

Producción de la glicoproteína G del virus de la rabia en la levadura *Pichia pastoris*, para su uso en medicina veterinaria

Production of Rabies Virus Glycoprotein G in *Pichia Pastoris* Yeast for Its Use in Veterinary Medicine

Picotto LD^{1*}, Sguazza GH², Tizzano MA², Cavalitto SF^{1,3}, Pecoraro MR²

¹Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

²Cátedra de Virología, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias.

³Área Biotecnología, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

*Autor correspondiente. Correo electrónico del autor: lpicotto@fcv.unlp.edu.ar

Resumen: El gen de la glicoproteína G de la cepa CVS-51 del virus de rabia fue clonado, secuenciado y expresado en la levadura *Pichia pastoris* como proteína de secreción. La antigenicidad de esta proteína recombinante fue analizada preliminarmente mediante Western blot. La glicoproteína recombinante mostró reaccionar de la misma manera que la glicoproteína nativa cuando se la enfrentó a anticuerpos específicos. Los datos indican que la glicoproteína recombinante puede ser expresada y aislada de manera sencilla y podría ser usada como fuente segura de antígeno en la producción de sistemas aplicados al diagnóstico y de una vacuna a subunidades para la prevención de la enfermedad.

Palabras clave: Virus de la rabia, glicoproteína G, *Pichia pastoris*.

Abstract: The Glycoprotein (G) gene of rabies virus CVS-51 strain was cloned, sequenced and expressed in *Pichia pastoris* yeast as a secreted protein. The antigenicity of this recombinant protein was preliminarily examined by Western blot. Like native glycoprotein, the recombinant glycoprotein was found reactive when challenged against specific antibodies. The data indicate that the recombinant protein can be expressed and isolated straightforwardly and may be useful as a safe source in the production of diagnostic kits and subunit vaccines to prevent the disease.

Keywords: Rabies virus, Glycoprotein, *Pichia pastoris*.

Introducción

La rabia es una enfermedad viral que causa una forma letal de encefalomiелitis en seres humanos y animales susceptibles al virus. El número anual de muertes humanas en todo el mundo por rabia se estima en 59.000 (Hampson *et al* 2015). La mayoría de ellas ocurre en países subdesarrollados o en desarrollo, donde la rabia canina es enzoótica. La principal forma de transmisión es mediante mordedura de un perro rabioso (Meslin *et al* 1994). La existencia de grandes reservorios de virus de la rabia en perros callejeros y muchas especies de animales salvajes representa un grave problema para los seres humanos y animales domésticos (Martínez 2000). El control de la rabia canina se puede lograr a través de programas de vacunación masiva de los animales y de la eliminación de perros callejeros. Sin embargo, la exposición a perros rabiosos sigue siendo responsable de más del 99 % de las muertes humanas en todo el mundo (Franka *et al* 2013).

El virus de la rabia pertenece al género *Lyssavirus* dentro de la familia *Rhabdoviridae*. Presenta un genoma de cadena simple de ácido ribonucleico (ARN) en sentido negativo que codifica cinco proteínas en el siguiente orden: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de la matriz (M), glicoproteína G (G) y una ARN polimerasa dependiente de ARN (L) (Conzelmann *et al* 1990; Coslett *et al* 1980).

Pichia pastoris es una levadura muy utilizada actualmente como sistema de expresión de proteínas recombinantes debido a su fácil manipulación genética, el alto nivel de producción que puede obtenerse de la proteína de interés y la capacidad de realizar modificaciones postraduccionales similares a las de los organismos eucariotas superiores (glicosilación, puentes disulfuro y procesado proteolítico). Además, posee una secuencia señal de secreción de la proteína heteróloga en el medio, lo que permite purificarla fácilmente (Hollenberg y Gellissen 1997). Este sistema de expresión emplea vectores de integración que generan una estabilidad génica, incluso en procesos a gran escala. Los cultivos se realizan con medios mínimos, sencillos, económicos, y son escalables. Todas estas características hacen a *Pichia pastoris* un sistema de expresión óptimo para la producción de proteínas recombinantes.

El objetivo del trabajo fue expresar la glicoproteína G del virus de la rabia en *Pichia pastoris*, mediante la inducción con metanol en condiciones de crecimiento controladas.

