**Maestría en Ciencias Biológicas**

**Área Microbiología**

**PEDECIBA-Biología**

# *Salmonella* como vector para el desarrollo de vacunas de mucosas contra enfermedades priónicas

**Lic. María Verónica Estévez Rego**

Tutor: Dr. Alejandro Chabalgoity

Cotutor: Dra. Lucía Yim

Abril 2012

Laboratorio de Investigación en Vacunas

Departamento de Desarrollo Biotecnológico

Instituto de Higiene, Facultad de Medicina

Universidad de la República

Tribunal:

Dr. Pablo Zunino

Dr. Gualberto González

Dr. Claudio Martínez-Debat

**Agradecimientos:**

**A mis tutores: Alejandro y Lucía**

**A Thomas Wisniewski, Fernando Goñi y su grupo de trabajo en la NYU**

**A los que colaboraron en el Campo Experimental del IH: Pablo Alonzo, Martín Breijo, Gustavo Sarroca, Roberto Alegre, Agustín Furtado, Emiliano D'Anatrio y Uruguaysito Benavides**

**A mis compañeros de LVR y del Dpto. de Desarrollo Biotecnológico**

**A mis familiares y amigos**

**¡Muchas Gracias!**

**RESUMEN**

Las enfermedades priónicas son desordenes neurodegenerativos infecciosos y fatales, caracterizados por una modificación estructural de la proteína prionica ($PrP^{c}$), en una conformación patológica ($PrP^{Sc}$) anormalmente plegada. Afectan tanto a poblaciones humanas como a animales y no hay tratamientos profilácticos o terapéuticos disponibles. El principal obstáculo para la vacunación es la tolerancia del sistema inmune al *prion*, el agente causante de la enfermedad. Estudios recientes en ratones sugieren que la inducción de inmunidad en mucosas mediante PrP expresado por una vacuna a base de *Salmonella* atenuada, es efectiva en superar la tolerancia al PrP y lleva a un retraso significativo o a la prevención de la enfermedad, induciendo inmunoglobulinas A y G, anti-PrP.

El objetivo de este trabajo fue avanzar en el estudio de la inmunización en mucosas mediante el uso de una cepa atenuada de *Salmonella enterica* expresando PrP de especies veterinarias de interés. Se seleccionaron ovejas y alces. Así, se buscó aportar información para el desarrollo de nuevas terapias profilácticas contra enfermedades priónicas y disminuir la probabilidad de contagio desde estas especies a poblaciones humanas.

Se construyeron plásmidos recombinantes portando los genes que codifican para la proteína priónica normal de alce u oveja, bajo control de los promotores $P_{nirB}$ o $P_{tac}$, en los vectores pTECH2 o pGEX-4T-1, respectivamente. Se realizó una construcción adicional reemplazando el gen del fragmento C de la toxina tetánica del vector pTECH2, por la fusión GST-PrP de la construcción en el vector pGEX-4T-1. Éstas construcciones fueron introducidas en la cepa atenuada *Salmonella* Typhimurium LVR01 (auxotrófica por una mutación en el gen *aroC*) para dar lugar a diversos vectores de vacunación por via oral. Las construcciones con el gen de la proteína priónica de oveja fueron evaluadas en ensayos de inmunogenicidad en ratones y ovinos. En el modelo murino se detectaron anticuerpos IgG en suero e IgA en heces, específicos contra PrP de oveja. Mientras que en el modelo ovino se detectaron niveles de anticuerpos IgG específicos a nivel sistémico. Estos resultados demuestran que es posible generar una respuesta inmune humoral sistémica contra PrP en especies de

interés veterinario mediante la inmunización por vía oral, y representan una contribución inicial al estudio de la inmunización en mucosas mediante el uso de *Salmonella* atenuada para el desarrollo de nuevas terapias profilácticas para enfermedades priónicas.

## Abreviaturas

APC _ célula presentadora de antígeno

APS _ persulfato de amonio

BSA _ seroalbúmina bovina

CD _ células dendríticas

CDF_células dendríticas foliculares

CJD_enfermedad de Creutzfeld Jakob

CWD_chronic wasting disease

DO _ densidad óptica

EEB_encefalopatía espongiforme bovina

EETs_enfermedades espongiformes transmisibles

ELISA_ ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

FAE_epitelio folicular asociado

GALT_tejido linfoide asociado al intestino

GST _ glutatión S-transferasa

iv _ intravenoso

LPS _ lipopolisacárido

LB_Luria Broth

LBA_Luria Broth Agar

MBM_harinas de carne y huesos

o/n _ toda la noche

PAMPs_patrones moleculares asociados a patógenos

pb _ pares de bases

PBS _ buffer fosfato salino

PCR_reacción en cadena de la polimerasa

PO _ peroxidasa

PrP_proteína resistente a proteasas

qRT-PCR_PCR cuantitativa en tiempo real

SDS _ dodecil sulfato de sodio

SNC_sistema nervioso central

SNE_sistema nervioso entérico

SSTT _ sistema de secreción tipo III

SPI_isla de patogenicidad de salmonella

TetC _ fragmento no tóxico C de la toxina tetánica

**INDICE**


| | Pág. |
|---|---|
| **1- Introducción** | **9** |
| **1.1 *Prion*** | **9** |
| **1.2 Las enfermedades espongiformes transmisibles** | **12** |
| **1.2.1 EETs animales** | **12** |
| **1.2.2 EETs humanas** | **19** |
| **1.3 Infección y patogénesis** | **23** |
| **1.4 Inmunoterapias contra prionosis** | **26** |
| **1.5 *Salmonella*** | **28** |
| **1.5.1 Infección por *Salmonella*** | **28** |
| **1.5.2 *Salmonella* atenuadas como vector** | **30** |
| **1.5.3 *Salmonella* atenuadas como vector para la expresión de antígenos heterólogos** | **31** |
| **2- Hipótesis de Trabajo** | **33** |
| **3- Materiales y Métodos** | **35** |
| **3.1 Condiciones de Bioseguridad** | **35** |
| **3.2 Métodos utilizados para la construcción de los vectores** | **35** |
| **3.2.1 Materiales** | **35** |
| **3.2.2 Análisis y manipulación de ADN** | **40** |
| **3.2.3 Análisis de la expresión de proteínas** | **49** |
| **3.2.4 Estabilidad de las construcciones** | **52** |
| **3.3 Métodos utilizados para la evaluación de la inmunogenicidad de los vectores *in vivo*** | **53** |
| **3.3.1 Inmunogenicidad de las construcciones de oveja en ratones C57BL/6** | **53** |
| **3.3.2 Ensayos preliminares de inmunización en ovejas** | **55** |

**3.4 Análisis estadístico** **57**

**4- Resultados** **58**

**4.1 Desarrollo de vectores de *Salmonella* que expresen PrP de alce u oveja** **58**

**4.2 Ensayo de inmunogenicidad de las construcciones de oveja en ratones** **72**

**4.3 Ensayos preliminares de inmunización en ovejas** **76**

**5- Discusión** **78**

**6- Conclusiones** **85**

**7- Referencias** **87**

**ANEXO** **100**

# 1. INTRODUCCION

Las enfermedades priónicas o encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs) son un grupo de desórdenes neurodegenerativos, fatales, caracterizados por un período de incubación largo, seguido de disfunciones neurológicas severas y rápidas, y de lesiones patológicas específicas en el sistema nervioso central (SNC). Estas lesiones incluyen un aspecto espongiforme típico de los tejidos del cerebro, una constante astrogliosis, y la acumulación como placas amiloides en el citoplasma de las células infectadas y en el espacio extracelular, de $PrP^{Sc}$ (PrP "*scrapie*"), una isoforma anormalmente plegada de la glicoproteína $PrP^{c}$ (PrP "celular").[1 2 3]

## ***1.1 Prion***

El estudio sobre la etiología de las enfermedades espongiformes trasmisibles sufrió varios cambios de dirección a lo largo del tiempo.

En una primera etapa, se las relacionó con virus, virus lentos o no convencionales, sin embargo, existían algunas características que diferenciaban al agente de estas enfermedades de los virus: nunca se encontró un ácido nucleico asociado a la infectividad, presentaban una alta resistencia a radiaciones, ácidos y bases fuertes, nucleasas y proteasas, y la no identificación de respuesta inmune en individuos enfermos, por lo que se denominaron agentes no convencionales[4].

Hacia fines de 1970 se elaboró una nueva hipótesis, dándole al agente causal la denominación de virino. Esta hipótesis consideraba que el agente estaría formado por un ácido nucleico que solo elaboraría replicas de sí mismo y se empaquetaría en una cubierta de proteínas del hospedero. Así se explicaría la resistencia a las nucleasas por la presencia de la cubierta de proteínas, la ausencia de respuesta inmune porque son proteínas del hospedero, la existencia de cepas, y la barrera interespecie porque se requería una proteína del hospedero. A pesar que el modelo parecía validar las condiciones del agente, fue descartado porque nunca se encontró un ácido nucleico[4].

La característica que era evidente desde el comienzo de las investigaciones era que el agente tenía al menos un componente, proteínas. Este concepto concluyó en la

propuesta de Stanley Prusiner en 1982, que le valió el Premio Nobel de Medicina en 1997, del término *prion* para definirlo como "partícula infecciosa pequeña, proteinácea, que resiste los procesos que inactivan ácidos nucleicos"[4]. Luego se abrevió como PrP (*protease resistant protein*) y el modelo suponía la ausencia del ácido nucleico. La hipótesis del *prion* elaborada por Prusiner considera que la isoforma $PrP^{c}$, es decir la proteína codificada por la célula normal de forma espontánea, sufriría un cambio conformacional que le otorgaría el carácter de resistencia a la degradación que se produce en las células y por tanto tiende a acumularse en las mismas.

La proteína priónica normal, $PrP^{c}$, es producida en las enfermedades priónicas a partir del gen del hospedero pero pasa por cambios conformacionales que la transforman en la forma asociada a la enfermedad, $PrP^{Sc}$.

El gen *PRNP* que codifica para la proteína priónica fue identificado en ratones infectados con "*scrapie*", la enfermedad priónica de ovejas. Es un gen de copia única, y la proteína es codificada por un solo exón. Además de este exón (exón 3), los genes *PRNP* en mamíferos contienen uno (humanos) o dos (oveja y ratón) exones no codificantes en su extremo 5'[5]. La región del promotor del gen de PrP humano está bien caracterizada; es rica en GC, contiene una caja CCAAT, y tiene sitios de unión a los factores de transcripción SP1, AP1 y AP2[6].

La proteína normal es una glicoproteína anclada a la membrana plasmática por un glicolípido fosfatidil-inositol[7]; es soluble en detergentes y sensible a la digestión por proteinasa K (figura 1). Es altamente expresada por células del sistema nervioso central y células linfoides, y está compuesta por aproximadamente 250 aminoácidos. Su dominio C-terminal presenta tres alfa hélices, dos de las cuales están unidas por un puente disulfuro, mientras que el dominio N-terminal alberga repeticiones de octapéptidos, dentro de los cuales se localizan histidinas que unen iones de cobre y manganeso[8]. Los roles del cobre y manganeso en la biología del *prion* son complejos; altos niveles de manganeso aumentan la infectividad del *prion*[9], mientras que su quelación extiende la sobrevida de ratones infectados por el *prion*[10]. La quelación del cobre también parecería tener efectos terapéuticos en la infección por priones[11].

No se conoce la función exacta de la proteína normal, pero numerosos trabajos sugieren que podría tener un rol en sistemas antioxidantes y metabolismo celular del cobre[12 13], actividad anti-apoptótica[14], y en el sistema nervioso podría tener un rol en la función sináptica[15 16].

A diferencia de $PrP^{C}$, $PrP^{Sc}$ es rica en hojas beta, insoluble en muchos detergentes, y resistente a la digestión por proteinasa K[17].

El mecanismo de conversión de $PrP^{C}$ a $PrP^{Sc}$ no está claro, pero sí se sabe que es $PrP^{Sc}$ quien cataliza el proceso. Se sugirieron dos mecanismos: un modelo defiende el plegamiento dirigido [18 19 20]donde $PrP^{Sc}$ exógeno interacciona con $PrP^{C}$ lo que genera un cambio conformacional hacia $PrP^{Sc}$, superando la barrera energética que normalmente prevendría la conversión espontánea. El segundo modelo propuesto sugiere que $PrP^{Sc}$ y $PrP^{C}$ están en un equilibrio termodinámico del cual $PrP^{Sc}$ puede ser reclutado a una forma más estable compuesta por varias moléculas $PrP^{Sc}$ precursoras[21 22].

La proteína anormal $PrP^{Sc}$ forma agregados de placas amiloides e induce la destrucción de las neuronas a través de mecanismos que aún no son claros. Las heridas neuropatológicas resultantes de las enfermedades espongiformes transmisibles incluyen vacuolas de gran tamaño en el parénquima cerebral lo que le da un aspecto de esponja al tejido, de allí el término de enfermedad espongiforme.

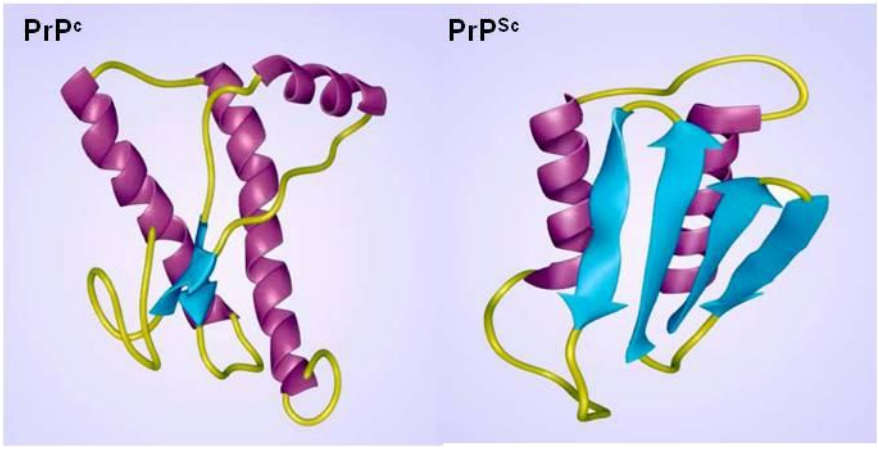


***Figura 1.*** Modelos de $PrP^{C}$ y $PrP^{Sc}$, (tomado de ref. 1).

## *1.2 Las enfermedades espongiformes transmisibles*

Las EETs afectan tanto a humanos como a animales. Pueden ser clasificadas según su etiología, como adquiridas (o infecciosas), heredadas (por la presencia de una mutación en el gen que codifica para la proteína priónica) o esporádicas (se desconoce el motivo por el que el prión adopta la conformación patológica).

Estas enfermedades siguen siendo un desafío terapéutico para los investigadores. Hay muchos aspectos de la biología del prión que permanecen poco claros y las herramientas de diagnóstico disponibles son significativamente menos sensibles y satisfactorias que las disponibles para otras enfermedades infecciosas.

### *1.2.1 EETs animales*

En animales, las EETs incluyen la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) en el ganado vacuno, "*chronic wasting disease*" (CWD) en cérvidos, y "*scrapie*" en ovejas[1], que continúan siendo de gran amenaza a nivel mundial. El *scrapie* es un problema potencial en los países ganaderos de América del Sur. La CWD alcanzó proporciones epidémicas entre poblaciones de ciervos y alces en 13 estados de Estados Unidos, dos provincias de Canadá, y recientemente en Corea, con datos experimentales que muestran que CWD es transmisible a primates[23].

Un concepto importante con respecto a las EETs como zoonosis es el de barrera interespecies[24] [25]. El agente de EET que causa enfermedad en algunas especies animales parece tener a veces gran dificultad en causar la enfermedad en otra especie, incluso en aquellas estrechamente relacionadas. Parecería que la susceptibilidad relativa de una especie a la infectividad del agente causante de la enfermedad proveniente de otra especie esté influenciada por una diferencia de unas pocas bases en el gen que codifica para la proteína priónica de la especie receptora, que le confiere resistencia o susceptibilidad a la transmisión del agente de EET[26]. La asociación de EEB con la nueva variante de la enfermedad Creutzfeldt-Jakob (CJDv) en humanos, transmitida a través del consumo de carne contaminada con el agente de la EEB, claramente indica que la barrera bovino-humano puede ser superada bajo condiciones naturales, por eso cualquier agente de EET debe ser considerado un patógeno

zoonótico humano potencial dependiendo de las rutas disponibles de introducción del agente.

Se puede afirmar que Uruguay es un país libre de encefalopatías espongiformes transmisibles que afectan a los animales, dentro de las que están incluidas la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) y el *scrapie*. En este sentido nuestro país ha sido evaluado por el Comité Científico Director de la Unión Europea, colocándolo en el grupo de países con menor nivel de riesgo en cuanto a EEB.: Nivel I. Uruguay desde la década de los 80' ha mantenido una política de no permitir la importación de animales, productos de origen animal de riesgo y material gen ético desde países con casos denunciados de EEB o *scrapie*. También se dispone de un Sistema de Emergencia Sanitaria respaldado con fondos suficientes para dar respuesta inmediata ante el evento de detección de estas enfermedades en el país.

***Scrapie***

El *scrapie* ("tembladera" en español) es una EET de ovinos y cabras. Es una enfermedad endémica en el Reino Unido por más de dos siglos, y ha sido descrita prácticamente en todo el mundo. La enfermedad aparece actualmente en forma natural en Europa, Asia, África y Norteamérica, incluyendo 29 estados de Estados Unidos. Con la importación de ovinos británicos también se introdujo en Australia, Kenya y Sudáfrica, pero el diagnóstico y sacrificio de los animales afectados permitió erradicar la infección en estos países. La enfermedad también se diagnosticó en ovejas en Rio Grande do Sul, Brasil[27].

Clínicamente, el *scrapie* está caracterizado por una progresión lenta y gradual de anormalidades neurológicas y dermatológicas. Los signos clínicos se pueden manifestar algunos meses o años luego de la exposición al agente causante de la enfermedad. Los síntomas tempranos incluyen pérdida de masa corporal, temblores y cambio en el comportamiento. También se desarrolla prurito lumbar, y los animales infectados frecuentemente se frotan contra objetos y mastican su piel compulsivamente, lo que le da el nombre a la enfermedad. Los signos clínicos

progresan gradualmente con desarrollo de ataxia y ocasionalmente ceguera[28] hasta llegar a la muerte del animal.

La infección de ovinos por los agentes de EET ocurre a través de la vía oral aunque se sugieren como rutas alternativas de infección la piel y las membranas mucosas dañadas[29 30 31]. El agente infeccioso está presente en el ambiente y es ingerido durante el pastoreo en pasturas contaminadas con *scrapie*[32 33 34]. Al contrario que la EEB en el ganado bovino, el *scrapie* es una enfermedad endémica que se transmite entre ovejas bajo condiciones naturales. Estudios epidemiológicos sugieren que el agente de *scrapie* se transmite horizontalmente tanto por contacto directo entre animales como a través de contaminación en el ambiente. A pesar de que nunca se encontró el agente en ninguna secreción o excreción de ovejas infectadas[35], no se excluyen niveles bajos del agente en leche, saliva, heces u orina de ovejas infectadas. La detección de PrPSc en tejido linfoide en la glándula mamaria[36], en las papilas renales[37] y en las glándulas salivales de ovejas infectadas[38] han cuestionado el posible rol de la leche, orina y saliva en la transmisión del *prion*. Investigaciones indican que el agente de scrapie puede ser transmitido a través de la sangre, aunque son necesarios grandes volúmenes de sangre para este tipo de transmisión[39]. La transmisión del agente de *scrapie* puede ocurrir también a través del lamido de los recién nacidos, de la placenta y otros materiales de las madres infectadas. Se ha detectado $PrP^{Sc}$ en la placenta[40 41 42 43] que se libera luego del parto. Así el agente se propaga en el ambiente causando transmisión horizontal eficiente a otras ovejas o cabras con genotipos de *prnp* susceptibles. Las crías de las ovejas infectadas tienen más probabilidad de ser infectadas por transmisión horizontal luego del parto que por transmisión vertical *in útero*[44].

La diversidad de los genotipos en codones específicos dentro del gen que codifica para la proteína priónica de oveja parece influenciar la susceptibilidad o resistencia a la transmisión de la enfermedad. Específicamente, variaciones de los aminoácidos en los codones 136, 154, y 171 en el gen de la proteína priónica de oveja, parecen estar asociados con la susceptibilidad al *scrapie*[45], con los alelos VRQ y ARQ siendo los más frecuentemente asociados con la enfermedad. El alelo ARR es asociado con la

resistencia a la enfermedad, y no hay casos de enfermedad natural en los homocigotas ARR/ARR.

Las enfermedades priónicas en ovinos son clasificadas como *scrapie* clásico y formas variantes recientemente descritas de *scrapie* atípico, principalmente relacionadas a la cepa Nor98 de *scrapie*[46 47]. El *scrapie* clásico comúnmente se desarrolla en los ovinos de 2 a 5 años de edad y es asociado con polimorfismos en los codones 171 y 136 del gen de la proteína priónica. Se caracteriza por los signos clínicos típicos del *scrapie* y por los cambios neuropatológicos espongiformes clásicos, y acumulación del *prion* en varios tejidos. El *scrapie* atípico asociado con la cepa Nor98 fue detectado en un relevamiento de ovejas noruegas y afecta principalmente a ovinos mayores con un genotipo distintivo[48 49]. El prurito característico se encuentra ausente en este tipo de *scrapie*, así como también los cambios neuropatológicos espongiformes, y el agente no parece estar presente fuera del sistema nervioso central. Esta forma de *scrapie* no parece ser tan transmisible como el *scrapie* clásico[50]. A pesar de la presencia del agente infeccioso en ovinos domésticos y la exposición de los humanos al agente por siglos, no ha habido evidencia epidemiológica o científica de la transmisión del *scrapie* a humanos[51]. Sin embargo, se ha logrado experimentalmente la transmisión del *scrapie* a otros primates, roedores y otras especies[52 53].

