., Wang, S., Wang, P., Huang, J., Song, X., Yu, R., & Zhang, C. (2024). Soluble expression of recombinant human interleukin-2 in *Escherichia coli* and its facile production. *Protein Expression and Purification*, 221, 106507. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2024.106507>
 - Zhang, X., Diraviyam, T., Li, X., Yao, G., & Michael, A. (2016). Preparation of chicken IgY against recombinant E2 protein of bovine viral diarrhea virus (BVDV) and development of ELISA and ICA for BVDV detection. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(12), 2467-2472. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1217144>