Materiales y métodos

Amplificación del gen de la glicoproteína G de la rabia mediante RT-PCR

La extracción del ARN viral se realizó a partir de una cepa vacunal inactivada del virus de la rabia

(CVS-51), gentilmente cedida por el Instituto Biológico Dr. Tomás Perón de La Plata, utilizando TRIzol® (Invitrogen) de acuerdo al protocolo del fabricante. La transcripción reversa se llevó a cabo utilizando 1 µg de ARN total, cebadores al azar, inhibidor de RNasa RNasin® (Promega) y la transcriptasa reversa del virus de leucemia murina de Moloney (Promega), bajo las condiciones especificadas por el proveedor. La reacción de PCR se realizó mediante la adición de 5 µl del ADN complementario a una mezcla conteniendo los cebadores GRVF (5' ATG TCG ACA AAA GAA TGG TTC CTC AGG CTC TCC TGT TTG TAC C 3') y GRVR (5' ATG AAT TCT CAC AGT CCG GTC TCA CCC CCG CTC TTG 3'). Para facilitar la orientación de la clonación, los sitios de restricción Sall y EcoRI se incorporaron a los cebadores GRVF y GRVR, respectivamente. El perfil de ciclado consistió en un paso de desnaturalización inicial de 3 min a 94 °C, seguido por 30 ciclos de 45 seg a 94 °C, 45 seg a 58 °C, y 90 seg a 72 °C. Por último, se realizó un paso de elongación a 72 °C durante 10 min. El producto de la RT-PCR se corrió en un gel de agarosa al 1,5 % para comprobar si el fragmento amplificado presentaba el tamaño esperado.

Construcción del vector de expresión para *Pichia pastoris*

El producto de la amplificación de la RT-PCR fue ligado al vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y transformado, mediante electroporación, en *Escherichia coli* TOP10. Se sembraron 400 µl de la mezcla de transformación en una placa conteniendo agar Luria Bertani (LB) con ampicilina, X-Gal e IPTG. Para confirmar la presencia del inserto en el vector, a partir de las colonias obtenidas, se realizó una *colony*-PCR con cebadores específicos para la secuencia M13 presente en el vector pCR2.1-TOPO: M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') y M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). El plásmido con el gen de la glicoproteína G de la rabia (pCR2.1-TOPO-G) fue digerido con las enzimas de restricción Sall y EcoRI, mientras que el vector de expresión para *Pichia pastoris* (pPIC9), fue digerido con las enzimas de restricción XhoI (compatible con el extremo generado por Sall) y EcoRI. Ambos productos de digestión fueron purificados desde geles de agarosa, usando el *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up system* (Promega), y posteriormente ligados con el *Kit expressLink T4 DNA Ligase* (Invitrogen) de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

El producto de ligación (pPIC9-G) fue utilizado para transformar *E. coli* TOP10 mediante electroporación. Se sembraron 400 µl de la mezcla de transformación en una placa conteniendo agar LB con ampicilina. La transformación fue confirmada mediante *colony*-PCR utilizando cebadores específicos para la

secuencia AOX1: 5'AOX1 (5' GACTGGTTCCAATT-GACAAGC 3') y 3'AOX1 (5' GCAAATGGCATTCT-GACATCC 3').

Generación de un clon de *Pichia pastoris* recombinante

El ADN plasmídico de una de las colonias obtenidas en la placa conteniendo agar LB con ampicilina fue digerido con la enzima SacI (la linealización del plásmido favorece el evento de recombinación) y utilizado para transformar, mediante electroporación, la levadura *Pichia pastoris* GS115. Luego de la transformación, 400 µl de la mezcla fueron sembrados en una placa de agar MD (medio mínimo con glucosa y sin histidina) que fue incubada durante 48 h a 28 °C. Para comprobar la transformación, utilizando los cebadores 5'AOX1 y 3'AOX1, se realizaron *colony-PCR* y los productos de amplificación se corrieron en un gel de agarosa al 1,5 %. Se seleccionó, al azar, una de las colonias correctamente transformada y se la secuenció para determinar si el gen había sido clonado correctamente. El resultado se comparó con otras secuencias de la glicoproteína G de rabia almacenadas en bases de datos.