Sólo unos pocos estudios se enfocan en la patogénesis del *scrapie* en su hospedero natural. Aunque esta enfermedad se conoce hace siglos, se le ha puesto muy poca atención como enfermedad natural en ovinos y cabras, principalmente porque el impacto económico ha sido relativamente pequeño comparado con otras enfermedades en ovinos. La aparición de la encefalopatía espongiforme bovina le dio un nuevo impulso a la investigación en EETs[54]. El impacto económico de EEB no sólo fue mayor que el de *scrapie* sino que la conexión con CJDv en humanos también dio lugar a la preocupación en lo que respecta a la seguridad alimentaria[54].

Recientemente se realizó un estudio en nuestro país en una majada de ovinos Criollos del Parque Nacional de San Miguel (Depto. Rocha)[55]. Estos animales habitan la zona este del país, próximos a Brasil, país donde han sido diagnosticados casos clínicos de *scrapie*[27]. En el trabajo se estudió una muestra de ovinos Criollos Uruguayos (N=28)

para los codones 136 y 171 del gen PRNP que codifica para la proteína priónica de oveja. Los codones 136 y 171 son los mayores determinantes de la susceptibilidad al *scrapie*, mientras que el codón 154 juega un rol menor. Se analizaron las frecuencias genotípicas para los codones 136 y 171. Cinco genotipos diferentes fueron obtenidos, encontrándose en mayor frecuencia los genotipos de alta susceptibilidad: VQ/AQ= 0,39 y AQ/AQ= 0,29. El análisis de riesgo genético de esta majada según los genotipos obtenidos, reveló un 72% de animales muy susceptibles a la enfermedad en caso de manifestarse las condiciones ambientales propicias. En la actualidad se carece de pruebas rápidas que permitan el diagnóstico en la fase subclínica de la enfermedad. Ante esta situación el genotipado adquiere especial importancia como herramienta para la vigilancia epidemiológica. El conocimiento del riesgo genético de cada población, principalmente de aquellas poblaciones fronterizas (como es el caso de estos ovinos Criollos) permite implementar más y mejores controles para prevenir la aparición de *scrapie*.

***Encefalopatía Espongiforme Bovina***

La encefalopatía espongiforme bovina (también conocida como enfermedad de la vaca loca) es una EET del ganado bovino. Entre 1985 y 1986, se identificó un brote de muertes inusuales en diferentes regiones del Reino Unido[56] [57]. Las características clínicas y cambios neuropatológicos en el ganado afectado eran consistentes con una EET. Aún permanece incierto cómo surge la EEB como una entidad clínica. La hipótesis más probable incluye una conversión espontánea de la proteína normal PrPc a la forma anormal, o una transmisión entre especies del *scrapie* a través de alimentos contaminados con este agente. Se cree que la propagación de EEB entre el ganado es atribuible a la alimentación con "*meat and bone meal*" (MBM), presumiblemente productos derivados en parte de tejidos neurales o linforeticulares contaminados con el agente de EEB. Esta hipótesis es reafirmada por la alta incidencia de EEB entre los bovinos de leche más que los de carne, ya que estos son alimentados con MBM con más frecuencia[56]. Luego del reconocimiento de EEB en el Reino Unido, se tomaron medidas de control importantes incluyendo la prohibición de usar fuentes de proteínas

derivadas de rumiantes para su alimentación[58], lo cual resultó en un fuerte declive de EEB.

Se incentivó el seguimiento de CJD humana para identificar posibles cambios en el patrón de la enfermedad que pueda sugerir una asociación con la EEB epizoótica que estaba ocurriendo. Durante este período se identificaron varios casos de CJD con características atípicas, incluyendo aparición de la enfermedad y muerte a una edad inusualmente joven (edad media de muerte, 28 años) y cambios neuropatológicos caracterizados por múltiples placas amiloides rodeadas de vacuolas. Las propiedades de este agente de CJD eran similares a las del agente de EEB. La enfermedad se llamó nueva variante de CJD (CJDv)[59] [60]. Se propuso que la transmisión por la vía oral, presumiblemente por ingesta de productos cárnicos contaminados con el agente de EEB, era responsable de la transmisión a humanos[616263].

***Chronic Wasting Disease***

La reciente propagación de otra EET animal entre cérvidos en Norteamérica trajo consigo la preocupación sobre el potencial de esta enfermedad de transmitirse a humanos. La enfermedad del desgaste crónico (CWD) es una enfermedad priónica que afecta a cérvidos[64] [65] [66], y sólo se ha reportado en Norteamérica y en Corea del Sur [67] [68]. Se identificó en los años 60 entre ciervos en cautiverio en el norte de Colorado[69]; éstos provenían tanto de poblaciones salvajes como también de otras poblaciones en cautiverio. En 1978, la CWD fue reconocida como una nueva EET de cérvidos en cautiverio en Colorado por los patólogos Williams and Young [70]. Luego se reportó la misma enfermedad en alces en Wyoming [69]. Por dos décadas se creyó que CWD estaba limitada a esta región central de Estados Unidos. Sin embargo, en los últimos 10 años investigaciones acerca de CWD revelaron una distribución más amplia de la enfermedad. Grupos aislados de animales infectados se localizaron desde Utah hasta Nueva York y Virginia. En Canadá, se diagnosticaron casos de CWD en alces y ciervos en Saskatchewan y Alberta[71] [72].

El gen que codifica para PrP está muy conservado y sólo unos pocos aminoácidos difieren entre cérvidos[73] [74]. Sin embargo, existen polimorfismos específicos de las

especies que afectan la susceptibilidad a la infección con CWD. En los ciervos infectados naturalmente, la homocigosis de serina en el codón 225 del gen *prnp* parecería incrementar el riesgo de infección por CWD, ya que la probabilidad de que el animal infectado sea 225SS es 30 veces más que aquellos que son heterocigotos con fenilalanina (S/F) u homocigotos para ésta (FF) [75]. Los alces presentan polimorfismo en el codón 132 (M/L) del gen *prnp*, correspondiente al codón polimórfico 129 (M/V) en humanos. Los animales infectados con CWD poseen mayoritariamente 132MM y 132ML, comparado con controles sin infectar [74].

Se ha demostrado que el músculo esquelético alberga al agente de CWD[76]. Sin embargo, CWD no se ha transmitido exitosamente por vía oral a especies fuera de la familia Cervidae, lo que sugiere que existe una fuerte barrera entre especies para la conversión del PrP heterólogo. Se presume que depredadores salvajes se alimentan de carcasas infectadas por CWD, y millones de norteamericanos cazan ciervos y alces. No hay duda de que la población así como también otras especies, han estado expuestas al agente infeccioso a través del consumo de carne de cérvidos, en especial cuando se demuestra que el *prion* se aloja en el músculo. Sin embargo, no han habido brotes de EET humanas a gran escala en Colorado ni en Wyoming, donde CWD existió por décadas[77].

Otros estudios indirectos de la susceptibilidad humana a CWD también sugieren que el riesgo es bajo. Para estudiar la barrera entre especies humano-alce, Kong et al. inocularon el agente infeccioso de CWD de alce en ratones transgénicos que expresan PrP humano o PrP de alce. Mientras que los ratones transgénicos para PrP de alce desarrollaron la enfermedad 118-142 días luego de la inoculación, los ratones transgénicos para PrP de humano (129M) no desarrollaron ningún signo de EET hasta más de 756 días post-inoculación[78]. Sin embargo, los ratones tienen un período de vida limitado, y son necesarios más pasajes para detectar infectividad que pueda estar presente subclínicamente. Aunque se acumula evidencia indirecta que habría una barrera entre especies robusta para la transmisión de CWD a humanos[79], un estudio indica susceptibilidad a CWD por parte de primates no humanos. La inoculación intracerebral de monos ardilla (*Saimiri sciureus*) demostró transmisión exitosa de

CWD[80]. Sin embargo, las secuencias de *prnp* de los monos del nuevo mundo y de los humanos difieren bastante[81] lo que estaría indicando que la conversión de la proteína priónica humana no puede inducirse por la $PrP^{Sc}$ de CWD. Adicionalmente, el agente de CWD se ha encontrado en sangre, heces, orina y saliva de animales infectados[82 83 84], así como también un estudio reciente muestra que CWD es capaz de transmitirse con alta eficiencia por la vía nasal por medio de aerosoles entre ratones transgénicos que expresan PrP de ciervo[85]. Este es el primer hallazgo de la propagación de priones por la vía respiratoria, por esto la posibilidad de transmisión al humano debe ser monitoreada muy de cerca.

Hasta hace unos años había muy pocas técnicas disponibles para detectar la infectividad de CWD. Browning et al. desarrollaron el primer ratón transgénico que expresa el PrP de cérvidos[86]. Desde entonces se produjeron varios ratones transgénicos para PrP de cérvidos usando diferentes construcciones y secuencias[87 88 89]. El ratón transgénico provee una herramienta muy importante para investigaciones en CWD y otras EET, principalmente para estudios de transmisión entre especies.

### *1.2.2 EETs humanas*

Los humanos son susceptibles a determinadas formas infecciosas de EET, la más conocida es la nueva variante de la enfermedad Creutzfeldt-Jakob (CJDv), transmitida a través del consumo de carne contaminada con el agente de la EEB[90 91]. Otras formas incluyen al Kuru, transmitida por canibalismo en la tribu Fore en Nueva Guinea, la CJD iatrogénica, relacionada con ciertas prácticas quirúrgicas, y la "prionopatía sensible a proteasas" descrita más recientemente[2 92].

Las EETs humanas tienen un período de incubación muy prolongado pero una fase clínica corta, no es posible realizar un diagnóstico preclínico, lleva al daño masivo del cerebro y a la posterior muerte del individuo. Para cuando los síntomas se manifiestan, es muy tarde para una terapia[93].

La enfermedad de Creutzfeldt-Jakob se ha clasificado como esporádica (CJDs), familiar (CJDf), iatrogénica (CJDi), y variante (CJDv)[94]. La CJDs es rara, su etiología no está del

todo clara y no se han identificado aún causas exógenas. Las formas familiares de la enfermedad se heredan de manera autosómica dominante y co-segregan con mutaciones en el gen *PRNP* que codifica para la proteína priónica[95]. En cambio, los casos iatrogénicos son atribuidos a la intervención quirúrgica, trasplante de tejidos, o administración de hormonas derivadas de individuos fallecidos infectados[96]. En 1996, una nueva EET humana emergió en el Reino Unido y fue llamada nueva CJDv. Evidencia bioquímica e histopatológica sugiere que CJDv representa la transmisión de EEB al humano[90 91 97].

***CJD Esporádica***

La forma esporádica de CJD se trata de una demencia progresiva que usualmente lleva a la muerte dentro de los 12 meses de enfermedad. Los síntomas iniciales incluyen déficit cognitivo, perturbación del sueño, y anormalidades en el comportamiento. A medida que la enfermedad progresa se manifiestan otras características clínicas como ataxia y perturbaciones visuales[98]. Los pacientes terminales caen en un estado de mutismo antes de la muerte. Al contrario que otras enfermedades de demencia como Alzheimer y Parkinson, en las que la incidencia aumenta con la edad, el pico de incidencia es entre 55 y 65 años. De acuerdo a este criterio, CJDs puede subdividirse en varios grupos con distintas características genéticas, bioquímicas, neuropatológicas y clínicas. La forma típica de CJDs muestra homocigosis para metionina en el codón 129. Los pacientes con CJDs atípica muestran heterocigosis en el codón 129[99].

***Enfermedades Priónicas Humanas Hereditarias***

Este grupo de enfermedades priónicas puede ser subdividido en 3 fenotipos: CJDf, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, e insomnio familiar fatal. El modo de herencia en todas es autosómica dominante[100]. CJDf no está asociada a características clínicas distintivas, y puede ser diagnosticada sólo mediante la secuenciación del gen *PRNP*[101]. El síndrome de Gerstmann- Sträussler-Scheinker está caracterizado por una ataxia cerebelar lenta y progresiva, que comienza en la quinta o sexta década de vida, acompañada de un declive cognitivo[102]. Al contrario de otras enfermedades priónicas heredadas, el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker tiene características

neuropatológicas únicas que consisten en la propagación de placas de PrP multicéntricas[103]. Aunque se han descrito varias mutaciones en el gen *PRNP* para fenotipos del síndrome Gerstmann-Sträussler-Scheinker, las mutaciones P102L y G131V son las más encontradas. El insomnio familiar fatal se presenta como una disrupción profunda del ciclo normal de sueño-vigilia e insomnio[104]. Las características clínicas se deben a la mutación D178N combinada con la homocigosis para metionina en el codón 129.

***Enfermedades Priónicas Humanas Adquiridas***

***CJD Iatrogénica.***

CJDi es causada por exposición al *prion* durante intervenciones quirúrgicas como implantación de duramadre, trasplante de córnea, o tratamiento con extractos pituitarios de individuos infectados fallecidos[105]. CJDi es rara, con alrededor de 400 casos publicados[106]. La mayoría de los casos son causados por implantación de duramadre e inyección de la hormona de crecimiento pituitaria[93]. El sitio de inoculación del prión parece dictar el tiempo de incubación hasta el surgimiento de los síntomas de la enfermedad. La exposición cerebral directa y la implantación de duramadre contaminada con priones se asocian con tiempos de incubación cortos (16-28 meses), mientras que la exposición periférica resulta de tiempos más largos de incubación que van desde 5 a 30 años[107]. Además hay evidencias que sugieren que la ruta de exposición al *prion* influencia la presentación clínica de la enfermedad. Los casos de implante de duramadre o inyección de hormona de crecimiento presentan un fenotipo predominante de ataxia, mientras que en los casos donde los priones fueron introducidos directamente al SNC presentan demencia como síntoma inicial.

***CJD Variante.***

Este nuevo miembro de las enfermedades priónicas humanas fue reportado en 1996[57]. En los últimos años estudios neuropatológicos, bioquímicos y de transmisión han sostenido la preocupación de que CJDv representa la transmisión de EEB al humano[108] [90] [91]. Desde 1996 hasta 2001 la incidencia de CJDv en el Reino Unido se incrementó cada año, generando preocupación por una posible epidemia. Desde 2001, sin

embargo, la incidencia parece estar estabilizándose, y solo unos pocos países además del Reino unido han tenido casos aislados de CJDv[109 110]. CJDv lleva un perfil clínico patológico distintivo, esto ha facilitado el diagnóstico. Al contrario que CJDs, los pacientes de CJDv son mucho más jóvenes (edad promedio de muerte, 29 años). Además, las características iniciales y la duración de la enfermedad difieren entre CJDs y CJDv. Aproximadamente el 60% de los pacientes con CJDv presentan síntomas psiquiátricos y la duración de la enfermedad es de aproximadamente 14 meses, mientras que CJDs raramente se presenta con síntomas psiquiátricos tempranos y el curso de la enfermedad es rápido, aproximadamente 5 meses. Desde el punto de vista neuropatológico, el SNC de los pacientes con CJDv muestra placas de PrP, algunas de ellas rodeadas de vacuolas.

***CJD en Uruguay.***

Con el objetivo de describir la realidad de estas enfermedades en nuestro país, se llevó a cabo una revisión de casos clínicos de enfermedades priónicas diagnosticadas entre los años 1984 y 2005 inclusive, por parte del Instituto de Neurología de la Facultad de Medicina[111]. Se lograron identificar 28 casos de CJD en el Uruguay, 4 formas hereditarias y 24 formas esporádicas. La tasa de incidencia estimada desde 1995 hasta la fecha en que se realizó el estudio fue de 0.5 casos por 1.000.0000 de habitantes/año. Las características clínicas fueron similares a las descritas por la literatura. En Uruguay no se han descritos casos vinculados a la CJD variante ni a otros tipos de enfermedades priónicas que afectan a seres humanos. Existe desde el año 1996 una mayor preocupación por el tema lo que ha llevado a una mayor precisión diagnóstica. La CJD es de declaración obligatoria desde el año 1997, y desde 1999 existe una comisión de vigilancia epidemiológica cuyo funcionamiento ha sido irregular, aunque dadas las características de la enfermedad y la distribución de neurólogos en todo el país, es posible realizar un adecuado relevamiento y vigilancia epidemiológica de estas enfermedades en nuestro medio.

***1.3 Infección y Patogénesis***

La mayoría de las EET son adquiridas oralmente pero aún no es del todo claro cómo los agentes de EET cruzan la barrera mucosa luego de ser ingeridos. Se postulan varias posible rutas en el modelo ovino de patogénesis (figura 2): la primera es a través de las células M, un tipo celular presente en el epitelio folicular asociado (FAE) del intestino y amígdalas que se especializa en el transporte de macromoléculas y partículas a través del epitelio[112]. Se ha demostrado para priones, virus (reovirus, poliovirus, y VIH), y bacterias (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Salmonella* sp., *Yersinia* sp., *Campylobacter jejuni, Vibrio cholerae*, y *Shigella flexneri*) que las células M pueden ser usadas por patógenos para cruzar la barrera mucosa y acceder a los tejidos subyacentes[113]. El transporte de priones a través del epitelio intestinal puede ocurrir también de otras maneras. Las enzimas digestivas pueden degradar el agente infeccioso a moléculas más pequeñas de $PrP^{Sc}$ o incluso al núcleo resistente a proteasas de $PrP^{Sc}$. Esos fragmentos pequeños pueden formar complejos con otras proteínas como ferritina y ser endocitados en estructuras vesiculares por un mecanismo dependiente de ferritina[114]. Otra ruta posible puede ser a través de la captación directa por las células dendríticas que pueden abrir las uniones estrechas ("tight junctions") entre las células epiteliales insertando sus dendritas en el lumen intestinal y allí capturar antígenos[115 116]. Recientemente se postuló otra posible ruta de entrada del *prion* al lumen intestinal a través de endosomas de las células epiteliales[117].

Entre la absorción del *prion* y la manifestación de la enfermedad en el SNC, hay un período de incubación en el cual el *prion* ingerido es replicado y amplificado en el hospedero. La propagación del *prion* desde los sitios periféricos hasta el cerebro requiere la expresión de $PrP^{c}$ en los tejidos periféricos, y de un sistema inmune funcional. Luego de cruzar la barrera mucosa, $PrP^{Sc}$ se acumula en los tejidos linfoides asociados al intestino (GALT), placas de Peyer y amígdalas[118 119 120]. $PrP^{Sc}$ se acumula en las células dendríticas foliculares (CDF) en los centros germinales de los folículos B[121 122 123]. Estas células juegan un papel fundamental en la progresión de la enfermedad. Se han caracterizado a las CDF como fuentes de replicación del *prion* ya

que $PrP^{c}$, cuya expresión es requerida para la replicación de $PrP^{Sc}$[124], es altamente expresado por las CDF[125], y $PrP^{Sc}$ puede ser aislado de CDF en etapas tempranas luego de una infección periférica[126]. Además en modelos murinos, la falta de CDF funcionales ha sido asociada a resistencia a la neuroinvasión tras un desafío periférico[127]. Esta evidencia sugiere que las CDF son sitios clave para la replicación del *prion* y la acumulación durante la patogénesis de la EET. Otros componentes linfoides también tendrían su papel en la patogénesis de las EET. Las células B jugarían un rol indirecto en la propagación del prión. Estudios recientes sugieren que las células B son importantes en el mantenimiento de las CDF mediante secreción de factor de necrosis tumoral alpha (TNFα) y linfotoxina alfa/beta (LTα/β)[128]. Las células dendríticas y macrófagos también acumulan $PrP^{Sc}$ y estarían implicadas en la propagación del *prion*[129] [130], aunque se ha demostrado que los macrófagos son capaces de capturar el agente de *scrapie in vitro*[131] y de inactivarlo parcialmente[132], por lo que estarían participando más en la eliminación del *prion* que en su propagación.

La replicación de los agentes de EET en el GALT es crucial para la posterior neuroinvasión[133]. Sin embargo, la ausencia del agente replicativo en el GALT no previene por completo la neuroinvasión; en el ganado, la replicación del agente en los tejidos linfoides es mínima o está ausente[134].

Luego de la replicación en el GALT, el agente infeccioso es drenado a los nodos linfáticos. En las amígdalas $PrP^{Sc}$ es drenado al nodo retro faríngeo y en el GALT, en las placas de Peyer, a los nodos linfáticos mesentéricos. Aún no se sabe con claridad si la diseminación del agente de *scrapie* a través de los nodos linfáticos y la sangre ocurre por un transporte celular activo, o en estado libre, posiblemente unido a algún componente de la linfa o plasma. La infectividad de *scrapie* en la sangre ha sido sujeto de debate por mucho tiempo. Muchos estudios han fallado en demostrar infectividad en la sangre o en sus fracciones[135] pero con ayuda de técnicas más sensibles, $PrP^{Sc}$ se ha detectado en sangre de ovejas infectadas[136] [137].