Expresión de la glicoproteína G en pequeña escala

Las colonias positivas a la *colony-PCR* y la cepa control *Pichia pastoris* GS115 sin transformar fueron cultivadas en agitación a 28 °C *overnight* en 5 ml de medio líquido YPD (10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona y 20 g/L de D-glucosa). Las levaduras fueron recolectadas mediante centrifugación a baja velocidad (2000 x g, 15 minutos), resuspendidas en 50 ml de medio BMG (glicerol al 1 %, base nitrogenada para levaduras al 1,34 % y fosfato de potasio 0,1 M, pH 6,0) e incubadas en un frasco Erlenmeyer de 250 ml a 28 °C durante 24 horas, con agitación suave. Las levaduras fueron recolectadas mediante centrifugación a baja velocidad (2000 x g, 15 minutos), resuspendidas en 10 ml de medio BMM (metanol al 0,5 %, base nitrogenada para levaduras al 1,34 % y fosfato de potasio 0,1 M, pH 6,0) e incubadas en un frasco Erlenmeyer de 100 ml a 28 °C durante 72 h, con agitación suave. Para mantener la inducción, se añadió metanol cada 24 horas hasta una concentración final de 0,5 %.

También se realizó un cultivo en condiciones similares de la cepa GS115 sin transformar en medio BMM suplementado con histidina que fue utilizado como control negativo. En todos los casos, se tomaron muestras de los sobrenadantes de cultivos a las 0, 24, 48 y 72 h de inducción, para su posterior análisis mediante SDS-PAGE y ELISA.

Detección de la glicoproteína G mediante ELISA

Para determinar el clon de *Pichia pastoris*, con mayor nivel de expresión de la glicoproteína G recombinante, se desarrolló un método de ELISA. Como control positivo se utilizó la vacuna antirrábica producida en el Instituto de Zoonosis Luis Pasteur de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y, como control negativo, el sobrenadante de cultivo de *Pichia pastoris* GS115 sin transformar. Se colocaron 100 µl de muestra (controles y cada sobrenadante de cultivo a distintos tiempos de inducción) y 100 µl de buffer de pegado (Na₂CO₃ 25 mM, NaHCO₃ 25 mM, pH 9,6). Se incubaron a 4 °C *overnight*. Luego los pocillos fueron bloqueados a 37 °C durante 1 hora con un buffer de bloqueo, conteniendo leche descremada en polvo al 3 % y tween-20 al 0,05 % en PBS. Posteriormente se realizaron tres lavados con 100 µl de solución de lavado (tween-20 al 0,05 % en PBS). Como anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-glicoproteína G de rabia diluido 1:2000 en buffer de bloqueo. Se agregaron 100 µl por pocillo de solución de anticuerpo primario y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Se realizaron tres lavados con 100 µl de solución de lavado. Se incubaron con 100 µl de una dilución (1:2000) de un anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante a 37 °C durante 1 hora. Finalmente, las placas fueron lavadas y reveladas con 100 µl de solución 0,3 mg/ml de ATBS conteniendo H₂O₂ al 0,02 % durante 1 hora en oscuridad. Los valores de absorbancia fueron leídos a 405 nm utilizando un fotómetro de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific).

Expresión en fermentador de la glicoproteína G de la rabia en *Pichia pastoris*

Una vez encontrado el clon a amplificar, se realizó un cultivo en un biorreactor BioFlo 310 (New Brunswick Scientific, Eppendorf, Alemania) de 4 litros de volumen de trabajo.

Inicialmente, 150 ml del medio sintético MS fueron inoculados con 5 ml de un cultivo *overnight* en medio YPD del clon seleccionado mediante ELISA, e incubado *overnight* a 28 °C con agitación suave. El medio sintético MS contiene 32 g/L de glicerol; 20 g/L de KH₂PO₄; 2 g/L de MgSO₄·7H₂O; 0,3 g/L de CaCl₂·2H₂O; 15,7 g/L de (NH₄)₂SO₄; 1 ml de solución de vitaminas 1000X (0,002 g/L de biotina, 0,4 g/L de pantotenato de calcio, 0,002 g/L de ácido fólico, 0,4 g/L de niacina, 0,2 g/L de ácido p-aminobenzoico, 0,4 g/L de piridoxina (HCl), 0,2 g/L de riboflavina, 0,4 g/L de tiamina (HCl) y 2 g/L de inositol) y 1 ml de solución de elementos traza 1000X (0,05 g/L de ácido bórico, 0,004 g/L de sulfato de cobre, 0,01 g/L de yoduro de

potasio, 0,02 g/L de cloruro férrico, 0,04 g/L de sulfato de manganeso, 0,02 g/L de molibdato de sodio y 0,04 g/L de sulfato de zinc).

Una vez que el cultivo *starter* alcanzó una densidad óptica (OD_{600nm}) de 10, el fermentador conteniendo 3,85 litros de medio sintético MS fresco fue inoculado. La temperatura de cultivo se fijó en 28 °C y el pH se ajustó a 5.

Durante la primera etapa del cultivo se utilizó glicerol como fuente de carbono. La agitación se programó de manera tal de mantener el nivel de oxígeno disuelto en 30 % del valor de saturación, hasta que se consumiera todo el glicerol disponible en el fermentador.

Una vez consumido el glicerol, se diseñó una estrategia de alimentación para garantizar, en todo momento, un porcentaje de oxígeno disuelto entre el 20 y el 40 % de su valor de saturación en el medio de cultivo (DO-STAT). Se programó la bomba de alimentación de metanol para que se activara una vez que el oxígeno disuelto hubiera superado el 40 % y se apagase una vez que el mismo hubiera disminuido por debajo del 20 %. Este ciclo se mantuvo durante las 48 horas que duró la alimentación de metanol. Durante el proceso de fermentación, se tomaron muestras cada 12 horas, las que posteriormente fueron analizadas mediante SDS-PAGE y Western blot, para determinar los niveles de expresión de la glicoproteína G rábica recombinante.

Ensayos de SDS-PAGE y Western blot

Las proteínas presentes en el sobrenadante del cultivo a distintos tiempos fueron separadas mediante SDS-PAGE en condiciones estándar. Se utilizó un buffer con reductor y un gel de poliacrilamida al 5 % para el apilamiento y otro al 8 % para la separación. La corrida se efectuó a 60 V durante 4 horas. Los geles fueron teñidos con una solución de azul de Coomassie R250 al 0,1 % (Sigma).

Para el análisis de Western blot, se partió también de un SDS-PAGE con un gel al 8 % y luego se transfirió a una membrana de difluoruro de polivinilideno PVDF (Millipore), utilizando un aparato de electroblotting semiseco (Bio-Rad) a 15 V durante 30 minutos en buffer de transferencia (tris 100 mM, glicina 192 mM). La membrana fue incubada *overnight* a 4 °C con solución bloqueo (leche en polvo descremada al 5 % y tween-20 al 0,1 % en PBS). Luego de tres lavados de 5 min cada uno con TPBS (tween-20 al 0,1 % en PBS), se incubó durante 1 h a 37 °C y en agitación con una dilución 1:200 en solución de bloqueo de un suero policlonal anti-rabia producido en conejo. Luego de tres lavados de 5 minutos cada uno con TPBS, se incubó durante 1 h a 37 °C y en agitación con una di-

lución 1:1000 en solución de bloqueo, de un suero de cabra anti-IgG de conejo conjugado con la peroxidasa de rábano picante. Después de ser lavados tres veces durante 5 minutos con buffer TPBS, el anticuerpo unido fue detectado usando 3,3-diaminobenzidina en presencia de H_2O_2 .

Resultados

Construcción del vector de expresión para *Pichia pastoris*

El producto de la RT-PCR se corrió en un gel de agarosa al 1,5 %, comprobándose el tamaño esperado de 1597 pb (Figura 1). Este producto fue ligado al vector pCR2.1-TOPO y transformado, mediante electroporación, en *E. coli* TOP10. Las bacterias transformadas fueron sembradas en una placa selectiva de LB con ampicilina, X-Gal e IPTG, observándose más de 50 colonias blancas candidatas a presentar al gen de interés. Para confirmar el clonado, se realizaron *colony*-PCR con cebadores específicos a la región M13 del vector pCR2.1-TOPO.