Los primeros tejidos neurales en los que $PrP^{Sc}$ puede ser encontrado tanto en el *scrapie* como en la EEB es el sistema nervioso entérico (SNE) del intestino [123] [138]. El SNE comprende una amplia red de neuronas entéricas y glía, localizada en dos plexos en la

pared intestinal. Ambos plexos ganglionados son el plexo submucoso, localizado entre la mucosa y la capa muscular circular dentro de la submucosa, y el plexo mientérico, que se encuentra entre las capas musculares circular y longitudinal de la pared intestinal. El SNE también recibe inervaciones simpáticas y parasimpáticas[139]. Se ha encontrado que las neuronas entéricas expresan altos niveles de $PrP^{C}$, lo cual sugiere que el SNE tiene un rol fundamental en la propagación del prión ya que el cambio conformacional $PrP^{c}$ a $PrP^{Sc}$ es esencial en la enfermedad priónica. El agente de *scrapie* luego se propaga cranealmente y caudalmente por el SNE para involucrar otras partes del intestino delgado y luego también en el SNE del esófago, estómagos, intestino grueso y recto. Luego de la infección del SNE, los agentes de EET ascienden a través de las vías eferentes parasimpáticas y simpáticas al cerebro y la médula espinal[140].

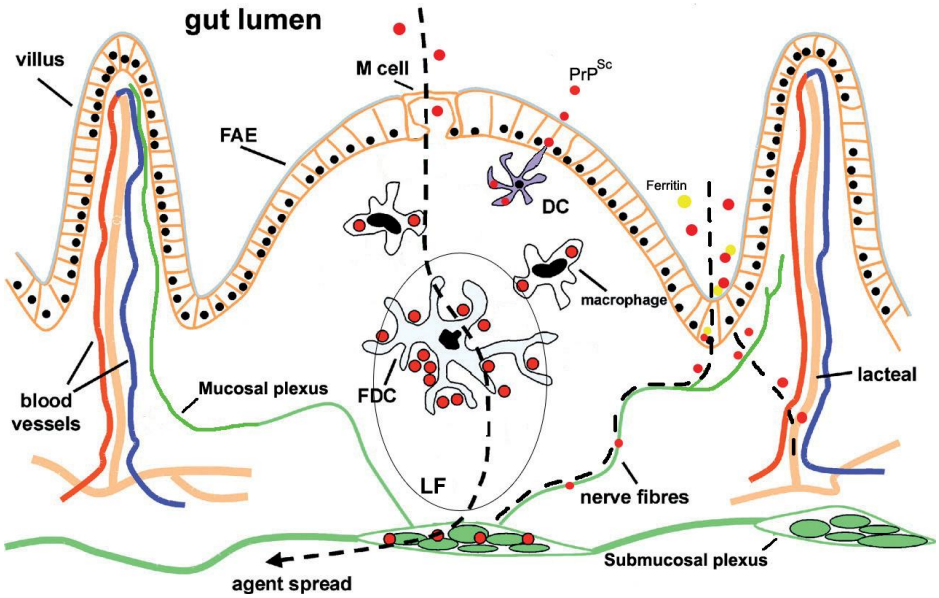


***Figura 2.*** Representación esquemática de las posibles rutas utilizadas por $PrP^{Sc}$ para atravesar la barrera epitelial intestinal y posterior invasión del sistema nervioso entérico (SNE). Luego de la ingestión, $PrP^{Sc}$ puede ser captada por las células M o células dendríticas y transportada a los folículos linfoides (LF) de las Placas de Peyer bajo el epitelio asociado al folículo (FAE). Dentro de los LF $PrP^{Sc}$ se acumula en las células dendríticas foliculares y es captado por macrófagos foliculares. Esta acumulación de PrPsc facilita la infección del plexo submucoso del SNE. Alternativamente, $PrP^{Sc}$ puede ser captado como complejo con ferritina y trancitosado por células epiteliales intestinales a través de la vía de ferritina. Una vez que $PrP^{Sc}$ cruza el epitelio intestinal, el plexo mucoso del SNE puede ser infectado seguido por la propagación neural al plexo submucoso. (Tomado de ref. 134).

### *1.4 Inmunoterapias contra prionosis*

Actualmente no hay una terapia efectiva para este grupo de enfermedades[141 142]. Aunque la incidencia de EEB y CJDv parece estar estable o en declive, el surgimiento de CWD resalta el hecho que las prionosis de animales de granja o salvajes todavía representan una amenaza para la salud pública. Por esto, existe la necesidad urgente de medidas preventivas y terapéuticas efectivas contra las enfermedades priónicas.

Como se describió anteriormente, los priones se aprovechan de las células inmunes para su propagación. Al tratarse de una proteína endógena $PrP^{c}$ no es percibida como peligrosa por parte del sistema inmune, y por lo tanto no genera una respuesta; incluso aunque $PrP^{Sc}$ presente un plegamiento diferente, no es suficiente para que se genere una respuesta inmune. De hecho, el sistema inmune está implicado en la replicación periférica del *prion* y en su posterior acceso al SNC.

No es posible detectar anticuerpos contra $PrP^{Sc}$ en animales infectados experimentalmente, o pacientes con EET[143]. Una posibilidad puede ser que la resistencia a proteasas del $PrP^{Sc}$ evita que sea procesado en péptidos por las células presentadoras de antígenos. Sin embargo, parecería que los priones tienen propiedades inmunogénicas normales: ratones *knock out* para el gen *Prnp* (*Prnp*0/0) son capaces de montar una respuesta inmune humoral normal cuando PrP*Sc* es inyectado con adyuvante de Freund[144 145] y no se observa respuesta inmune cuando ratones *Prnp*0/0 son inoculados con $PrP^{Sc}$ solo[124]. La mayoría de los estudios muestran que las funciones inmunes normales no son afectadas por la infección por $PrP^{Sc}$ [146], sugiriendo que la falta de respuesta al *prion* no está relacionada a una inmunodeficiencia inducida. La ausencia de una respuesta inmune específica es explicada por la ausencia de respuesta T específica, dada por la tolerancia inmunológica hacia los péptidos relacionados con PrP que pueden ser procesados por las células presentadoras de antígenos. La identificación de epítopes crípticos no tolerados podría ser de gran importancia para generar respuestas inmunes hacia las células infectadas.

Es necesario quebrar la tolerancia al PrP para obtener una respuesta inmune. Aunque esto continúa siendo un obstáculo en los intentos de vacunación, numerosos grupos intentan evaluar los beneficios potenciales de una respuesta inmune diseñando protocolos de inmunización fuertes y eligiendo los antígenos adecuados.

Actualmente no hay tratamiento que pueda revertir el progreso de la enfermedad en condiciones no experimentales. Se han hecho experimentos con sueros anti-PrP en modelos de cultivo como también inmunización activa y pasiva en modelos murinos. Estudios previos *in vivo* muestran que la infección con una cepa de $PrP^{Sc}$ lenta bloquea la expresión de otra cepa rápida y más virulenta de $PrP^{Sc}$, imitando la vacunación con un organismo vivo atenuado[147]. En estudios realizados en cultivos tisulares, sueros anti-PrP y fragmentos de unión a antígenos dirigidos a PrP, mostraron que inhiben la replicación del *prion*[148]. Otros estudios de inmunización pasiva confirman la importancia de la respuesta humoral, mostrando que el suero anti-PrP es capaz de prolongar el periodo de incubación de la enfermedad[149]. Sin embargo, no se ha encontrado que la inmunización pasiva sea efectiva en las etapas de síntomas clínicos de la enfermedad.

En el desarrollo de estrategias inmunoterapéuticas dirigidas a un antígeno propio, se busca diseñar vacunas que eviten la toxicidad auto-inmune[150 151]. Esta toxicidad está dada por la inmunidad celular mientras que la respuesta terapéutica está asociada a la inmunidad humoral. Además, la toxicidad puede estar relacionada también al inmunógeno y/o el adyuvante utilizado.

Por esto, para prevenir enfermedades priónicas, la inmunización en mucosas sería lo ideal ya que, además de ser la ruta oral la principal vía de entrada para las EET como CWD, scrapie, EEB y CJDv[152], este tipo de inmunización puede ser diseñada para inducir una respuesta inmune humoral evitando la toxicidad mediada por células vista en el desarrollo de otras vacunas[153].

Estudios previos sugieren que la inducción de inmunidad en mucosas mediante construcciones realizadas en nuestro laboratorio en los que PrP recombinante es expresada por *Salmonella* atenuada, es efectiva en superar la tolerancia al PrP y lleva a

un retraso significativo o a la prevención de la enfermedad, induciendo inmunoglobulinas A y G, anti-PrP[154]. Trabajos posteriores indican que las vacunas a base de *Salmonella* que expresan la proteína priónica logran impedir la infección en una proporción de ratones vacunados que desarrollaron respuestas inmunes óptimas[155]. Se logró la protección completa (100%) en ratones que desarrollaron altos niveles de IgA de mucosas e IgG en suero anti-PrP, sugiriendo que la IgA anti-PrP en la mucosa podría prevenir o reducir significativamente la entrada del *prion* a través del intestino, mientras que la IgG anti-PrP sérica podría inhibir la replicación sistémica de un inóculo reducido del *prion*[154 155].

### ***1.5 Salmonella***

El género *Salmonella* comprende un grupo amplio y diverso de patógenos gram-negativos, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae.* Son bacilos intracelulares facultativos, móviles y capaces de inducir desde gastroenteritis hasta un rango de enfermedades sistémicas, incluidas fiebre tifoidea y bacteriemia, tanto en humanos como en animales[156,157].

Actualmente se reconocen dos especies de *Salmonella,* S. *enterica* y *S. bongori.* Basados en los determinantes antigénicos de LPS, antígenos capsulares y flagelares, se definieron más de 2500 serovares de *Salmonella*[158]. Sin embargo, solo alrededor de 50 serovares son reconocidos como patógenos humanos o animales, y la mayoría pertenecen a la subespecie I de *S. enterica*. Mientras que algunos serovares presentan un rango de hospedadores restringido (por ejemplo, *Salmonella enterica* serovar Typhi que afecta exclusivamente al hombre), otros infectan una amplia gama de animales (por ejemplo, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium), produciendo enfermedades de diversas características y son capaces de causar enfermedad en humanos, habitualmente gastroenteritis[159].

#### ***1.5.1 Infección por Salmonella***

Las infecciones por *Salmonella* generalmente comienzan con la ingestión de microorganismos presentes en comida o agua contaminada. El pH ácido del estómago constituiría una primera barrera para la infección, ya que una reducción del pH

estomacal disminuye la dosis de infección. Sin embargo, *Salmonella* es capaz de sobrevivir en ambientes con pH ácido. Luego de entrar al intestino delgado, *Salmonella* debe atravesar la capa de mucus intestinal antes de adherirse a células del epitelio intestinal[157]. Una vez allí, debe atravesar este epitelio para ingresar al organismo. *Salmonella* cuenta con diferentes estrategias para atravesar esta barrera. Una de ellas es invadir células M en las Placas de Peyer[160]. A pesar de no ser fagocíticas, las células M internalizan a las *Salmonellas* en un proceso llamado macropinocitosis o endocitosis mediada por bacterias. Luego de la adherencia de *Salmonella* a la célula M, la membrana de la misma presenta elongaciones (*ruffles*) que rodean a la bacteria y finalmente la internalizan[161 162 163]. Otra estrategia es la invasión de células epiteliales. El proceso mediante el cual *Salmonella* es internalizada por los enterocitos es igual al descrito en el caso de infección de células M e involucra al sistema de secreción tipo III (SSTT) de la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* (SPI1), provocando la desaparición de las vellosidades, la formación de *ruffles* y macropinocitosis de la bacteria[164 165]. *Salmonella* también pude ser capturada por células dendríticas $CD18^{+}$[166]. Estas introducen sus dendritas entre los enterocitos, abriendo las uniones estrechas entre ellos. Las dendritas son proyectadas hacia la cara luminal del epitelio intestinal donde atrapan a las bacterias. Esta ruta alternativa permite la diseminación sistémica ya que las células dendríticas cargadas de bacterias se trasladan hacia los nódulos linfáticos.

Luego del pasaje a través del epitelio intestinal las bacterias deben evitar la muerte por células fagocíticas luego de la internalización. *Salmonella* ha desarrollado dos tipos de interacción con los macrófagos: por un lado es capaz de sobrevivir dentro de la vacuola fagocítica y por otro induce la apoptosis del macrófago en una importante proporción de células[163]. Esto le permite la diseminación local y sistémica y la inducción de inflamación local que lleva al reclutamiento de células del sistema inmune, amplificando así la infección.

Una vez internalizada, *Salmonella* permanece dentro de la vacuola. Los microorganismos que se replican dentro de la vacuola de internalización han desarrollado diferentes estrategias para sobrevivir en un ambiente hostil y cambiante,

caracterizado por tener un bajo contenido de nutrientes, un pH que disminuye progresivamente y concentraciones crecientes de péptidos antibacterianos y enzimas lisosomales, a medida que el endosoma madura a lisosoma. Se reconocen dos estrategias principales y *Salmonella* utiliza ambas, reguladas por la isla de patogenicidad 2 de *Salmonella* (SPI2): la adaptación y resistencia al medio hostil y la alteración de la biogénesis de la vacuola[167 168].

Durante la infección, *Salmonella* permanece mayoritariamente dentro de fagocitos mononucleares, que sirven tanto como vehículo para la diseminación extraintestinal y como sitio protegido para la replicación intracelular[169]. Por ello, la capacidad de sobrevivir dentro del fagocito es un requerimiento esencial para la virulencia de *Salmonella*.

### *1.5.2 Cepas de Salmonella atenuadas como vector*

Las cepas de *Salmonella* son fácilmente manipuladas genéticamente y puede expresar antígenos heterólogos de otros patógenos de origen tanto bacteriano como eucariota[166]. Mutantes atenuadas de *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S.* Typhi) y serovar Typhimurium (*S.* Typhimurium) han sido extensamente estudiadas primero como vacunas contra la salmonellosis y luego como vectores vivos de vacunación, expresando antígenos bacterianos, virales, protozoarios y priónicos, en estudios clínicos y preclínicos[170].

Dentro de los tipos de *Salmonellas* atenuadas más estudiadas están las auxótrofas. Las cepas *aro* de *Salmonella* son mutantes genéticamente definidas, con mutaciones en uno o más genes involucrados en la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos y han sido construidas tanto en *S.* Typhi como Typhimurium. Estas mutantes atenuadas resultan inmunogénicas en varias especies animales. Llevan a cabo una replicación limitada *in vivo* y son eliminadas de los tejidos luego de un par de semanas, dejando al hospedador inmune frente a una infección con la cepa silvestre, induciendo una buena respuesta humoral y celular. Además, resultan seguras tanto en individuos inmunocompetentes como en condiciones experimentales de inmunosupresión[171 172].

Otro ejemplo de mutantes auxotróficas lo constituye las que tienen deleciones en la vía de síntesis de purinas, *pur*. Sin embargo, mutantes *purA* o dobles mutantes *purA aroA* son pobremente inmunogénicas en ratón. Como alternativa están las dobles o triples mutantes *aro* y las que combinan mutaciones *aro* con deleciones en el gen *htrA*, gen que codifica para proteínas de estrés por calor, lo cual hace que *Salmonella* se vuelva sensible a la muerte oxidativa provocada por los macrófagos. Las dobles mutantes *aro htrA* son excelentes vacunas orales en ratón y son seguras en animales y en humanos[171 172].

### *1.5.3 Cepas de Salmonella atenuadas como vector para la expresión de antígenos heterólogos*

Las cepas de *Salmonella* atenuadas han sido bien caracterizadas en cuanto a su uso como transportadores de antígenos heterólogos, debido a su capacidad de generar respuestas inmunes tanto humorales como celulares y memoria inmunológica a largo plazo contra antígenos propios y heterólogos[173].

El desarrollo de *Salmonellas* atenuadas como vehículo para la liberación de antígenos heterólogos está basado en que durante la infección por *Salmonella*, todos los antígenos bacterianos y también los antígenos exógenos transportados, son liberados en las células presentadoras de antígeno (APC), como macrófagos y células dendríticas que son los blancos naturales de *Salmonella*, y presentados al sistema inmune. Así, *Salmonella* genera una fuerte respuesta inmune dada por los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) presentes en la bacteria, como LPS, CpG bacteriana, o lipoproteínas bacterianas, que estimulan a las APC a madurar y migrar a los órganos linfoides secundarios para iniciar una respuesta adaptativa. De esta manera los PAMPs derivados de *Salmonella* amplifican la respuesta inmune contra el antígeno heterólogo, actuando como adyuvante[174]. La habilidad de *Salmonella* de disparar respuestas inmunes de anticuerpos y citotóxicas tanto contra sus propios antígenos como contra el antígeno heterólogo que expresa, hace a este microorganismo atractivo para su uso en vacunas multivalentes. La bacteria recombinante puede ser administrada tanto por vía sistémica como en mucosas, para generar fuertes respuestas inmunes locales y sistémicas. A pesar de que la ruta oral ha sido la vía más

usada para la inmunización en mucosas, las rutas intranasal , intra-vaginal e intra-rectal también han sido usadas con algo de éxito[175]. En muchos casos se ha demostrado que cepas recombinantes de *Salmonella* pueden brindar protección contra salmonelosis y contra el patógeno del cual deriva el antígeno heterólogo.

En la mayoría de los casos la expresión de antígenos heterólogos en *Salmonella* se logra transformando la cepa bacteriana con un plásmido multicopia que codifica para el antígeno de interés bajo el control de un promotor procariota. A veces el uso de plásmidos de alto número de copias puede mejorar la inmunogenicidad de la vacuna[176]. Sin embargo, bajar el número de copias del plásmido resulta en un aumento de la estabilidad de la construcción y en la reducción de la expresión del antígeno heterólogo a niveles no tóxicos[177]. La carga metabólica que significa la expresión de una proteína foránea puede generar una presión selectiva en la segregación del plásmido. La mayoría de los plásmidos que se usan contienen un marcador de resistencia a antibiótico para su mantenimiento en el crecimiento en cultivo, pero la inestabilidad plasmídica puede surgir una vez que la bacteria está creciendo dentro de los tejidos en ausencia de la presión del antibiótico, lo que resulta en el desarrollo de la población bacteriana que ya no contiene el plásmido. La inestabilidad plasmídica durante la replicación *in vivo* provoca bajos niveles de expresión del antígeno clonado e inmunogenicidad pobre. Por otro lado, la expresión elevada y desregulada de antígenos foráneos puede resultar tóxica para la bacteria, llevando también a la selección de bacterias sin plásmido.

El uso de promotores inducibles *in vivo* fue propuesto como una manera de asegurar que la expresión de las proteínas recombinantes se vea incrementada una vez que la bacteria llegue a los lugares apropiados en los tejidos. Así la expresión del antígeno se mantiene mínima hasta que la bacteria recibe el estímulo apropiado *in vivo*, mejorando la estabilidad plasmídica. Uno de los más usados y con más éxito para dirigir la expresión de antígenos recombinantes derivados de bacterias, virus y parásitos es el promotor de *nirB* (nitric oxide reductase) de *E. coli*, activado en condiciones anaeróbicas[178 179].

# 2. HIPOTESIS DE TRABAJO

Trabajos previos de nuestro laboratorio y colaboradores, han demostrado que usando salmonellas vivas atenuadas como vector para PrP en modelos murinos es posible inducir inmunidad protectiva por vía oral quebrando la tolerancia al PrP. La infección oral es la principal ruta de transmisión del *prion* en muchas prionosis, y es por tanto central contar con métodos que permitan generar niveles de IgA secretoria suficientes como para prevenir la entrada del $PrP^{Sc}$ antes de que entre en contacto con el $PrP^{c}$. En el presente trabajo evaluamos la hipótesis de que también es posible inducir respuesta inmune en mucosas en especies de interés veterinario, alce y oveja, y quebrar la tolerancia al PrP, y así evaluar la capacidad de utilizar la ruta oral para la inmunización efectiva de estas especies.

Este proyecto se realizó en colaboración con el Dr. Thomas Wisniewski y su equipo de trabajo en el Departamento de Neurología de la Universidad de Nueva York. En Norteamérica, la emergencia de la enfermedad de CWD en alces trae consigo el problema potencial de su transmisión a poblaciones humanas así como también a otras especies de animales. Por eso fue seleccionada esta especie, alce, para su estudio en este trabajo. Las construcciones a base de salmonellas vivas atenuadas que expresan PrP de alce fueron realizadas en nuestro laboratorio, mientras que los ensayos *in vivo,* tanto en el modelo murino como en la especie destino, están siendo evaluados por nuestros colaboradores en instalaciones especiales en Estados Unidos.

Por otro lado, en este trabajo también evaluamos la inmunización en ovinos, ya que la enfermedad de *Scrapie* es un problema potencial en países ganaderos de América del Sur. Se han diagnosticado casos de *Scrapie* en Rio Grande do Sul, Brasil. Además, existe un estudio reciente en nuestro país en donde se analizan las frecuencias genotípicas de los codones asociados a esta enfermedad, en una majada de ovinos Criollos de Rocha, el cual reveló un alto porcentaje de animales susceptibles a desarrollar la enfermedad en caso de darse las condiciones ambientales propicias.

## *OBJETIVOS*

### ***Objetivo general***

Evaluar el uso de *Salmonella* atenuada como vector para el desarrollo de vacunas de mucosas contra enfermedades priónicas en especies de interés veterinario (alce y oveja).

### ***Objetivos específicos***

***1. Desarrollar vectores de Salmonella que expresen el gen prnp de alce y oveja.***

En este trabajo nos planteamos desarrollar vectores de *Salmonella,* que produzcan la proteína priónica de alce u oveja para su evaluación inicial en modelos murinos y posteriormente en especies destino.

***2. Evaluar la inmunogenicidad de las construcciones con el gen prnp de oveja en el modelo murino.***

En este punto pretendemos evaluar la respuesta inmune generada en el modelo murino usando las construcciones que expresan PrP de oveja administradas por vía oral.