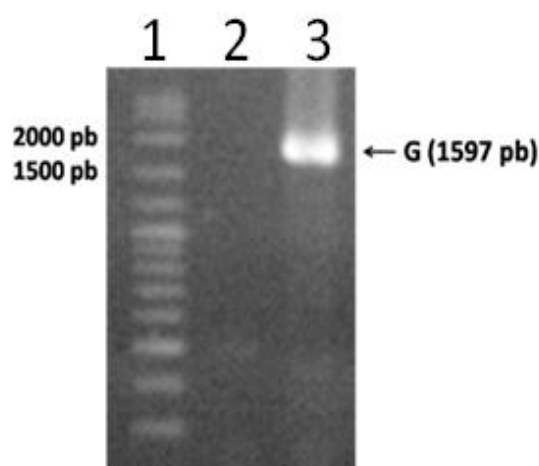


Figura 1: Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % del producto de la RT-PCR. Calle 1: marcador de peso molecular (GeneRuler™ 100 bp plus). Calle 2: control negativo. Calle 3: 10 μ l de producto de RT-PCR.

A partir de uno de los clones positivos, se realizó el subclonado del gen de la glicoproteína G en el vector pPIC9. Posteriormente, el vector pPIC9-G fue transformado en *E. coli* TOP10 mediante electroporación, obteniéndose más de 100 colonias candidatas a presentar al gen de interés.

Utilizando cebadores específicos para la secuencia AOX1 se confirmó la transformación en 4 colonias mediante *colony*-PCR, observándose en los 4 casos una banda de 2067 pb de acuerdo a lo esperado.

Generación de un clon de *Pichia pastoris* recombinante

El ADN plasmídico pPIC9-G de uno de los clones previamente analizados fue linealizado con SacI en la región HIS4 y transformado, mediante electroporación, en *Pichia pastoris* GS115. El producto de la transformación fue sembrado en placas selectivas de agar MD (sin histidina), obteniéndose más de 50 colonias a las 72 horas de incubación a 28 °C. Las levaduras transformadas fueron capaces de revertir su auxotrofia a histidina (ya que se reconstituyó el gen HIS4) y lograron crecer en placas de agar MD. La transformación fue confirmada mediante *colony*-PCR, utilizando los cebadores 5'AOX1 y 3'AOX1. Así, se obtuvo un resultado positivo en 9 de las 15 colonias analizadas.

Utilizando una de las colonias positivas, se realizó un cultivo *overnight* en YPD, se extrajo su ADN genómico y se secuenció, usando la combinación de cebadores GRVF y GRVR. La secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante (Figura 2), deducida a partir de la secuencia de nucleótidos obtenida, presentó más de un 99 % de homología al ser comparada con otras secuencias de la glicoproteína G almacenadas en el GenBank.

Expresión de la glicoproteína G en pequeña escala

Se realizaron los ensayos de expresión en escala de frasco Erlenmeyer para determinar la capacidad productora de glicoproteína G rábica de los clones de levadura positivos a la *colony*-PCR. Los sobrenadantes de cultivos a los distintos tiempos de inducción fueron evaluados mediante ELISA y SDS-PAGE para determinar la presencia de la glicoproteína G, contrastándolos con el sobrenadante de un cultivo de la cepa control *Pichia pastoris* GS115 sin transformar, producido en las mismas condiciones. Se realizó primeramente un ensayo de ELISA para determinar

cuál de los clones presentaba mayor producción de glicoproteína G, debido a la cantidad de clones a probar (datos no mostrados). Con el clon que presentó mayor señal en el ELISA, se realizó un SDS-PAGE y se observó una banda de aproximadamente 60 KDa que no estaba presente en el sobrenadante utilizado como control negativo (datos no mostrados). Se decidió entonces realizar un cultivo en fermentador para intentar mejorar la producción de la glicoproteína G recombinante.

Escalado en fermentador: ensayos de SDS-PAGE y Western blot

Al comparar mediante SDS-PAGE los sobrenadantes de cultivo en el fermentador del clon seleccionado y de un cultivo control realizado en condiciones similares (Figura 3A), pudo verse en la calle 4 (sobrenadante de cultivo recombinante) una banda intensa a una altura aproximada de 60 KDa que no se observa en la calle 3 (sobrenadante de cultivo control). Este mismo resultado fue observado en el ensayo de Western blot (Figura 3B). Además, pudieron verse las proteínas virales presentes en la vacuna inactivada que no se observaron en el SDS-PAGE (calle 2 de la Figura 3B), donde la banda correspondiente a la glicoproteína G es la que se encuentra a la altura aproximada de 68 KDa.

Discusión

Aunque la rabia no es enzoótica en Argentina, debido a su presencia en Bolivia y al constante movimiento de personas y animales entre ambos países se presentan brotes esporádicos de esta enfermedad en el norte de Argentina. Para poder controlar la presencia del virus en las zonas afectadas, resulta útil el estudio de sistemas aplicados al diagnóstico y de nuevas vacunas.

En el presente trabajo, el gen que codifica para la glicoproteína G de la rabia fue clonado en el sistema

```

1  MVPQALLFVP  LLVFPICFEGK  FFIYTIIPDKL  GPWSPIDIHH  LSCPNNLVVE
51  DEGRTNLSGE  SYMELKVGVI  SAIKMGETFC  TGVVTEAETY  TNFVGYVTTT
101  FKRKHEFRPTP  DACRAAYNWK  MAGDPRYEES  LHNFPDYHW  LRTVKTTKES
151  LVTESPSYAD  LDPYDRSLAS  RVFPGGKCSG  VAVSSTYCST  NHDYTIWMPE
201  NPKLGMSCDI  FTNSRGKRAS  KGSETCGEVD  ERGLYKSLKG  ACKLQLCGVL
251  GLRLMDGTWV  SMQTSNETKW  CPPGQLVNLI  DFRSDEIEHE  VVEELVKKRG
301  ECLDALESIM  TPKSVSPRRL  SHLKKLVPGF  GKAYTIFNKT  LMEADAHYKL
351  VRTWNEILPS  KGCLRVGGRC  HPEVNGVFFN  GLILGPDGNV  LIPEMQSSLL
401  QQIMELLVSS  VIPLMHPLAD  PSTVFKNGDE  AEDFVEVHLP  DVHERISGVD
451  LGLPNWGYV  LLSAGALTAL  MLTIFLMTOW  RRVNRSEPTQ  HNLRGTTGREV
501  SVTPQSGKIT  SSWESYKSGG  ETGL

```

Figura 2: Secuencia de aminoácidos de la glicoproteína G recombinante a partir de la secuencia de nucleótidos. Los sitios de glicosilación se encuentran subrayados.

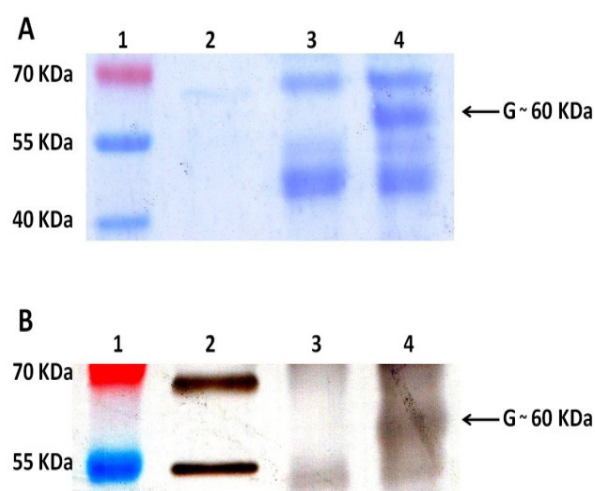


Figura 3: SDS-PAGE (A) y Western blot (B) de los sobrenadantes de cultivos en fermentador. Calle 1: marcador de peso molecular (Fermentas). Calle 2: vacuna inactivada; la banda superior es debida a la glicoproteína G rábica. Calle 3: sobrenadante del cultivo de *Pichia pastoris* GS115 sin transformar. Calle 4: sobrenadante del cultivo de *Pichia pastoris* recombinante a las 48 horas de inducción.

de expresión *Pichia pastoris*. Cuando se contrastaron las secuencias del gen clonado y la de la glicoproteína G de la cepa CVS-11 del virus de la rabia almacenada en el GenBank, el resultado arrojó una homología de secuencia superior al 99 %. Además, se comprobó que los tres sitios de N glicosilación descritos por Wiktor *et al* (1973) están presentes. Esto es de particular interés, debido a que es necesario que la glicoproteína se encuentre correctamente glicosilada y plegada para ser inmunogénica (Foley *et al* 2000).