***3. Ensayos preliminares de inmunización en ovejas.***

La mayoría de los estudios recientes en EETs usan ratones transgénicos, y muy poco se ha trabajado en el huésped natural. Nos planteamos usar las construcciones que expresan PrP de oveja para realizar un ensayo preliminar de inmunización en ovejas *naïve* como forma de evaluar la utilización de la ruta oral para la inmunización efectiva de esta especie de interés veterinario.

# 3. MATERIALES Y METODOS

## 3.1 Condiciones de Bioseguridad.

Se trabajó tomando las precauciones necesarias para la manipulación de cepas de *Salmonella* expresando la proteína PrP recombinante. Las cepas de Salmonella atenuadas que se utilizaron se consideran inocuas (nivel de riesgo 1), pero como medida general se las manejo como patógenos de nivel 2.

Se utilizó ropa protectora, bata, guantes, tapabocas y gorros desechables en los ensayos de experimentación *in vivo*. Para los ensayos en ratones se trabajó en cámara de flujo laminar clase II. Para el ensayo en ovinos se construyó en el campo experimental del Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, la infraestructura necesaria para llevar a cabo el ensayo en condiciones óptimas, la cual consta de tres compartimentos de tamaño apropiado para albergar 5 ovinos cada uno. Las instalaciones presentan una superficie lisa que puede ser lavada fácilmente y desagües para el lavado hacia una cámara o pozo.

Los restos de cultivos siempre se eliminaron mediante autoclavado durante 20 min a 121 grados celsius. Los residuos sólidos producidos por los animales se eliminaron como desechos biológicos en bolsas adecuadas, y las superficies se descontaminaban y lavaban con hipoclorito de sodio con 20g de cloro libre por litro (2%). Los instrumentos también son descontaminados con hipoclorito de sodio 2% durante 1 hora y enjuagados con agua antes de tratarlos en el autoclave durante 20 min a 121 grados celsius.

## 3.2 Métodos utilizados para la construcción de los vectores.

### *3.2.1 Materiales*

#### *Cepas bacterianas*

Las cepas de *S.* Typhimurium utilizadas fueron: LVR01, atenuada a través de una mutación en el gen *aroC,* y SL5338 (r-m+) (tabla 1). Se utilizó la cepa de *Escherichia coli* DH5α para obtener las construcciones. Una vez verificadas las construcciones por

restricción y secuenciación se electroporaron en la cepa destino *S*. Typhimurium LVR01, previo pasaje por la cepa *S*. Typhimurium SL5338 que fue usada como cepa intermedia para modificar los plásmidos según el sistema de restricción/modificación de *Salmonella*.

Las cepas bacterianas fueron crecidas de forma rutinaria en Luria Broth (LB) o LB agar (Sigma), agregándose cuando fue necesario 100 μg/ml de ampicilina o 50μg/ml de cloranfenicol.

***Plásmidos***

Los vectores utilizados se muestran en la tabla 1. Se utilizó la aproximación antes realizada en ratones, en donde se usa el vector pTECH2, el cual permite la expresión de copias múltiples en tándem de un antígeno como fusión al fragmento C no tóxico de la toxina tetánica (TetC)[180] bajo control del promotor $P_{nirB}$ inducible *in vivo.* Para mejorar la expresión de la proteína PrP de alce, seleccionamos el vector pGEX-4T-1 (GE Healthcare Life Sciences[181]), que permite la expresión de la proteína clonada como fusión a glutatión S-transferasa (GST) en su extremo N-terminal, bajo control del promotor $P_{tac}$ inducible por IPTG y el represor *lacIq*. También en busca de mejorar la expresión de la proteína PrP de alce se utilizó el vector pBAD22[182] el cual es un vector de expresión inducible por arabinosa bajo control del promotor $P_{BAD.}$ Los tres vectores elegidos poseen el origen de replicación del plásmido pBR322, lo que limita su número de copias a unas 20/célula aproximadamente. En otro intento de mejorar la expresión de la proteína PrP, utilizamos el plásmido pRARE (Merck[183]) que contiene los genes de tRNAs para seis codones raros, usado para aumentar la expresión de proteínas eucariotas que contienen codones raramente usados en *E. coli* o *Salmonella*. Además, este plásmido posee el origen de replicación *P15Aori* compatible con el que porta el pTECH2.

**Tabla 1.** Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este trabajo.

| **CEPAS** | **Características relevantes** | **Referencias** |
|---|---|---|
| ***E.coli*** | | |
| **DH5α** | F$^-$ *endA1 hsdR17 supE44 thi1 recA1 gyrA relA1* Δ*(lacZYA-argF)* U169, (Φ80*lacZ*ΔM15) | 184 |
| ***S.* Typhimurium** | | |
| **LVR01** | *aroC* | 185 |
| **SL5338** | *galE*, r$^-$ m$^{+.}$ | 186 |
| **PLASMIDOS** | **Características relevantes** | **Referencias** |
| **pTECH2** | vector de expresión procariota, promotor P*nirB* fusion a TetC. Amp$^R$ | 180 |
| **pBAD22** | vector de expresión inducible por arabinosa, promotor $P_{BAD}$ Amp$^R$ | 182 |
| **pGEX-4T-1** | Vector de expresión inducible por IPTG, promotor $P_{tac}$ fusion a GST, Amp$^R$ | 181 |
| **pRARE** | Cm$^R$ tRNAs para seis codones raros: AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA *P15Aori* | 183 |
| **pLVR12** | elkPrP clonado en pTECH2, fusionado a TetC, bajo control de PnirB, AmpR | Este trabajo |
| **pLVR13** | sheepPrP clonado en pTECH2, fusionado a TetC, bajo control de PnirB, AmpR | Este trabajo |
| **pLVR14** | elkPrP doble copia clonado en pTECH2, fusionado a TetC, bajo control de PnirB, AmpR | Este trabajo |
| **pLVR15** | sheepPrP doble copia clonado en pTECH2, fusionado a TetC, bajo control de PnirB, AmpR | Este trabajo |

| | | |
|---|---|---|
| **pLVR16** | elkPrP clonado en pBAD22, bajo control del promotor PBAD, inducible por arabinosa, AmpR | Este trabajo |
| **pLVR17** | elkPrP clonado en pGEX-4T-1, bajo control del promotor Ptac, inducible por IPTG, AmpR | Este trabajo |
| **pLVR18** | sheepPrP clonado en pGEX-4T-1 bajo control del promotor Ptac, inducible por IPTG, AmpR | Este trabajo |
| **pLVR19** | elkPrP fusionado a GST, bajo control de PnirB, AmpR | Este trabajo |
| **pLVR20** | sheepPrP fusionado a GST, bajo control de PnirB, AmpR | Este trabajo |

***Secuencias de los genes de PRNP de alce y oveja***

Las secuencias completas de los genes que codifican para PrP de alce o de oveja fueron obtenidas de la base de datos de NCBI.

**ELK PRNP (Cervus elaphus) (GenBank accession number: Y09761.1) alelo M**

ATGGTGAAAAGCCACATAGGCAGCTGGATCCTAGTTCTCTTTGTGGCCATGTGGAGTGACGTGG
GCCTCTGCAAGAAGCGACCAAAACCTGGAGGAGGATGGAACACTGGGGGGAGCCGATACCCGGG
ACAGGGAAGTCCTGGAGGCAACCGCTATCCACCTCAGGGAGGGGGTGGCTGGGGTCAGCCCCAT
GGAGGTGGCTGGGGCCAACCTCATGGAGGTGGCTGGGGTCAGCCCCATGGTGGTGGCTGGGGAC
AGCCACATGGTGGTGGAGGCTGGGGTCAAGGTGGTACCCACAGTCAGTGGAACAAGCCCAGTAA
ACCAAAAACCAACATGAAGCATGTGGCAGGAGCTGCTGCAGCTGGAGCAGTGGTAGGGGGCCTC
GGTGGCTACATGCTGGGAAGTGCCATGAGCAGGCCTCTTATACATTTTGGCAATGACTATGAGG
ACCGTTACTATCGTGAAAACATGTACCGTTACCCCAACCAAGTGTACTACAGGCCAGTGGATCA
GTATAATAACCAGAACACCTTTGTGCATGACTGTGTCAACATCACAGTCAAGCAACACACAGTC
ACCACCACCACCAAGGGGGAGAACTTCACCGAAACTGACATCAAGATGATGGAGCGAGTTGTGG
AGCAAATGTGCATCACCCAGTACCAGAGAGAATCCGAGGCTTATTACCAAAGAGGGGCAAGTGT
GATCCTCTTCTCCTCCCCTCCTGTGATCCTCCTCATCTCTTTCCTCATTTTTCTCATAGTAGGA
TAG

**SHEEP PRNP (Ovis aries) (GenBank accession number: AJ567988) alelo VRQ**

ATGGTGAAAAGCCACATAGGCAGTTGGATCCTGGTTCTCTTTGTGGCCATGTGGAGTGACGTGG
GCCTCTGCAAGAAGCGACCAAAACCTGGCGGAGGATGGAACACTGGGGGGAGCCGATACCCGGG
ACAGGGCAGTCCTGGAGGCAACCGCTATCCACCTCAGGGAGGGGGTGGCTGGGGTCAGCCCCAT

GGAGGTGGCTGGGGCCAACCTCATGGAGGTGGCTGGGGTCAGCCCCATGGTGGTGGCTGGGGAC
AGCCACATGGTGGTGGAGGCTGGGGTCAAGGTGGTAGCCACAGTCAGTGGAACAAGCCCAGTAA
GCCAAAAACCAACATGAAGCATGTGGCAGGAGCTGCTGCAGCTGGAGCAGTGGTAGGGGGCCTT
GGTGGCTACATGCTGGGAAGTGTCATGAGCAGGCCTCTTATACATTTTGGCAATGACTATGAGG
ACCGTTACTATCGTGAAAACATGTACCGTTACCCCAACCAAGTGTACTACAGACCAGTGGATCA
GTATAGTAACCAGAACAACTTTGTGCATGACTGTGTCAACATCACAGTCAAGCAACACACAGTC
ACCACCACCACCAAGGGGGAGAACTTCACCGAAACTGACATCAAGATAATGGAGCGAGTGGTGG
AGCAAATGTGCATCACCCAGTACCAGAGAGAATCCCAGGCTTATTACCAAAGGGGGGCAAGTGT
GATCCTCTTTTCTTCCCCTCCTGTGATCCTCCTCATCTCTTTCCTCATTTTTCTCATAGTAGGA
TAG

### *Cebadores*

Los cebadores diseñados para las reacciones de PCR fueron comprados en IDT y Operon. Los cebadores liofilizados fueron reconstituidos en buffer TE pH 7 a una concentración 100 μM (sol. madre) y se mantuvieron a –20ºC. La solución de trabajo fue de 10 μM. Los cebadores fueron especialmente diseñados para contener sitios de corte para enzimas de restricción en sus extremos, a fin de permitir el clonado direccional de los fragmentos de PCR. También se diseñaron cebadores específicos para la secuenciación de los insertos en cada construcción.

***Tabla 2.*** Cebadores usados en este trabajo.

| Nombre | Secuencia (5'-3') | Usos | Sitio de restricción (5'-3') |
|---|---|---|---|
| **ELK PRP rev** | TAG**AAGCTT**TCCTACTATGAGAAA AATGAGG | Clonado<br>pLVR12<br>pLVR13<br>pLVR16<br>pLVR19<br>pLVR20<br>RealTime PCR | *Hind*III (AAGCTT) |
| **ELK PRP for** | TAG**TCTAGA**ATGGTGAAAAGCCA CATAGGCAG | Clonado<br>pLVR12<br>pLVR13<br>pLVR16<br>RealTime PCR | *Xba*I (TCTAGA) |
| **GST5** | TAG**AGATCT**AGGAGAGTATTCAT GTCCCCTATACTAGG | Clonado<br>pLVR19<br>pLVR20 | *Bgl*II (AGATCT) |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **pGEXelkF** | TAG**GAATTC**TCCTACTATGAGAAA AATGAGG | Clonado pLVR17 pLVR18 | *Eco*RI (GAATTC) |
| **pGEXelkR** | TAG**CTCGAG**ATGGTGAAAAGCCA CATAGGCAG | Clonado pLVR17 pLVR18 | *Xho*I (CTCGAG) |
| **PnirF** | AGTGCCACCTGACGTCTAAG | Secuenciación | |
| **Ptech for** | ACTTCGTTCCGACCGATGAAGG | Secuenciación | |
| **Ptech rev** | CCAGGACCCAACGCTGCCCG | Secuenciación | |
| **pGEX5** | CCAGCAAGTATATAGCATGGCC | Secuenciación | |
| **pGEX3** | TGCTCCCGGCATCCGCTTAC | Secuenciación | |
| **pGEXelkF2** | TAGCTCGAGATGGTGAAAAGCCA CATAGGCAG | Secuenciación | |
| **pGEXelkR2** | TAGGCGGCCGCTCCTACTATGAGA AAATGAGG | Secuenciación | |
| **icdA F** | TGGTATCGGTGTTGATGTCACTC | RealTime PCR | |
| **icdA R** | CATCCTGGCCGTAAACCTGTGTG | RealTime PCR | |

En negrita se destacan los sitios de restricción agregados a los cebadores para el clonado direccional de los fragmentos de ADN. Nótese que dado que el comienzo y final de los genes *prnp* de alce y oveja son idénticos (ver alineamiento en ANEXO), los mismos cebadores fueron adecuados para amplificar uno u otro gen.

### *3.2.2 Análisis y manipulación de ADN*

Todas las técnicas usadas se basaron en protocolos estándar de laboratorio (Sambrook *et al*. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2001) Para la preparación y purificación de ADN (incluyendo la purificación a partir de geles de agarosa) se utilizaron los siguientes kits de Qiagen: QIAquick PCR Purification Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, y QIAprep Spin Miniprep Kit.

#### *Electroforesis en geles de agarosa*

El ADN fue analizado de forma rutinaria en geles de agarosa (Invitrogen) al 0.8% o 1.5% en buffer TBE 0.5x. Las bandas se visualizaron tiñendo con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) (Sigma). El tamaño y concentración de los fragmentos de ADN fue estimado

por comparación con un estándar de peso molecular (1kb o 100bp DNA Ladder Plus, Fermentas) corrido en paralelo con la muestra.

***Amplificación de ADN por PCR***

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue utilizada para la amplificación de los genes de *prnp* de alce y oveja. Para ello se usó un termociclador programable (Palm-Cycler, Corbett) y el siguiente programa: primer paso, desnaturalización inicial a 95ºC por 5 minutos; segundo paso, 3 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 95ºC, 30 segundos de *annealing* a 50ºC y 1 minuto de elongación a 72ºC; 27 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 95ºC, 30 segundos de *annealing* a 60ºC y 1 minuto de elongación a 72ºC tercer paso, extensión final a 72ºC por 5 minutos; mantenimiento a 4ºC.

El volumen de reacción fue de 50µl, conteniendo 0.5µl de mezcla de dNTPs (10 mM de cada uno de los dNTPs: dATP, dTTP, dCTP y dGTP), 5µl de buffer de reacción 10x, 2µl de cada uno de los *primers* (10µM), 1µl de ADN molde, 4µl de $MgCl_2$ (25mM), 0.5µl (2 unidades) de Taq DNA Polymerase (Invitrogen) y $H_2O$ ultrapura hasta completar el volumen.

***Restricciones enzimáticas***

Las reacciones de digestión enzimática fueron realizadas utilizando enzimas de restricción comerciales (New England BioLabs, Roche, Fermentas) y siguiendo las recomendaciones del fabricante.

***Reacciones de ligación***

Las reacciones de ligación fueron realizadas overnight (o/n) a 16°C. El volumen de reacción fue de 10 µl, conteniendo 1 µl de la enzima T4 DNA ligasa (Fermentas), 1 µl del buffer de reacción 10X, y el vector e inserto a ser ligados en una relación 1:5.

***Preparación y transformación de bacterias competentes***

Se prepararon células competentes de la cepa *E. coli* DH5α mediante el método del Cloruro de Calcio ($CaCl_2$) para su transformación con las ligaciones. Un cultivo crecido

por 16 horas (o/n) de la cepa fue diluido 1/100 e incubado a 37ºC, con agitación, hasta alcanzar una $DO_{600}$=0.5 (aprox. 2 horas). Las bacterias se incubaron en hielo por 10 minutos y se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos, a 4ºC. Las células se resuspendieron en la mitad del volumen inicial de 50mM $CaCl_2$ frío y se incubaron en hielo por 10 minutos. Nuevamente fueron centrifugadas y se resuspendieron en 1/20 del volumen inicial de 50mM $CaCl_2$ frío conteniendo glicerol 20%. Las bacterias se alicuotaron de a 200 µl, se les agregó la mezcla de ligación y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Posteriormente se les realizó un choque de calor a 42ºC por 2 minutos y se volvieron a colocar en hielo por 1 minuto. Se agregaron 0.8 ml de LB precalentado y se incubó por 90 minutos a 37ºC y 80rpm. Finalmente, las bacterias se plaquearon en LB agar con el antibiótico apropiado.

***Electroporación de cepas de Salmonella***

Para transformar las cepas de *S.* Typhimurium SL5338 y LVR01 se utilizó la técnica de electroporación.

Las bacterias electrocompetentes fueron preparadas como sigue: un cultivo o/n de *Salmonella* fue diluido 1/100 e incubado con agitación a 37ºC hasta alcanzar una $DO_{600}$=0.5 (aprox. 2 horas). Las bacterias se centrifugaron por 20 minutos a 3000 rpm a 4ºC. Las células fueron resuspendidas en el mismo volumen de $H_2O$ MilliQ fría y centrifugadas como se dijo anteriormente. Luego fueron resuspendidas en la mitad del volumen inicial de $H_2O$ MilliQ fría y se volvieron a centrifugar. Las bacterias se resuspendieron en 1/10 del volumen inicial de $H_2O$ MilliQ fría conteniendo glicerol 10% y centrifugadas nuevamente. Finalmente, las bacterias se resuspendieron en 1/100 de $H_2O$ MilliQ con glicerol 10%, alicuotadas de a 60µl y guardadas a –80ºC, por no más de 6 meses.

Para la electroporación, se mezclaron en un tubo eppendorf frío 1µl (100-200ng) de ADN plasmidico y 60µl de células electrocompetentes. La mezcla se incubó en hielo por 1 minuto y se pasó a una cubeta de electroporación fría. Se administró un pulso eléctrico (1750V, 50mA, 89W) mediante un electroporador (Bio-Rad). Luego de esto, las bacterias se transfirieron rápidamente a 2 ml de LB precalentado a 37°C y

suplementado con glucosa 20 mM y se incubaron a 37ºC, sin agitación, durante 90 minutos. Las bacterias se plaquearon en LB agar con el antibiótico apropiado.

Luego de la electroporación, fue chequeada la integridad del LPS de las bacterias en las colonias seleccionadas mediante aglutinación en lámina con el suero anti-O4 y verificación de ausencia de autoaglutinación.

***Clonado del gen de prnp de alce y oveja en pTECH2***

Los genes que codifican para PrP de alce y oveja fueron amplificados por PCR, el gen de alce se obtuvo utilizando como molde el ADN copia de dicho gen, y el de oveja se amplificó a partir del plásmido pDNR-1, ambos cedidos gentilmente por los Drs. Wisniewski y Goñi de la Universidad de Nueva York. Los cebadores usados (ElkPrP rev y ElkPrP for, Tabla 1) fueron diseñados para obtener como producto la secuencia de *prnp* con los sitios de restricción a sus extremos. El cebador directo presenta un sitio de corte para *Xba*I en el extremo 5' mientras que el reverso contiene un sitio de corte para *Hind*III en el extremo 5'. Además, el cebador directo fue diseñado de manera que luego de la ligación del inserto en el vector, el marco abierto de lectura del gen *prnp* entre en fase con el marco de lectura de TetC. Así, el producto final es una proteína de fusion TetC-PrP. El cebador reverso contiene el codón *stop* propio del gen *prnp*.

Los genes *prnp* de alce y oveja fueron clonados en el plásmido pTECH2, entre los sitios *Xba*I y *Hind*III, obteniendo así las construcciones pLVR12 y pLVR13 respectivamente (figura 3).

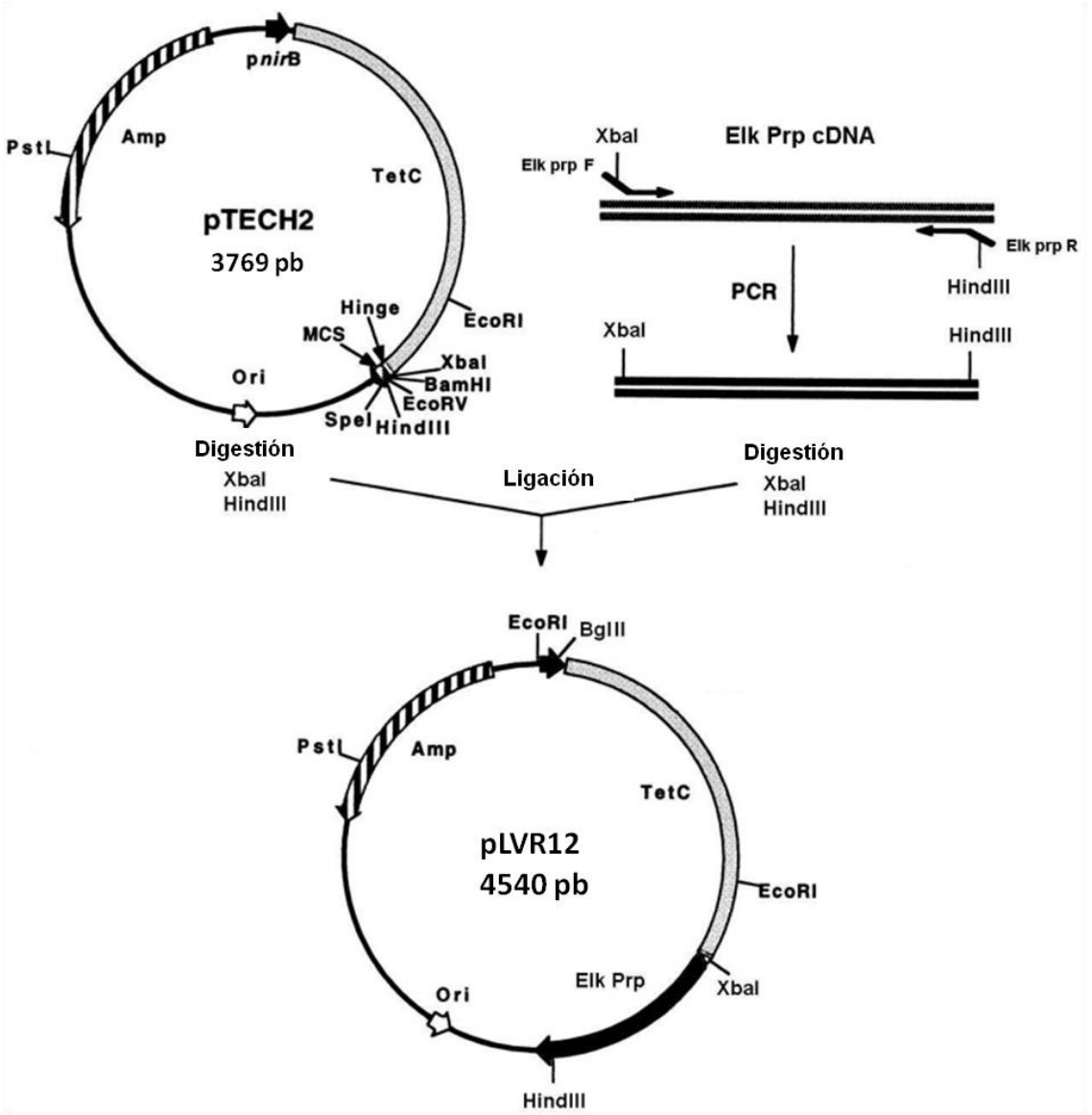


***Figura 3.*** Esquema de clonado del gen *prnp* de alce en pTECH2 para realizar la construcción pLVR12. La construcción de pLVR13 con el gen de oveja se realizó de la misma manera.

La construcción de los vectores pTECH2 con dos copias de *prnp* se realizó mediante la digestión de las construcciones pLVR12 y pLVR13 con las enzimas de restricción *Xba*I *y Bgl*II*, y Spe*I *y Bgl*II; los fragmentos conteniendo la copia de *prnp* en cada caso se purificaron, y se ligaron entre sí, dado que los extremos cohesivos dejados por el corte con *Spe*I y *Xba*I son compatibles. Como resultado se obtuvieron las construcciones pLVR14 y pLVR15 (figura 4) las cuales expresan dos copias en tándem de los genes respectivos (manteniendo la fase de lectura).

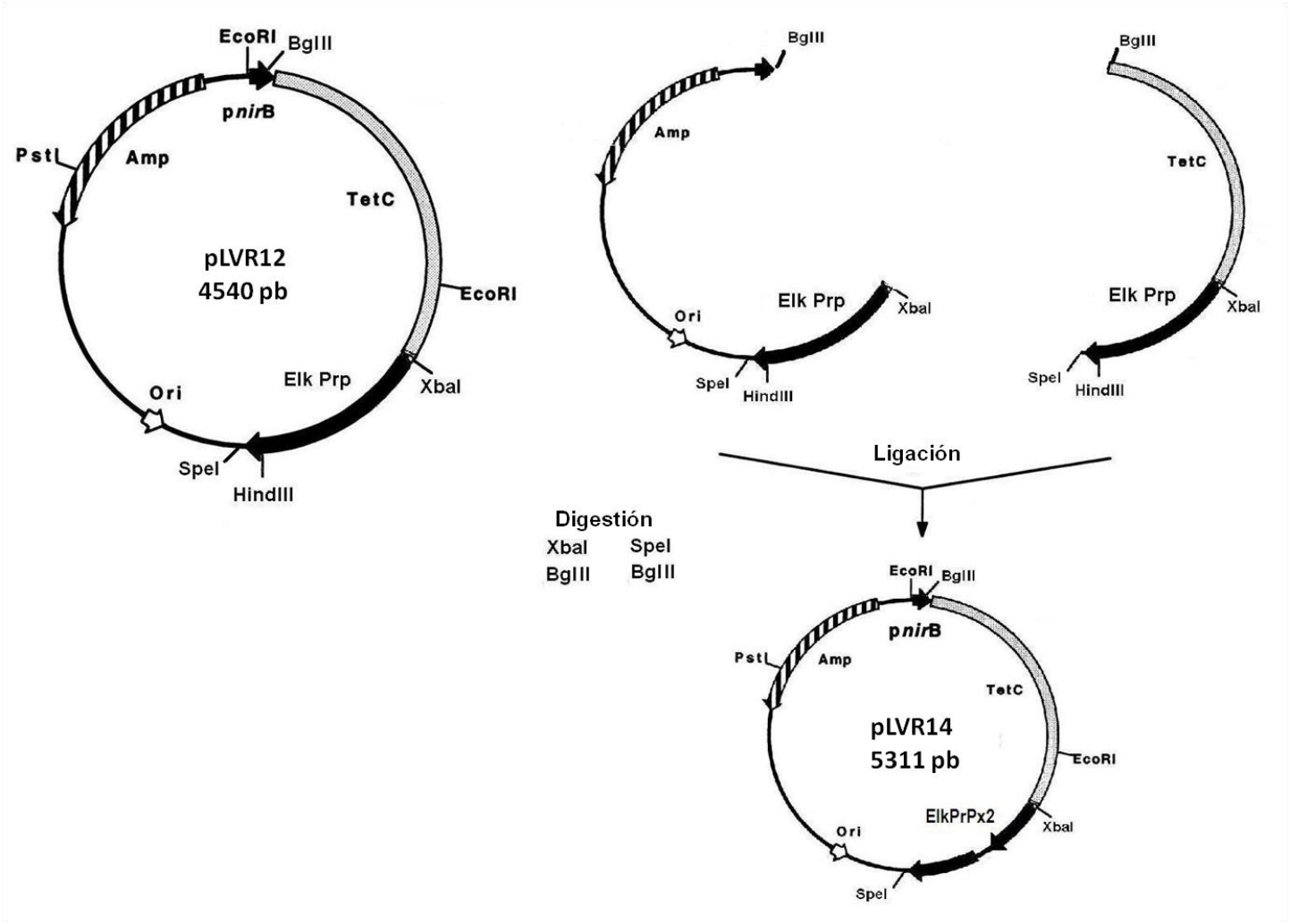


***Figura 4.*** Clonado en tandem de dos copias del gen *prnp* de alce para realizar la construcción pLVR14. La construcción de pLVR15 con dos copias del gen de oveja se realizó de la misma manera.

### *Clonado del gen prnp de alce y oveja en pGEX-4T-1*

En este caso, el cebador directo presenta un sitio de corte para *Eco*RI en el extremo 5' mientras que el cebador reverso contiene un sitio de corte para *Xho*I en el extremo 5' (pGEXelkF y pGEXelkR, Tabla 1). Además, el cebador directo fue diseñado de manera que luego de la ligación del inserto en el vector, el marco abierto de lectura de *prnp* entre en fase con el marco de lectura de GST, obteniéndose así como producto final una proteína de fusión GST-PrP. El cebador reverso contiene el codón *stop* propio del gen *prnp*.

Los genes *prnp* de alce y oveja fueron clonados en el plásmido pGEX-4T-1, entre los sitios *Eco*RI y *Xho*I, obteniendo así las construcciones pLVR17 y pLVR18 respectivamente (figura 5).

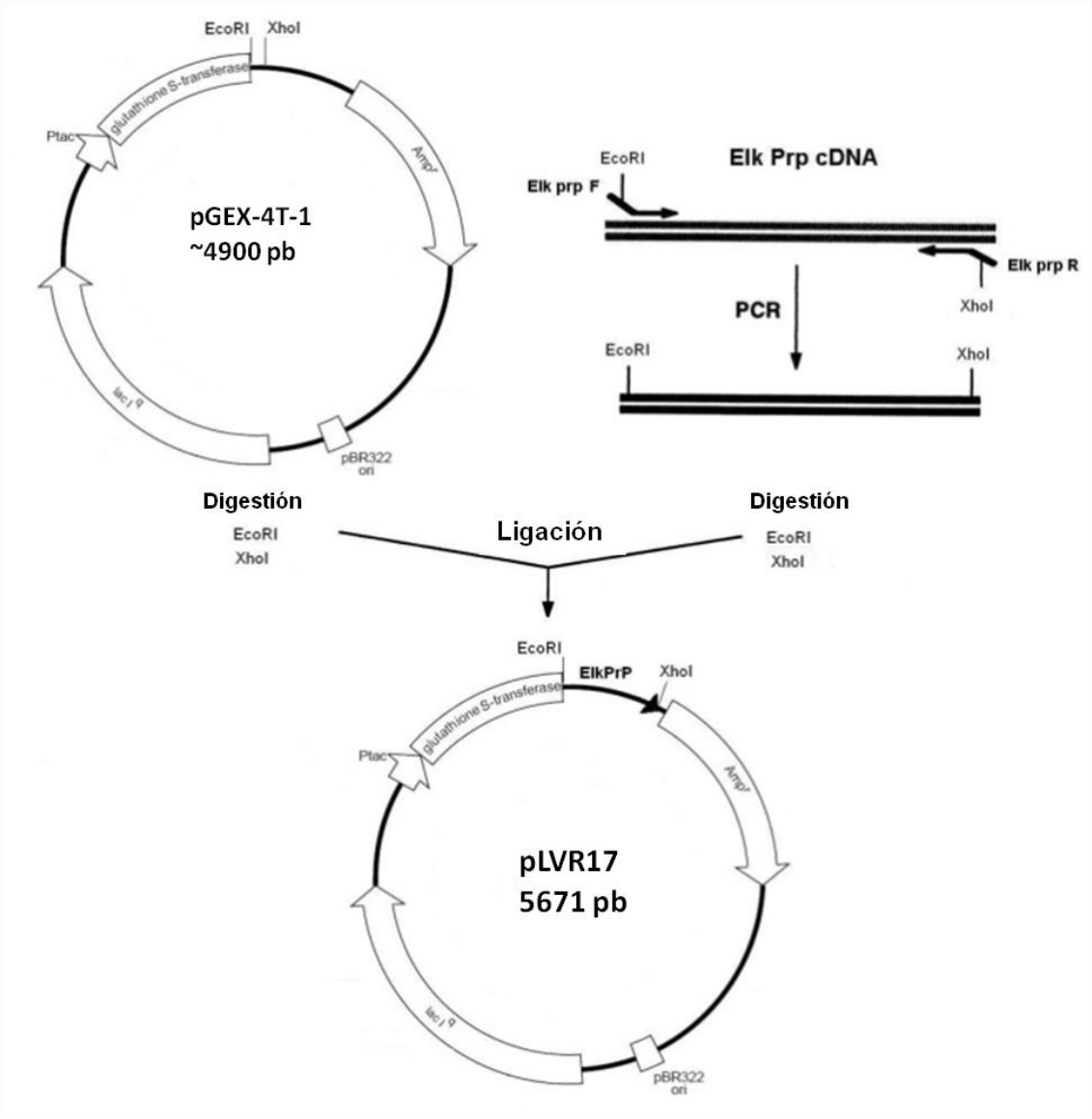


***Figura 5.*** Esquema de clonado del gen de *prnp* de alce en pGEX-4T-1 para obtener la construcción pLVR17. La construcción de pLVR18 con el gen de oveja se realizó de la misma manera.

***Generación de nuevas construcciones con la fusión GST-PrP bajo control del promotor $P_{nirB}$***

Las fusiones GST-PrP de alce y oveja fueron amplificadas a partir de las construcciones en pGEX4T-1 (pLVR17 y pLVR18) con cebadores que presentan los sitios de restricción *Bgl*II y *Hind*III para permitir el clonado direccional en pTECH2 reemplazando el gen del fragmento C de la toxina tetánica (GST5 y ElkPrPrev, tabla 1). En estas nuevas construcciones, las proteínas de fusión GST-PrP son expresadas bajo control del promotor inducible in vivo $P_{nirB}$ y se mantiene el resto del esqueleto plasmídico incambiado respecto a las construcciones en pTECH2. Las construcciones resultantes fueron llamadas pLVR19 para alce y pLVR20 para oveja (figura 6).

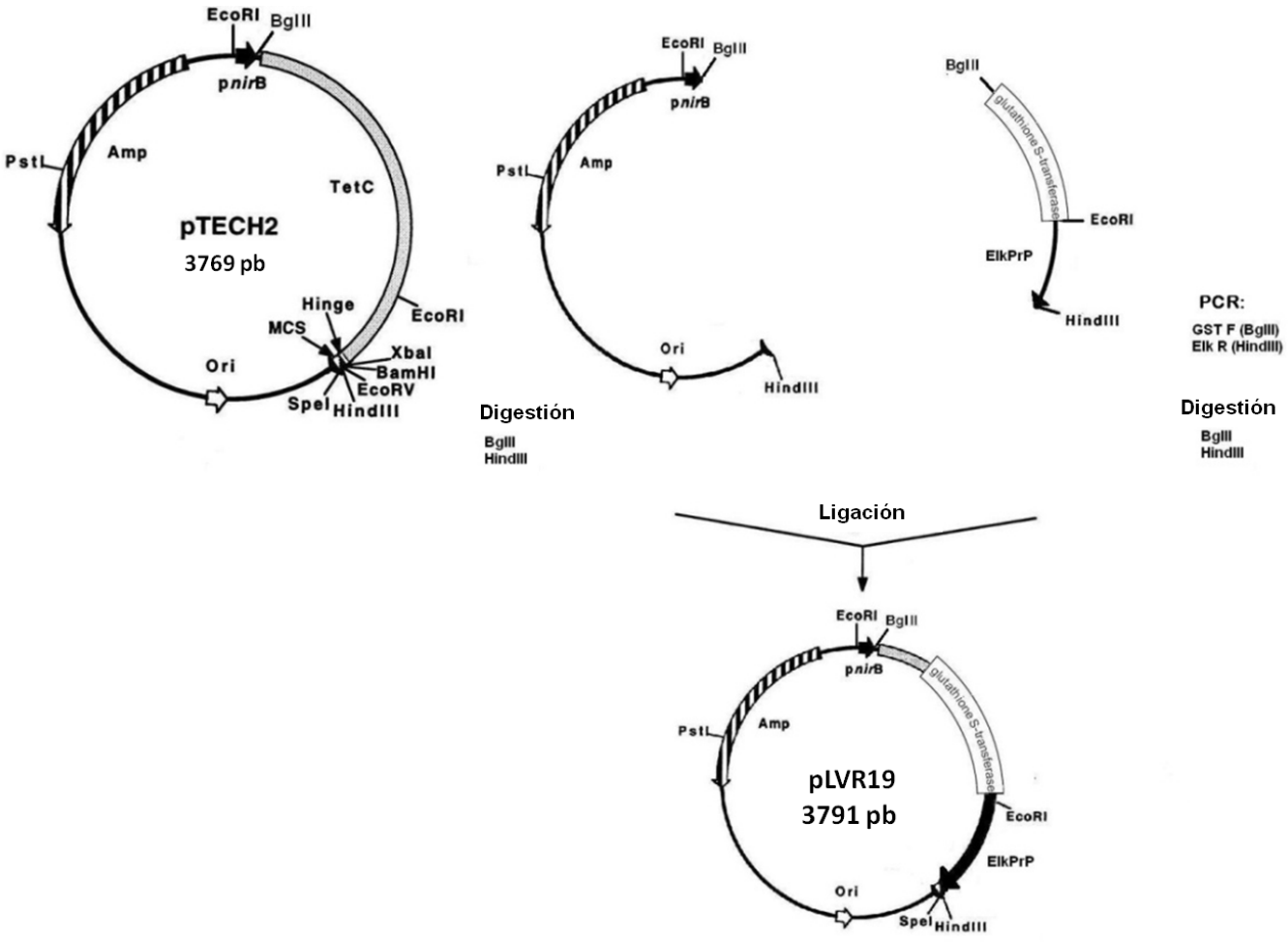


***Figura 6.*** Clonado de GST-PrP de alce en pTECH2 reemplazando el fragmento C de la toxina tetánica, para dar lugar al pLVR19. La construcción del pLVR20 con el gen de oveja se realizó de la misma manera

***Clonado del gen prnp de alce en pBAD22***

El gen *prnp* de alce fue amplificado usando los mismos cebadores que en el clonado en pTECH2. El producto de PCR resultante y el plásmido pBAD22 fueron digeridos con *Xba*I y *Hind*III y luego ligados obteniendo la construcción pLVR16 (figura 7).

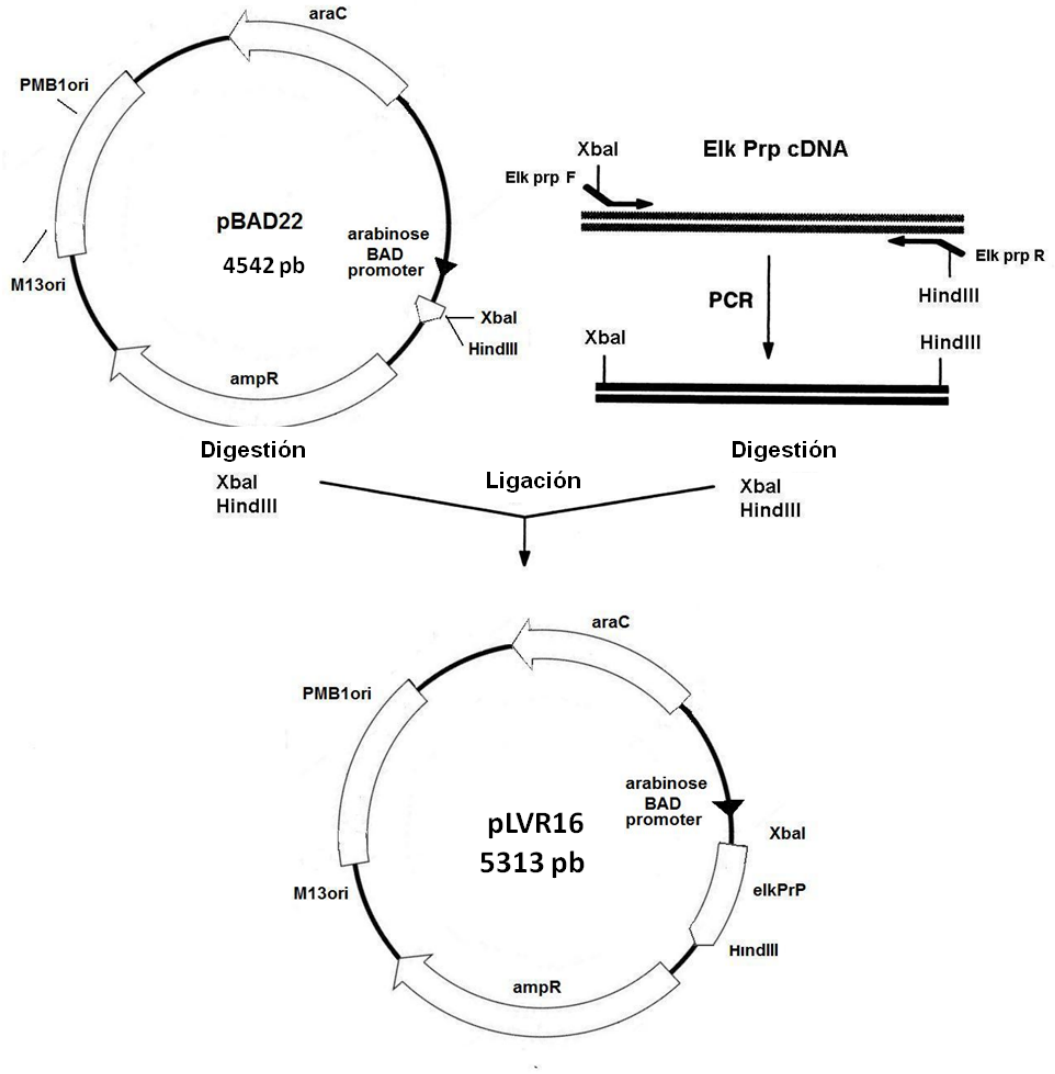


***Figura 7.*** Esquema de clonado del gen *prnp* de alce en pBAD22 para obtener la construcción pLVR16.

***Transformación con pRARE***

Se generaron células competentes de *E. coli* conteniendo las construcciones pLVR12 y pLVR14 y se transformaron con el plásmido pRARE. Las colonias transformantes fueron seleccionadas mediante plaqueo en LBA con amplicilina y cloranfenicol y luego analizadas mediante electroforesis en geles de agarosa.

***Secuenciación de las construcciones***

Todas las construcciones fueron enviadas al servicio de secuenciación de la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur para verificar la secuencia de los insertos y de las zonas de fusión inserto-vector.

***Tratamiento con Proteinasa K***

Todas las construcciones fueron enviadas a nuestros colaboradores en la Universidad de Nueva York. Allí fueron analizadas mediante digestión con proteinasa K como control de que efectivamente se trata de la proteína prionica no infecciosa.