Al comparar los cultivos en fermentador mediante SDS-PAGE, en el sobrenadante de cultivo del clon seleccionado se observó una banda intensa a una altura aproximada de 60 KDa no presente en el sobrenadante de cultivo control. Este resultado es acorde a lo esperado, debido a que la glicoproteína G de la rabia tiene un peso aproximado de 56,8 KDa sin glicosilar. Cuando se evaluaron los mismos sobrenadantes mediante Western blot, la glicoproteína G recombinante producida fue reconocida por anticuerpos específicos contra la rabia, de la misma manera que la glicoproteína nativa.

La composición del medio de cultivo y la estrategia de inducción empleada permitieron expresar la glicoproteína G recombinante a las 24 horas de alimentación con metanol. Este período es muy inferior al descrito por Nagesha *et al* (2010), quienes expresaron la glicoproteína G recombinante sólo después de las 108 horas de alimentación. Esta disminución de tiempo permite un ahorro económico considerable,

si se piensa en la posibilidad de escalar este proceso a nivel industrial.

A pesar de que *Pichia pastoris* tiene la capacidad de glicosilar proteínas de manera similar a la de los organismos eucariotas superiores, se observó una ligera variación en el peso molecular de la proteína obtenida respecto a la glicoproteína G del virus, posiblemente debido al agregado en defecto de residuos de azúcares durante el proceso de glicosilación. Esto puede explicarse por el hecho de que no todas las cepas de *Pichia pastoris* presentan las mismas características para glicosilar, teniendo algunas la actividad de glicosilación muy desarrollada y otras no tanto.

Si bien los resultados obtenidos hasta el momento son alentadores, se necesitarán ensayos de inmunización y estudios del bioproceso que mejoren la producción de esta proteína recombinante, para poder ser utilizada en la elaboración de sistemas aplicados al diagnóstico y de vacunas a subunidades para la prevención de la enfermedad.

Declaración de conflicto de intereses

El autor declara que no existe conflicto de intereses, incluyendo las relaciones financieras, personales o de otro tipo con otras personas u organizaciones que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración de los integrantes de la Cátedra de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata y del CINDEFI. Este trabajo fue parcialmente financiado por un subsidio otorgado por la UNLP en el marco del Programa de Incentivos a Docentes Investigadores (Proyecto 11/V224).

Bibliografía

- Conzelmann KK, Cox JH, Schneider LG, Thiel HJ. Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the attenuated rabies virus SAD B19. *Virology*. 1990;175(2):485-99.
- Coslett GD, Holloway BP, Obijeski JF. The structural proteins of rabies virus and evidence for their synthesis from separate monocistronic RNA species. *J Gen Virol*. 1980;49(1): 161-80.
- Foley HD, McGettigan JP, Siler CA, Dietzschold B, Schnell MJ. A recombinant rabies virus expressing vesicular stomatitis virus glycoprotein fails to protect against rabies virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(26):14680-5.
- Franka R, Smith TG, Dyer JL, Wu X, Niezgodka M, Rupprecht CE. Current and future tools for global canine rabies elimination. *Antiviral Res*. 2013;100(1): 220-5.
- Hampson K, Coudeville L, Lembo T, Sambo M, Kieffer A, Attlan M, *et al*. Estimating the global burden of endemic canine rabies. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(4): e0003709.

Hollenberg CP, Gellissen G. Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. *Curr Opin Biotechnol.* 1997;8(5): 554-60.

Martínez L. Global infectious disease surveillance. *Int J Infect Dis.* 2000;4(4): 222-8.

Meslin FX, Fishbein DB, Matter HC. Rationale and prospects for rabies elimination in developing countries. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1994;187: 1-26.

Nagesha SN, Ramanjini Gowda PH, Ningaraju TM, Madhusudana SN, Deepak N, Mahadeva Swamy HM, Yogendra KN, Nagaraju T, Desai AS. Heterologous expression of CVS rabies virus glycoprotein gene in *Pichia pastoris*. *IJGEB.* 2010;1(1): 101-10.

Wiktor TJ, György E, Schlumberger D, Sokol F, Koprowski H. Antigenic properties of rabies virus components. *J Immunol.* 1973;110(1): 269-76.