### *3.2.3 Análisis de la expresión de proteínas*

***Preparación de lisados bacterianos***

El estudio de la producción de las proteínas PrP de alce y oveja a partir de los plásmidos construidos (tabla 3) se realizó por Western Blot (ver a continuación) sobre lisados de cultivos bacterianos en fase exponencial de crecimiento. Estos se obtuvieron por el siguiente protocolo: se realizó una dilución 1/100 de un cultivo o/n en caldo LB con el antibiótico adecuado (volumen final 10 ml) y se incubó a 37ºC con agitación durante 2 horas, previa adición del inductor en el caso que corresponda (0.5mM de IPTG, o 0.2% de L-arabinosa, ambos de Sigma). Las bacterias se centrifugaron a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C y el *pellet* se resuspendió en 500 µl de PBS, 0.15mM PMSF, 5mM EDTA, y fue sonicado mediante 6 pulsos de 10 segundos cada uno separados por intervalos de 1 minuto en hielo. Las muestras sonicadas se

centrifugaron a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C y se midió la concentración de proteínas totales en el sobrenadante por el método de Bradford (Sigma).

***Electroforesis en gel de poliacrolamida (SDS-PAGE)***

Las muestras fueron analizadas por fraccionamiento según peso molecular en geles de poliacrilamida en presencia de agente desnaturalizante. Se utilizó el sistema Mini-PROTEAN II Cell (Bio-Rad). La concentración de acrilamida en los geles de separación fue siempre de 12%. La composición de los geles de separación fue 0.5 M Tris-HCl pH 8.8 (Sigma), 0.1% SDS (Sigma), 12% acrilamida (solución al 30% acrilamida/bis-acrilamida, Sigma), 0.1% persulfato de amonio (APS, Sigma) y 0.05% TEMED (Sigma). El gel concentrador fue de 4% acrilamida, con 0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% APS y 0.05% TEMED. Se cargaron cantidades constantes de proteínas de cada muestra (30µg) y de los controles positivos (1µg). Las muestras fueron incubadas con el buffer de carga por 5 minutos a 37°C antes de sembrar en el gel. El peso molecular de los distintos componentes proteicos de las muestras fue estimado por comparación con el marcador *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Fermentas). Las corridas se realizaron a amperaje constante (20 mA/gel), en buffer de corrida (Tris-glicina). Los geles se tiñeron con azul de Coomasie o fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa para análisis por Western Blot.

***Western Blot***

Luego de realizadas las corridas electroforéticas, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Sigma) utilizando un Mini Trans-blot transfer cell (Bio-Rad). Luego de la transferencia se realizó un bloqueo con TBS 0.1% Tween20 (TBST), 5% leche, por 1 hora con agitación a temperatura ambiente. Se dispone de anticuerpos monoclonales contra las PrP de ambas especies, así como también de las proteínas normales recombinantes purificadas de oveja y ciervo, cedidas por el Departamento de Neurobiología de la NYU, que se usaron como controles positivos. Los sueros fueron incubados por una hora a 37ºC con agitación y luego o/n a 4°C en una dilución 1:1000 en buffer TBST 0.1% BSA (Sigma). El conjugado (anti mouse IgG conjugado a peroxidasa (GE)) se incubó 1 hora a temperatura ambiente en una dilución 1:2500 en

buffer TBST 0.1% BSA (Sigma). Los blots se revelaron por quimioluminiscencia usando el Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) como solución sustrato, realizando exposiciones a diferentes intervalos de tiempo en un analizador de imágenes (Gbox, Syngene).

***Análisis de expresión del gen prnp de alce clonado por PCR cuantitativa en tiempo real***

La expresión del gen PRNP de alce en las construcciones derivadas de pTECH2 se analizó mediante cuantificación relativa de los niveles de ARNm mediante PCR cuantitativa en tiempo Real (qRT-PCR) (Rotor-Gene 6000, Corbett) usándose el gen *icdA* como *housekeeping* o normalizador interno y la construcción pLVR15 como condición calibradora, ya que en este caso observamos buena expresión de la proteína mediante el análisis por Western Blot.

Se extrajo el ARN total de bacterias crecidas en fase exponencial en caldo LB con ampicilina, utilizando el kit comercial RNeasy® Protect Bacteria Mini Kit de Qiagen. Las muestras de ARN se cuantificaron mediante espectrofotometría usando un Nanodrop (Thermo Scientific) y se trataron con DNAsa previamente a su retrotranscripción. Para ello 1 µg de ARN se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente con 0.4µl de DNasa (Invitrogen), 1 µl de buffer de reacción 10X en un volumen final de reacción de 9.4µl. Una vez finalizada la incubación se le agregó 1 µl de EDTA 25mM a cada muestra y se incubó a 65°C por 10 minutos para inactivar la DNAsa. A continuación los ARNs se sometieron a la reacción de transcripción reversa, para lo cual se les añadieron 10µl de una mezcla conteniendo 1µl de mezcla de dNTPs (10 mM cada uno), 4µl de buffer de reacción 5x, 1µl de *random primers* (200ng/µl), 1µl RNase OUT, 2µl DTT (0.1M), 1µl de M-MLV (200U/µl)(Invitrogen). Las reacciones se sometieron al siguiente ciclado: 25ºC por 10 minutos, 37ºC por 50 minutos y 70ºC por 15 minutos. El ADN copia así obtenido fue usado como molde en las reacciones de qRT-PCR.

La qRT-PCR (Sybr Green, Quiagen) se realizó usando los cebadores ELKPRP rev y for (que hibridan al 100% con la secuencia equivalente del gen *prnp* de oveja) e *icdA* F y R (Tabla 1). El volumen de reacción fue de 10µl, conteniendo 2µl del cDNA previamente

diluído en $H_2O$ UP, 5µl de Sybr Green, 0.3µl de cada uno de los cebadores (10µM), y $H_2O$ hasta completar el volumen. Para calcular la cantidad relativa de ARNm de *prnp* de alce respecto a los niveles de ARNm para *prnp* de oveja, se usó el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Brevemente, el valor de Ct para *prnp* de alce se normalizó respecto al Ct del gen *icdA* en cada muestra y luego se dividió por los niveles de *prnp* de oveja previamente normalizados con *icdA*. Así se obtuvieron los valores del "fold change" o niveles relativos de ARNm de *prnp* de alce respecto a los de ARNm de *prnp* de oveja.

### *3.2.4 Estabilidad de las construcciones*

#### *Evaluación de la estabilidad in vitro.*

Se inocularon colonias aisladas de cada construcción en caldo LB con ampicilina y se incubó por 16 horas a 37º C con agitación a 200 rpm. Una dilución 1/100 del cultivo anterior se sembró en caldo LB sin antibiótico y se incubó por 6 horas a 37º C con agitación a 200 rpm. Se realizaron diluciones seriadas apropiadas en PBS del cultivo y se sembraron 100 µl en placas de LBA (LB Agar) con y sin antibiótico por duplicado. Las placas fueron incubadas por 16 horas a 37º C y las colonias fueron cuantificadas para calcular el porcentaje de bacterias portadoras de plásmido (determinadas en las placas de LBA con antibiótico) sobre el número de bacterias totales (determinadas en las placas de LBA sin antibiótico).

#### *Evaluación de la estabilidad in vivo.*

Los protocolos de los ensayos en el modelo murino fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA). Se utilizaron ratones C57BL/6, hembras, de 6-8 semanas de edad, comprados al Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE, Uruguay) y mantenidos en el bioterio del Departamento de Desarrollo Biotecnológico del Instituto de Higiene, en cajas ventiladas con aire filtrado, con agua y ración *ad libitum*. La sala mantenía temperatura adecuada, 15 intercambios de aire por hora y ciclos de 12 horas luz – 12 horas oscuridad. Los ratones fueron inoculados por vía oral mediante sonda orogástrica con aproximadamente $1x10^{10}$ UFC/ml en PBS, o por vía intravenosa (i.v.) con aproximadamente $1x10^{6}$ UFC/ml en PBS, en un volumen de 200µl, de las construcciones con el PrP de oveja, crecidas o/n en caldo LB con

ampicilina, y con IPTG para el caso de la construcción en pGEX4T-1. Se sacrificaron 3 ratones por punto de evaluación, a saber inoculados por vía i.v. a los días 3 y 7, y por vía oral a los días 3 y 10. Se extrajo el bazo, se homogeneizó en 1 ml de PBS estéril, y se plaquearon 100 ul del homogeneizado en placas de LBA con y sin ampicilina. Las placas fueron incubadas por 16 horas a 37º C y las colonias fueron cuantificadas para calcular el porcentaje de bacterias portadoras de plásmido (determinadas en las placas de LBA con antibiótico) sobre el número de bacterias totales (determinadas en las placas de LBA sin antibiótico).

## 3.3 Métodos utilizados para la evaluación de la inmunogenicidad de los vectores *in vivo*

### *3.3.1 Inmunogenicidad de las construcciones de oveja en ratones C57BL/6*

#### *Animales*

Los protocolos de los ensayos en el modelo murino fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA). Se utilizaron ratones C57BL/6, hembras, de 6-8 semanas de edad, comprados al Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE, Uruguay) y mantenidos en el bioterio del Departamento de Desarrollo Biotecnológico del Instituto de Higiene, como fue descrito previamente.

#### *Crecimiento del inóculo*

Un cultivo o/n de *Salmonella* LVR01 portando las construcciones de oveja a usar fue diluido 1/100 en LB con antibiótico e incubado con agitación a 37ºC por 16 horas. Las bacterias se centrifugaron por 10 minutos a 4000 rpm y se resuspendieron en el volumen apropiado de PBS estéril para llegar a la concentración adecuada a inocular.

#### *Ensayo de inmunización*

Tres grupos de 10 ratones fueron inmunizados por vía oral mediante sonda orogástrica con 200µl de *Salmonella* LVR01 portando las construcciones pLVR15, pTECH2, (aproximadamente $1x10^{10}$ UFC/ml en PBS) o con PBS como control. Las inmunizaciones

fueron repetidas 4 veces a intervalos de una semana. En los días 0 y 27 del experimento se recolectó sangre de la vena lateral de la cola (aproximadamente 0.1ml) y heces. Al día 58 y 65 del experimento se les administraron dos refuerzos de *Salmonella* LVR01 con la construcción pLVR20, pTECH2, o PBS respectivamente. Una semana después se volvió a recolectar sangre y heces.

***Adsorción de muestras de sangre y heces con extractos de E. coli y Salmonella.***

Para purificar las muestras de sangre y heces obtenidas se realizó una pre-adsorción de las mismas con extractos de *E. coli* y *Salmonella*, para eliminar de esa manera los anticuerpos que reconozcan proteínas bacterianas. Se creció un cultivo o/n de las cepas de *E. coli* DH5α y *Salmonella* LVR01 por separado. Se realizó un lavado en PBS y se juntaron y resuspendieron en el volumen original de PBS. Se alicuotaron en tubos de a 400µl, se centrifugaron a 4000rpm por 10 minutos y los *pellets* se congelaron por aproximadamente una hora a – 80°C. Luego se les dio un golpe de calor en un baño a 37°C y se incubaron con las muestras por una hora a 37°C en agitación. Se centrifugaron y se guardó el sobrenadante para analizar mediante la técnica de ELISA.

***Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)***

Para evaluar los niveles de anticuerpos IgG e IgA específicos para PrP recombinante de oveja y para TetC en el suero y heces de animales inmunizados, se realizaron estudios de ELISA. En cada placa se incluyeron sueros positivos y negativos, como control, apropiados a cada caso.

***ELISA contra PrP de oveja***

Placas de 96 pocillos (Nunc Immunoplate MaxiSorp) fueron sensibilizadas con 6 µg/ml de PrP recombinante de oveja en 50 µl de buffer PBS por pocillo, y se incubaron o/n a 4°C en cámara húmeda. El bloqueo se realizó con seroalbúmina bovina (BSA, Sigma) 1% en 100 µl de Superblock (Termo Scientific), incubando durante 1 hora a 37°C. Los sueros y heces fueron sembrados en diluciones apropiadas en 50 µl de PBS-Tween 0.05% (PBST) BSA 0.1% e incubados o/n a 4°C. El anticuerpo conjugado a peroxidasa (anti mouse IgG (GE) o anti mouse IgA (Sigma)) fue agregado en una dilución apropiada

(1/5000 IgG, 1/1000 IgA (v/v)) e incubado 1 hora a 37°C. El revelado se realizó con TMB (Sigma). La solución de revelado fue incubada 15 minutos a temperatura ambiente y la reacción se paró con 20 µl de $H_2SO_4$ 2 M. Las placas se leyeron a 450nm.

***ELISA contra TetC***

Placas de 96 pocillos (Nunc Immunoplate MaxiSorp) fueron sensibilizadas con 50 µl/pocillo de una dilución 1:5000 de toxoide tetánico en PBS por pocillo, y se incubaron o/n a 4°C en cámara húmeda. El bloqueo se realizó con seroalbúmina bovina (BSA, Sigma) 1% en 100 µl de PBST, incubando durante 1 hora a 37°C. Los sueros fueron sembrados en diluciones apropiadas en 50 µl de la solución de bloqueo e incubados por 1 hora a 37°C. El conjugado anti mouse IgG (GE) fue agregado en una dilución 1/5000 (v/v) e incubado 1 hora a 37°C. El revelado se realizó con OPD (0,4 mg/ml) (Sigma) en una solución de 25% ácido cítrico 0,1 M, 25% $NaHPO_3$ 0,2 M y 50% $H_2O$. En el momento de usar se agregaron 0,4 µl/ ml de $H_2O_2$. La solución de revelado fue incubada 15 minutos a 37°C y la reacción se paró con 15 µl de $H_2SO_4$ 3 M. Las placas se leyeron a 450nm.

### *3.3.2 Ensayos preliminares de inmunización en ovejas.*

***Animales***

Los protocolos de los ensayos en el modelo ovino fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA). Se utilizaron ovejas Corriedale de aproximadamente un año de edad. Se construyó la infraestructura necesaria en el Campo Experimental del Instituto de Higiene para llevar a cabo el ensayo en condiciones óptimas, la cual consta de tres compartimientos de tamaño apropiado para albergar 5 ovinos en cada uno. Las instalaciones presentan una superficie lisa que puede ser lavada fácilmente, y comederos para administrar alimento (fardos y ración). Previo al comienzo del ensayo, las ovejas fueron evaluadas para la presencia de *Salmonella* en las heces, sembrando las muestras en caldo de enriquecimiento tetrationato. Luego de 24hs de incubación a 37ºC, los caldos se plaquearon en placas de agar *Salmonella Shigella* y se incubaron por 16hs a 37ºC.

***Crecimiento del inóculo***

Un cultivo o/n de *Salmonella* LVR01 portando las construcciones de oveja a usar fue diluido 1/100 en caldo LB con ampicilina e incubado con agitación a 37ºC por 16 horas. Las bacterias se centrifugaron por 10 minutos a 4000 rpm y fueron resuspendidas en el volumen apropiado de PBS estéril para llegar a la concentración adecuada a inocular.

***Ensayo de inmunización y recolección de muestras.***

En la semana previa a la primera inoculación se tomaron muestras (T0) de la siguiente manera:

-Saliva: con una jeringa de 10 ml se toma muestra de saliva de la boca del animal, se llegan a colectar aproximadamente 500µl, luego se pasa a un tubo con 500µl de PBS, 0.2% SDS, 1mM PMSF. Las muestras se centrifugan a 5000rpm por 10 minutos y los sobrenadantes se guardan a -20°C.

-Heces: se colectan deposiciones frescas directamente del recto del animal en una bolsa de pvc/nylon y se mantienen a 4 °C. Las heces se pesan y se homogenizan en 3 ml de PBS para sembrar en caldo tetrationato y controlar la presencia de *Salmonella*, y en 3 ml de PBS-SDS–PMSF para luego centrifugar a 14000 rpm por 20 minutos y guardar el sobrenadante a -20°C.

-Sangre: se colectan 5ml de sangre de la vena yugular externa, se separa el suero y se guarda a -20°C.

En la noche previa a las inoculaciones los animales fueron privados de alimento pero no de agua. Luego de por lo menos 12 horas de ayuno, cada animal fue inoculado por vía oral con $10^{10}$ufc/ml de *Salmonella* LVR01 pLVR15, o LVR01 pTECH2, en 5mL de PBS. Luego de asegurarse que el animal tragó la muestra, se les dio 20ml de solución salina. El grupo control recibió 20ml de solución salina. Los animales se mantuvieron sin comida por otras dos horas.

Se realizaron otras tres inoculaciones más, a intervalos de una semana, y siete días después de la cuarta inoculación se tomaron muestras de saliva, heces y sangre (T1).

Los animales recibieron dos refuerzos orales de la construcción LVR01 pLVR20, LVR01 pTECH2, o PBS respectivamente, en los días 63 y 70 del experimento. Al día 76 se recolectaron muestras de saliva, heces y sangre nuevamente (T2).

***ELISA***

Para evaluar los niveles de anticuerpos IgG e IgA específicos para Prp de oveja y para TetC en el suero, heces y saliva de los animales inmunizados, se realizaron estudios de ELISA, similares a los descritos para ratón, pero usando anticuerpos conjugados a peroxidasa anti-sheep IgA e IgG (Bethyl, Sigma).

## 3.4 Análisis Estadístico.

Los datos obtenidos de los ensayos de ELISA fueron analizados usando el Test de Mann-Whitney (GraphPad Prism 4.0 software), considerando estadísticamente significativo un valor de $P<0.05$.

# 4. RESULTADOS

La cepa LVR01 auxotrófica para *aroC* fue transformada con los plásmidos pTECH2 o pGEX-4T-1, conteniendo el gen que codifica para la proteína prionica de alce u oveja, bajo control del promotor $P_{nirB}$ o $P_{tac}$ respectivamente. Se realizó una construcción más reemplazando el gen del fragmento C de la toxina tetánica del vector pTECH2, por la fusión GST-PrP de la construcción en el vector pGEX-4T-1. Se estudió la producción de las proteínas clonadas, así como la estabilidad de las diferentes construcciones *in vitro* e *in vivo*. La respuesta inmune generada se evaluó en ratones y ovejas, mediante la inmunización por vía oral con las distintas construcciones de *Salmonella* portando los diversos plásmidos con el gen que codifica para la proteína PrP de oveja.

## 4.1 Desarrollo de vectores de *Salmonella* que expresen PrP de alce u oveja.

Construcción de plásmidos derivados de pTECH2 conteniendo una o dos copias en tándem de los genes *prnp* de alce u oveja

Inicialmente abordamos la construcción de plásmidos derivados de pTECH2 portando los genes *prnp* de alce u oveja obteniendo las construcciones pLVR12 y pLVR13 respectivamente (figura 3).

El gen *prnp* de alce se obtuvo por PCR, utilizando como molde el ADN copia de dicho gen, y el de oveja se amplificó a partir del plásmido pDNR-1. Ambos genes fueron amplificados con cebadores específicos que incluyen sitios de restricción para el clonado direccional del fragmento en pTECH2 de forma similar a como se había hecho previamente con el gen *Prnp* de ratón[154 155](figura 8). Tanto el plásmido pTECH2 como los fragmentos de PCR fueron digeridos enzimáticamente con *Xba*I y *Hind*III (figura 9). Luego de la restricción, plásmido e inserto fueron ligados.

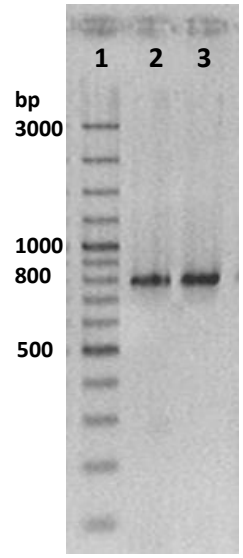


***Figura 8.*** Producto de amplificación por PCR de *prnp* de alce y oveja (carriles 2 y 3 respectivamente). Ambos con un tamaño de 771pb (carril 1: marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder, Fermentas)

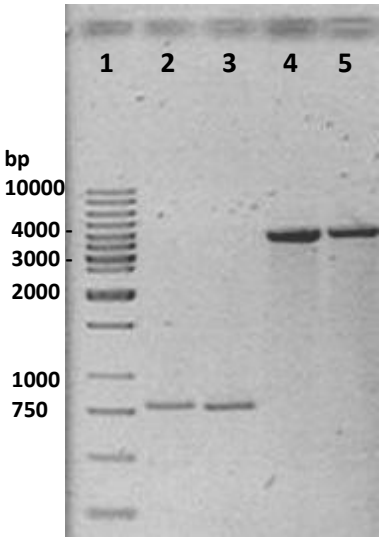


***Figura 9*.** Digestiones con *Xba*I y *Hind*III de los genes *prnp* de alce y oveja (carriles 2 y 3 respectivamente) y el vector pTECH2 (carriles 4 y 5) de 3769 pb (carril 1: 1kb DNA Ladder, Fermentas).

La construcción de los vectores pTECH2 con dos copias en tándem de *prnp* se realizó en forma similar a lo previamente descrito para el gen *Prnp* de ratón[148] mediante la digestión de las construcciones pLVR12 y pLVR13 con las enzimas de restricción *Xba*I *y Bgl*II*, y Spe*I *y Bgl*II. Los fragmentos conteniendo la copia de *prnp* en cada caso se purificaron, y se ligaron entre sí (ver explicación en Materiales y Métodos, figura 4). Las construcciones así obtenidas fueron llamadas pLVR14 y pLVR15, para alce y oveja respectivamente.

Para chequear las construcciones, los plásmidos portando una copia de *prnp* fueron digeridos con *Xba*I y *Hind*III para liberar el inserto. Esta restricción da como resultado dos bandas de 3769 y 771pb, correspondientes al vector y al inserto respectivamente Las construcciones con dos copias del gen fueron digeridas con las enzimas *Xba*I *y Spe*I*,* generando dos bandas de 3769 y 1542 pb correspondientes al vector y al doble inserto respectivamente (figura 10).

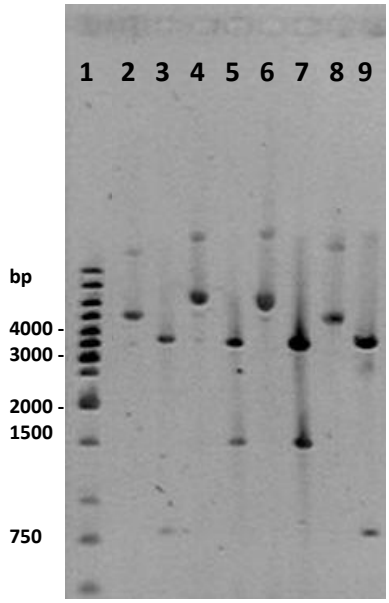


***Figura 10.*** Chequeo por restricción. Carril 1: 1kb DNA Ladder, Fermentas. Carriles 2 y 3: pLVR12 sin digerir, y digerido con *XbaI* y *HindIIII*, Carriles 4 y 5: pLVR14 sin digerir y digerido con *XbaI y SpeI*, Carriles 6 y 7: pLVR15 sin digerir y digerido con *XbaI y SpeI*, Carriles 8 y 9: pLVR13 sin digerir y digerido con *XbaI* y *HindIII*.

Expresión de PrP de alce y oveja a partir de pTECH2 en la cepa LVR01

La producción de PrP de alce y oveja en pTECH2 fue analizada por Western Blot, usando un anticuerpo monoclonal anti-PrP, cedido gentilmente por nuestros colaboradores de la Universidad de Nueva York (figura 11). Se cargaron 30 µg de cada lisado, y 1µg de la proteína recombinante purificada usada como control.

Observamos que para el PrP de oveja se logra una buena expresión en pTECH2 tanto para una copia (ver carril 4, figura 11, donde se observa una banda de 78 kDa. que corresponde a la fusión de PrP de 28 kDa. con TetC de 50 kDa.) como para dos (ver carril 5, figura 11, donde se observa una banda de 106 kDa.) Sin embargo, para la proteína de alce solo logramos ver expresión en la construcción que presenta las dos copias (carril 3, figura 11), siendo esta muy pobre comparada con la expresión observada para la proteína de oveja.

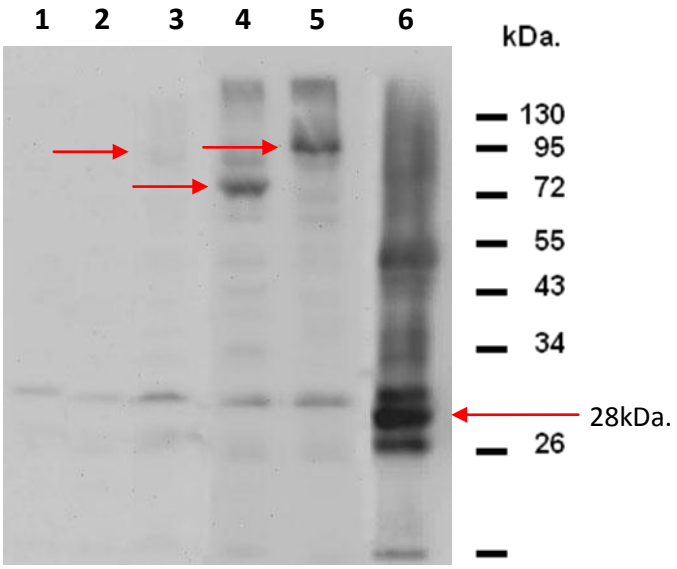


***Figura 11.*** Western Blot para análisis de la producción de PrP a partir de las construcciones en pTECH2 en la cepa LVR01. Carril 1: pTECH2, carril 2: pLVR12, carril 3: pLVR14, carril 4: pLVR13, carril 5: pLVR15, carril 6: control positivo SheepPrP recombinante 28kDa. Las flechas indican las bandas de interés.

Análisis de la expresión de PrP de alce mediante PCR cuantitativa en tiempo real

Los análisis por Western Blot indicaron una producción de la proteína PrP de alce a partir de las construcciones hechas en pTECH2 mucho más pobre que la proteína de oveja a partir de las mismas construcciones. Esto puede deberse a una menor transcripción del gen o menor estabilidad del ARNm, o a una menor traducción o estabilidad de la proteína. Para discernir entre estas posibilidades decidimos cuantificar la expresión del gen *prnp* de alce a partir de las distintas construcciones mediante qRT-PCR. Se cuantificaron los niveles de ARNm para *prnp* de alce en cepas portadoras de las construcciones pLVR12 y pLVR14, normalizándolos con los niveles del gen housekeeping *icdA*, y se hicieron relativos a los niveles de ARNm para PRNP de oveja en la cepa portadora de pLVR15 que mostró buenos niveles de proteína en el western blot. Esto pudo ser posible gracias a que los mismos cebadores usados para amplificar el gen *prnp* de alce sirven para amplificar el gen *prnp* de oveja.

Los resultados indican que los niveles de ARNm para el gen de alce expresado a partir de la construcción con una sola copia son casi 2 veces menores que los del gen de oveja, y los de la construcción con doble copia de alce son 15 veces menores. Estos resultados explican en parte por qué los niveles de proteína PrP de alce observados en el western blot son menores que los de la proteína de oveja (figura 11). Sin embargo, no explican por qué los niveles observados de PrP de alce expresada a partir del plásmido con doble copia del gen son mayores que a partir de la copia simple.

***Tabla 4.*** Resultados de qRT-PCR para *prnp* de alce.

| | **Niveles relativos de ARNm (respecto a pLVR15)** | **Inverso de los niveles relativos de ARNm** |
|---|---|---|
| **pLVR12** | 0.5946 | 1.68 |
| **pLVR14** | 0.0647 | 15.45 |
| **pLVR15** | 1.0000 | 1.00 |

Construcción de pLVR16

Dado que la proteína PrP de alce mostró una producción pobre cuando expresada a partir de $P_{nirB}$, decidimos usar vectores alternativos, que expresen de manera inducible los genes clonados.

El gen *prnp* de alce fue amplificado por PCR con los mismos cebadores usados en la construcción anterior. El vector de expresión pBAD22 y el gen amplificado fueron digeridos con las enzimas *Xba*I y *Hind*III (Figura 12) y luego ligados para obtener la construcción pLVR16. Esta fue chequeada por restricción para liberar el inserto, generando dos bandas, una de 4542 pb y otra de 771 pb correspondientes al vector y al inserto respectivamente (Figura 13).

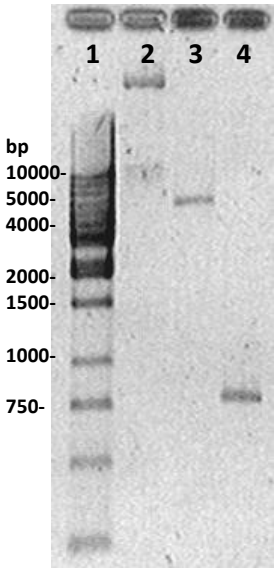


***Figura 12.*** Digestiones c*on XbaI* y *Hind*III de pBAD22 (carril 2 sin digerir, carril 3 digerido) y *prnp* de alce (carril 4). Carril 1: 1kb DNA Ladder, Fermentas.

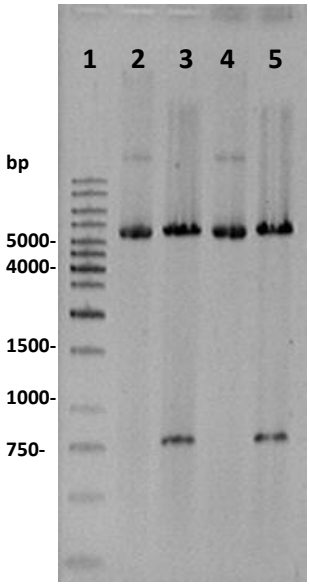


***Figura 13.*** Chequeo por restricción de dos colonias transformantes durante la construcción pLVR16. Ambas presentan el patrón de bandas esperado. Los carriles 2 y 4 son las construcciones sin digerir, los carriles 3 y 5 digeridas para liberar el inserto. Carril 1: 1kb DNA Ladder, Fermentas.

Transformación con pRARE

Otro abordaje alternativo para mejorar el nivel de expresión de la proteína PrP de alce a partir de los vectores derivados de pTECH2 fue la co-transformación de la cepa con el pRARE, un plásmido que expresa ARNts que reconocen codones raros en *E. coli* y *Salmonella*, ya que analizando la secuencia de PrP de alce vimos que presenta dichos codones. Para esto se generaron células competentes DH5α portando las construcciones pLVR12 y pLVR14 y se transformaron con el plásmido pRARE. La selección se realizó en placas de LBA con ampicilina y cloranfenicol. A las colonias candidatas se les extrajo los plásmidos y se analizaron en geles de agarosa. Observamos que obtenemos dos bandas de similar tamaño correspondientes a los plásmidos linealizados pRARE y pLVR12, o pRARE y pLVR14, cuyos tamaños son 4694pb para el pRARE y 4540pb y 5311pb para pLVR12 y pLVR14 respectivamente. (Figura 15)

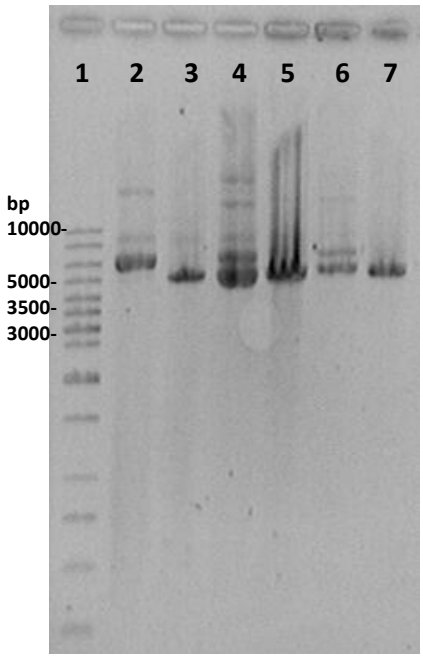


***Figura 14.*** Chequeo de transformantes. Carril 1: 1kb DNA Ladder, Fermentas. Carriles 2 y 3: pRARE sin digerir y linealizado respectivamente, peso molecular pRARE: 4694pb. Carriles 4 y 5: pLVR12-pRARE sin digerir y linealizados, tamaño pLVR12: 4540pb. Carriles 6 y 7: pLVR14-pRARE sin digerir y linealizados, peso molecular pLVR14: 5311pb.

Expresión de PrP de alce en pBAD22 y transformación con pRARE

Analizamos por Western Blot la expresión de PrP de alce a partir de la construcción en pBAD22, así como también a partir de las construcciones en pTECH2 co-transformadas con el pRARE. No logramos ver expresión de PrP de alce con la construcción en pBAD22 incluso en condiciones máximas de inducción con arabinosa (0.2%), ni se mejoró la expresión de las construcciones del PrP de alce en pTECH2 transformadas con pRARE (resultados no mostrados).

Construcción de pLVR17 y pLVR18

Se intentó un nuevo clonaje del PrP de alce y oveja en un vector inducible. Para ello utilizamos el plásmido pGEX-4T-1 que permite la expresión del inserto de forma inducible a partir del promotor fuerte $P_{tac}$, como fusión a la proteína GST. Los genes PRNP de alce y oveja fueron amplificados con cebadores específicos que llevan sitios de restricción para el clonado direccional de los fragmentos en pGEX-4T-1 (Figura 5). Tanto el plásmido como los fragmentos de PCR fueron digeridos enzimáticamente con *EcoR*I y *Xho*I, realizándose posteriormente las reacciones de ligación (Figura 15).

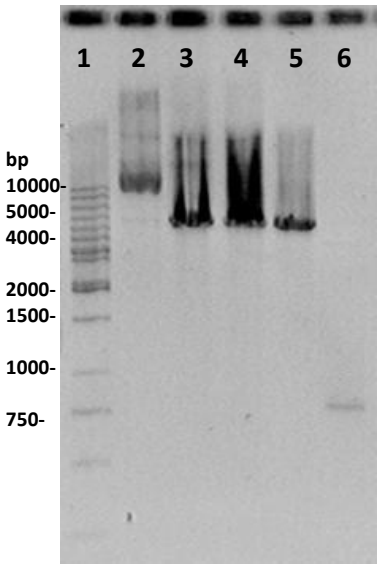


***Figura 15.*** Digestiones de pGEX-4T-1. Carril 1: 1kb DNA Ladder, Fermentas. Carril 2: pGEX-4T-1 sin digerir: 4900pb . Carril 3: pGEX-4T-1 digerido con EcoRI. Carril 4: pGEX-4T-1 digerido con XhoI. Carril 5: pGEX-4T-1 digerido con ambas enzimas. Carril 6: elkPrP digerido con ambas enzimas.

Para chequear las construcciones ambos plásmidos recombinantes fueron digeridos con *EcoR*I y *Xho*I para liberar el inserto. Esta restricción da como resultado dos bandas de aprox. 4900 y 771 pb, correspondientes al vector y al inserto respectivamente. En todos los casos se observó el patrón de bandas esperado (Figura 16). Llamamos a estas construcciones pLVR17 y pLVR18, para PrP de alce y oveja respectivamente.

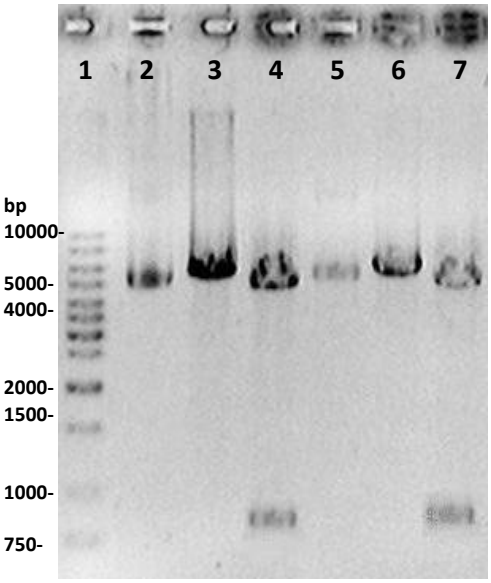


***Figura 16***. Chequeo por restricción de las construcciones pLVR17 y pLVR18. Carril 1: 1kb DNA Ladder, Fermentas. Carril 2: pLVR17. Carril 3: pLVR17 linealizado de 5671pb. Carril 4: pLVR17 digerido para liberar el inserto. Carriles 5-7: lo mismo pero para pLVR18.

Expresión de PrP de alce y oveja clonados en pGEX-4T-1

La expresión de PrP de alce y oveja en pGEX-4T-1 fue analizada por Western Blot (figura 17). En este caso se cargaron cantidades menores de lisados bacterianos (7.5µg de proteínas totales) para evitar un exceso de señal en el Western Blot. Los resultados indican que tanto el PrP de alce como el de oveja alcanzan una mejor expresión en la construcción con pGEX-4T-1, inducida por IPTG, observándose una banda notoria de 55 kDa. correspondiente a la fusión GST-PrP (peso molecular de la GST: 27 kDa., y de PrP: 28 kDa.). Incluso para el PrP de alce, la expresión a partir del pGEX-4T-1 sin inducción es mejor que la expresión a partir del pTECH2 con dos copias (ver carril 5, figura 11).

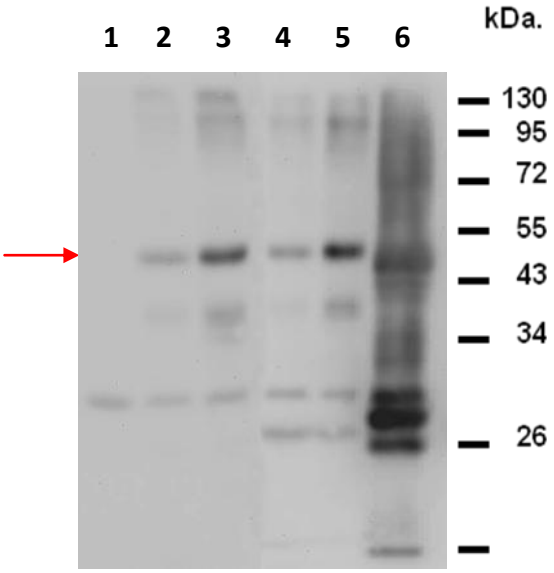


***Figura 17.*** Western Blot para análisis de la producción de PrP a partir de las construcciones en pGEX-4T-1 en la cepa LVR01. Carril 1: pGEX-4T-1, carril 2: pLVR17 sin inducir, carril 3: pLVR17 inducido por IPTG, carril 4: pLVR18 sin inducir, carril 5: pLVR18 inducido por IPTG. carril 6: control positivo SheepPrP recombinante (28kDa). La flecha indica las bandas de interés.

Construcción de pLVR19 y pLVR20

La última construcción realizada fue una construcción híbrida entre las construcciones en pTECH2 y en pGEX-4T-1. De esta manera aprovechamos la ventaja de la buena producción y estabilidad de las proteínas de fusión a GST y a la vez la ventaja de la

inducción en condiciones *in vivo* de la construcción en pTECH2 (a partir del promotor $P_{nirB}$), manteniendo el esqueleto plasmídico utilizado con éxito en los trabajos previos con el gen de ratón[151 152].

Las fusiones GST-PrP de alce u oveja fueron amplificadas a partir de las respectivas construcciones pLVR17 y pLVR18 con cebadores que presentan los sitios de restricción para *Bgl*II y *Hind*III para permitir el clonado direccional en pTECH2 reemplazando el gen del fragmento C (Figuras 6 y 18). Los plásmidos resultantes, portando la fusión GST-PrP se denominaron pLVR19 y pLVR20 respectivamente. En estas nuevas construcciones la proteína de fusión GST-PrP es expresada bajo control del promotor inducible *in vivo* $P_{nirB}$. Las construcciones resultantes fueron chequeadas mediante restricción con *BglII* y *HindIII* y generando bandas de 2300 y 1490 pb que corresponden al vector pTECH2 y la fusión GST-PrP respectivamente, y con *Eco*RI generando bandas de 3071 y 760 pb. (Figura 19).

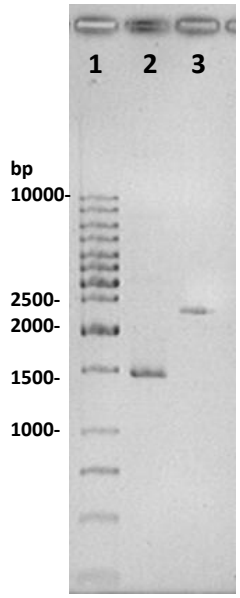


***Figura 18.*** Carril 1. 1kb DNA Ladder, Fermentas. Carril 2: GST-elkPrP amplificado de pLVR17. Carril 3: pTECH2 sin el fragmento C.

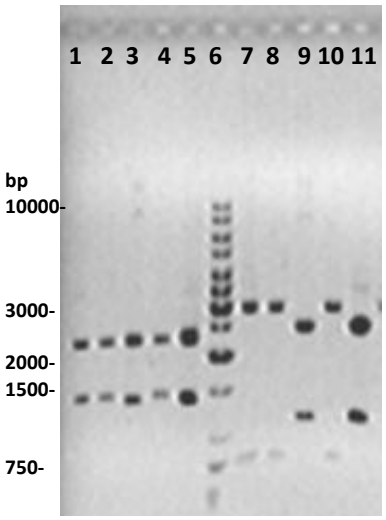


***Figura 19.*** Chequeo por restricción de las construcciones pLVR19 y pLVR20. Carriles 1-5: digestión con *BglII* y *HindIII* de dos candidatas elk, pTECH2, y dos candidatas sheep. Carril 6: 1kb DNA Ladder, Fermentas. Carril 7-11: digestión con *EcoRI* de las mismas candidatas. Se seleccionaron los clones de los carriles 1 y 4 (pLVR19 y pLVR20) para seguir trabajando.

Expresión de los genes *prnp* de alce y oveja a partir de las construcciones pLVR19 y pLVR20

La producción de PrP de alce y oveja en las construcciones con la fusión GST-PrP bajo control del promotor $P_{nirB}$, en la cepa LVR01 fue analizada por Western Blot. Se obtuvieron buenos niveles de expresión para ambas proteínas. Sin embargo, se esperaba una banda de 55 kDa. correspondiente a la fusión GST-PrP (peso molecular de GST: 27 kDa, y de PrP: 28 kDa) pero en ambos casos se obtuvo una banda con un peso molecular de aproximadamente 40 kDa. (carriles 2A y 2B, figura 20), menor al esperado y que podría corresponder a PrP solo, lo que estaría indicando un clivaje de la proteína de fusión a GST.

En la siguiente figura se muestra el análisis de expresión mediante Western Blot de las proteínas a partir de las construcciones realizadas.

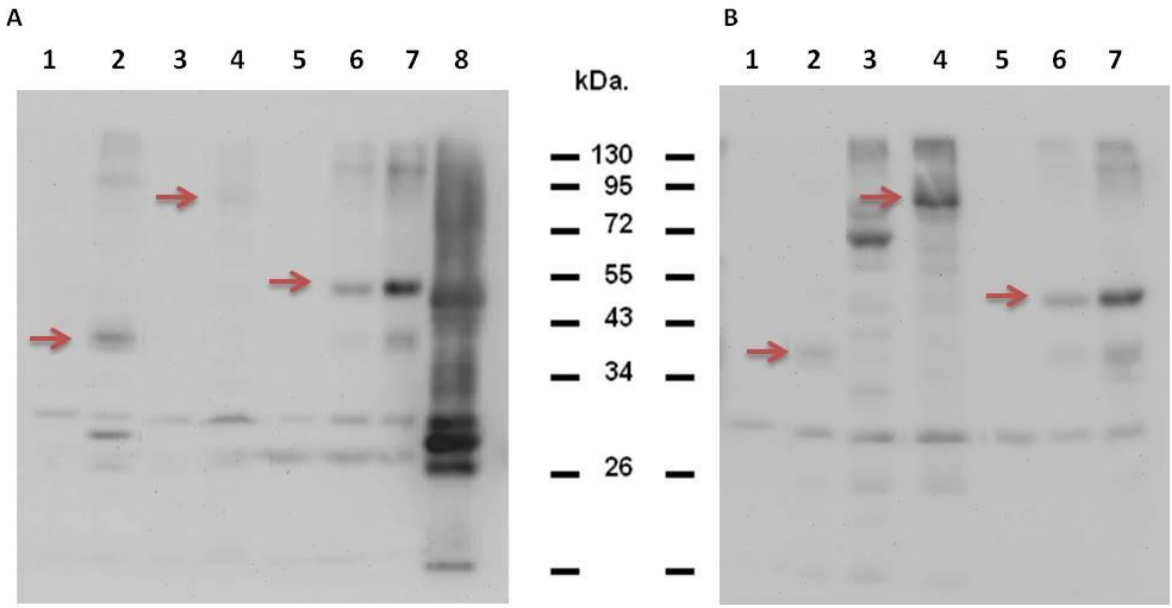


***Figura 20.*** Western Blot para análisis de la producción de PrP a partir de las construcciones realizadas en la cepa LVR01. **A:** Construcciones con el gen de alce*:* carril 1: pTECH2, carril 2: pLVR19, carril 3: pLVR12, carril 4: pLVR14 carril 5: pGEX-4T-1, carril 6: pLVR17 sin inducir, carril 7: pLVR17 inducido por IPTG, carril 8: control positivo SheepPrP recombinante 28kDa. **B:** Construcciones con el gen de oveja*:* carril 1: pTECH2, carril 2: pLVR20, carril 3: pLVR13, carril 4: pLVR15, carril 5: pGEX-4T-1, carril 6: pLVR18 sin inducir, carril 7: pLVR18 inducido por IPTG. Las flechas indican las bandas de interés.

Determinación de la estabilidad plasmídica *in vitro*

Es necesario asegurar que la bacteria no pierde rápidamente el plásmido cuando se multiplica en ausencia de antibiótico, como sucede una vez inoculada en el animal Se evaluó *in vitro* la capacidad de retener el plásmido en ausencia de presión selectiva del antibiótico, realizando recuentos de bacterias viables en placas de LBA con y sin antibiótico, a partir de cultivos realizados en medio líquido en ausencia del mismo. Las construcciones evaluadas fueron las que mejor produjeron la proteína según lo obtenido en el Western Blot, y se incluyó la construcción en pTECH2 con doble copia del gen PrP de ratón (pTECH2 mousePrPx2) para su comparación con las construcciones en pTECH2 de oveja.

Los resultados obtenidos muestran que las construcciones pLVR19 y pLVR20 son las más estables, con porcentajes de estabilidad de 98 y 79% respectivamente (Tabla 5). En segundo lugar están las construcciones en pGEX, pLVR17 y pLVR18 con porcentajes de estabilidad del 85 y 75% respectivamente, y por último las construcciones en pTECH2, pLVR13 y pLVR15 con un porcentaje de estabilidad del 22% para la doble copia y 0% para la simple copia del PrP de oveja. La construcción en pTECH2 con la doble copia del gen de PrP de ratón mostró niveles de estabilidad muy altos en comparación con las construcciones en pTECH2 con la doble copia del gen PrP de oveja, pLVR15.

***Tabla 5.*** Estabilidad *in vitro* de las construcciones.

| **LVR01** | **% resistentes** |
|---|---|
| **pTECH2 mousePrPx2** | 92.3% |
| **pLVR13** | 0.0% |
| **pLVR15** | 22.4% |
| **pLVR17** | 85.3% |
| **pLVR18** | 75.0% |

| | |
|---|---|
| **pLVR19** | 98.3% |
| **pLVR20** | 78.7% |

Los números indican el porcentaje de colonias resistentes a ampicilina respecto al total de colonias obtenidas en las placas sin ampicilina.

Determinación de la estabilidad plasmídica *in vivo*

Por otro lado se evaluó la estabilidad de las construcciones con el PrP de oveja *in vivo*. Ratones C57BL/6 fueron inoculados por vía oral o por vía intravenosa con la cepa LVR01 portando cada construcción. A diferentes tiempos post inoculacion se sacrificaron 3 ratones por grupo, se homogeneizaron los bazos y se plaqueó el homogeneizado en placas de LB con y sin ampicilina (Tabla 6).

Al igual que los resultados de estabilidad *in vitro*, la construcción pLVR20 fue la más estable luego de ser administrada por vía intravenosa u oral. La construcción en pGEX-4T-1 (pLVR18) mostró estabilidad intermedia al administrarla por vía intravenosa pero no se recuperaron bacterias de los bazos cuando inoculada por vía oral. Esto indica una baja capacidad invasiva de esta cepa, o baja capacidad de supervivencia en el bazo, comparada con las otras construcciones. En el caso de la construcción pLVR15, cuando administrada por la vía intravenosa se recuperó un buen numero de bacterias pero muy pocas con plásmido, o sea, que la estabilidad fue muy baja. Cuando esta construcción fue administrada por vía oral se recuperaron bacterias a tiempos tempranos, pero muy pocas con plásmido, y a tiempos tardíos prácticamente no se recuperaron bacterias, lo que no nos permite sacar conclusiones de la estabilidad.

***Tabla 6***. Porcentajes de estabilidad *in vivo* de las construcciones administradas por vía intravenosa y oral.

| LVR01 | Ratón | Vía I.V | | Vía Oral | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Dia3 | Dia7 | Dia3 | Dia10 |
| pLVR15 | 1 | 0.3% | 0.0% | 0.0% | – |
| | 2 | 0.2% | 0.0% | 0.8% | – |
| | 3 | 0.0% | 0.0% | 2.2% | 0.0% |
| pLVR18 | 1 | 44.4% | 23.8% | – | – |
| | 2 | 66.0% | 25.5% | – | – |
| | 3 | 68.1% | 20.0% | – | – |
| pLVR20 | 1 | 100.0% | 100.0% | 100.0% | 88.9% |
| | 2 | 100.0% | 100.0% | 100.0% | 77.0% |
| | 3 | 92.9% | 67.1% | 100.0% | 96.2% |

Se sacrificaron tres ratones al día 3 y 7 para la vía I.V. y al día 3 y 10 para la vía oral.
Los números indican el porcentaje de colonias resistentes a ampicilina recuperadas de los bazos respecto al total de colonias recuperadas (cuantificadas en las placas sin ampicilina). El símbolo – indica que nos se recuperaron bacterias o los números de colonias cuantificados estaban por debajo del límite de confianza del método.

## 4.2 Ensayo de inmunogenicidad de las construcciones de oveja en ratones.

La respuesta inmune generada contra la proteína PrP de oveja fue evaluada en el modelo murino, mediante la inmunización por vía oral. Tres grupos de 10 ratones fueron inmunizados oralmente con cuatro dosis de: *Salmonella* portando la construcción pLVR15, que corresponde a la doble copia de sheepPrP en el vector pTECH2, *Salmonella* transformada con pTECH2, y un grupo control que recibió PBS. Los ratones fueron sangrados y se recolectaron heces antes y después de las cuatro dosis (T0 y T1 respectivamente). Se midió la producción de anticuerpos a través de ensayos de ELISA. Al mes de la última dosis, los grupos recibieron dos refuerzos a intervalos de una semana en los que se cambió la construcción portando PrP en *Salmonella* por la construcción pLVR20 (la fusión GST-PrP bajo control del promotor $P_{nirB,}$), mientras que los otros grupos recibieron nuevamente *Salmonella* transformada con pTECH2, y el grupo control PBS. Muestras de sangre y heces fueron tomadas nuevamente luego de las dos últimas dosis (T2).

Se comenzaron los ensayos de inmunogenicidad tanto en ratones como en ovejas usando la construcción en pTECH2 con doble copia del PrP de oveja (pLVR15), ya que habíamos obtenido muy buenos niveles de expresión de la proteína en el análisis por Western Blot. Los ensayos donde se observó que la estabilidad para esta construcción era muy baja fueron realizados luego de comenzar con los ensayos en animales, por lo que luego se decidió cambiar la construcción pLVR15 por pLVR20, en los refuerzos posteriores.

En ningún caso se observaron signos clínicos de salmonelosis en los ratones inoculados, indicando inocuidad de la cepa de *Salmonella* administrada.

Los ELISAs para determinar el nivel de IgG en suero e IgA en heces anti-PrP mostraron niveles elevados de anticuerpos tanto para el grupo que recibió PrP como para el grupo control pTECH2 con respecto al grupo que recibió PBS (Figuras 21 y 22).

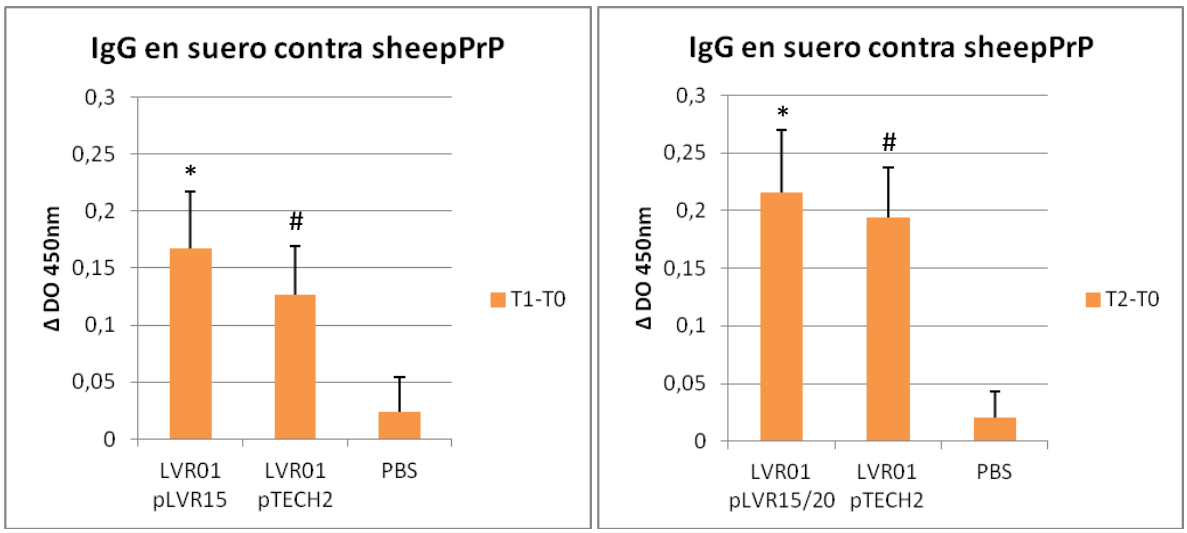


***Figura 21.*** Niveles de IgG anti-PrP en sueros de los ratones inmunizados, previo al tratamiento de adsorción de las muestras con extractos bacterianos. Las barras indican el valor de DO 450nm a T1 menos el valor a T0, o a T2 menos el valor a T0. Se grafica el promedio de los resultados obtenidos para 10 animales por grupo y la correspondiente desviación estándar. El test de Mann-Whitney muestra que los niveles de IgG entre el grupo que recibió el PrP y el control PBS son significativamente diferentes (*p < 0.05), así como también entre el grupo pTECH2 y el PBS (#p < 0.05), pero no entre el grupo PrP y grupo control pTECH2, tanto para T1 como para T2.

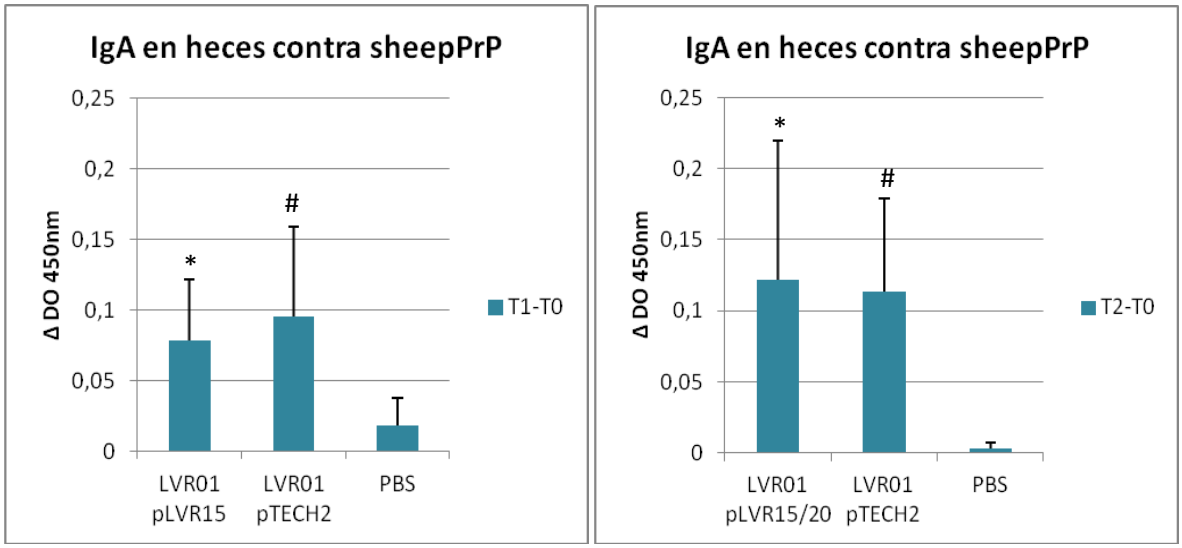


***Figura 22.*** Niveles de IgA anti-PrP en heces de los ratones inmunizados, previo al tratamiento de adsorción de las muestras con extractos bacterianos. Se grafica el promedio de los resultados obtenidos para 10 animales por grupo y la correspondiente desviación estándar. El test de Mann-Whitney muestra que los niveles de IgA entre el grupo que recibió el PrP y el control PBS son significativamente diferentes (*p < 0.05), así como también entre el grupo pTECH2 y el PBS (#p < 0.05), pero no entre el grupo PrP y grupo control pTECH2, tanto para T1 como para T2.

Estos resultados indicaban una reactividad inespecífica, que se sospechó podía deberse a que la proteína recombinante sheepPrP usada para sensibilizar las placas estuviera contaminada con antígenos bacterianos. En función de ello se volvió a repetir los ELISAs, pero con la variante que los sueros se preadsorbieron con extractos bacterianos.

Los resultados de estos nuevos ELISAs mostraron que usando los sueros preadsorbidos es posible detectar una respuesta específica anti-PrP en el grupo tratado con el vector *Salmonella* portando el PRNP. Luego de las primeras cuatro dosis de LVR01-pLVR15 (T1) se alcanzaron niveles de IgG en suero contra sheepPrP significativamente mayores que en los grupos control LVR01-pTECH2 y PBS, y estas diferencias aumentaron luego de las dos dosis con LVR01 pLVR20 (T2) (Figura 23).

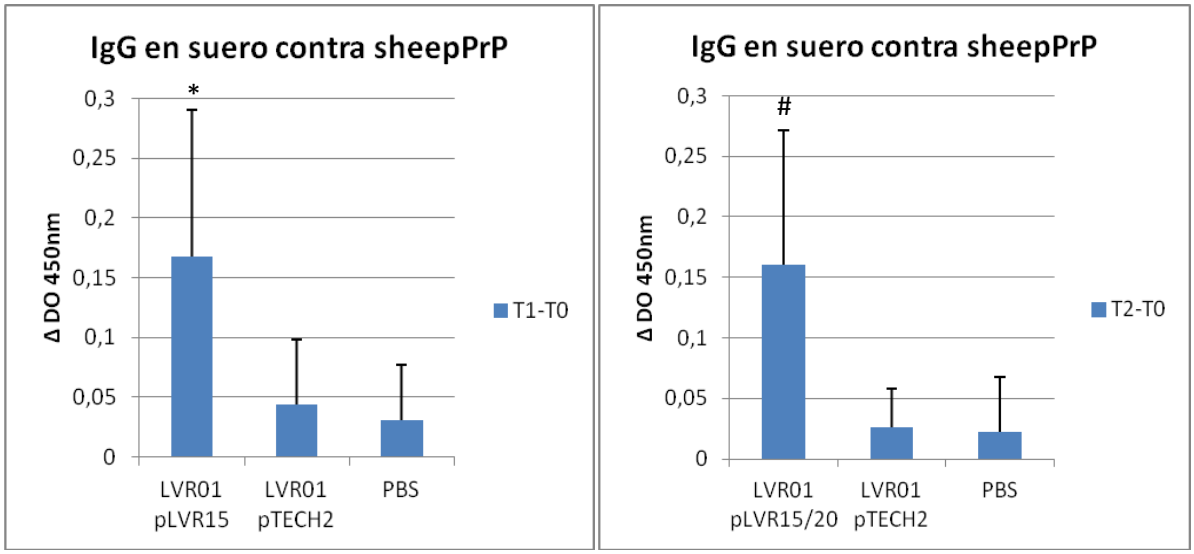


***Figura 23.*** Niveles de IgG anti-PrP de oveja en suero de ratones inmunizados con cuatro dosis de la construcción pLVR15 (T1) y luego con dos refuerzos de pLVR20 (T2), y controles pTECH2 y PBS. Se grafica el promedio de los resultados obtenidos para 10 animales por grupo y la correspondiente desviación estándar.El test de Mann-Whitney muestra que para T1 los niveles de IgG entre el grupo que recibió el PrP y los controles son significativamente diferentes (*$p < 0.05$), asi como también para T2 (#$p<0.01$).

En cuanto a los niveles de IgG en suero contra la proteína de fusión TetC, sólo se pudieron detectar anticuerpos específicos en el grupo de animales que recibieron LVR01-pTECH2 obsevándose niveles altos de anticuerpos en los tiempos T1 y T2, mientras que en el grupo que recibió *Salmonella* portando la fusión de TetC con PrP de oveja no se detectó una respuesta contra TetC (Figura 24).

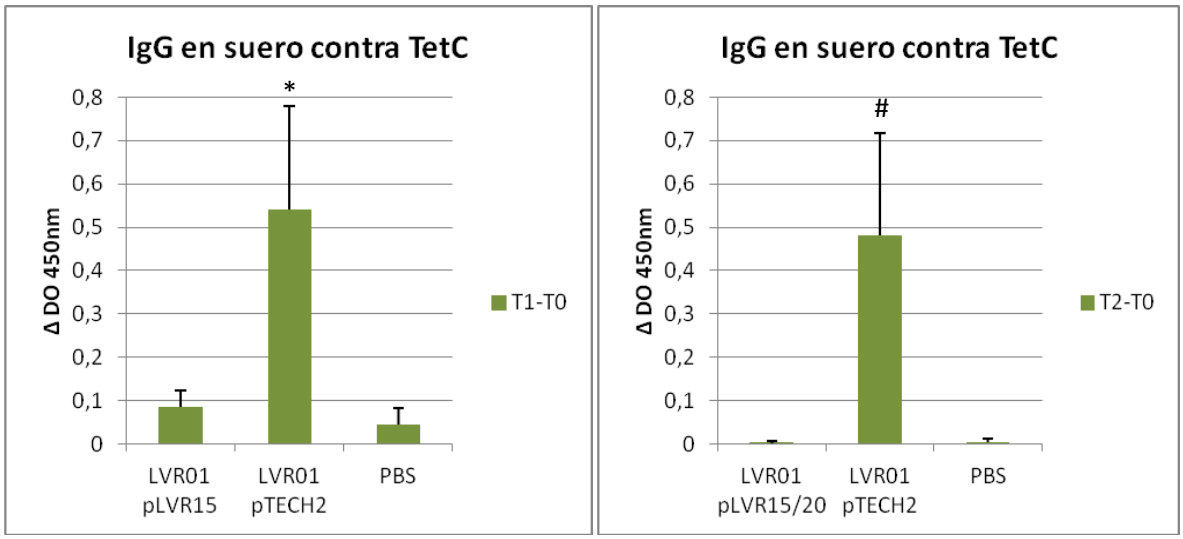


***Figura 24.*** Niveles de IgG anti-TetC en suero de ratones inmunizados con cuatro dosis de la construcción pLVR15 (T1) y luego con dos refuerzos de pLVR20 (T2), y controles pTECH2 y PBS. Se grafica el promedio de los resultados obtenidos para 10 animales por grupo y la correspondiente desviación estandar. Los niveles promedio de IgG anti-TetC en suero de los ratones inmunizados son significativamente diferentes entre el grupo control LVR01 pTECH2 y los demás grupos para T1 (*p < 0.01) y T2 (#p<0.001) según el test de Mann-Whitney.

También se realizaron ELISAs para evaluar los niveles de IgA en heces contra PrP de oveja, una vez que las muestras fueron preadsorbidas con los extractos bacterianos. Estos mostraron que tanto al tiempo T1 como T2 el grupo que recibió PrP alcanzó niveles de anticuerpos significativamente diferentes a los del grupo control PBS pero no a los del grupo que recibió la cepa LVR01 portando el vector vacío (Figura 25).

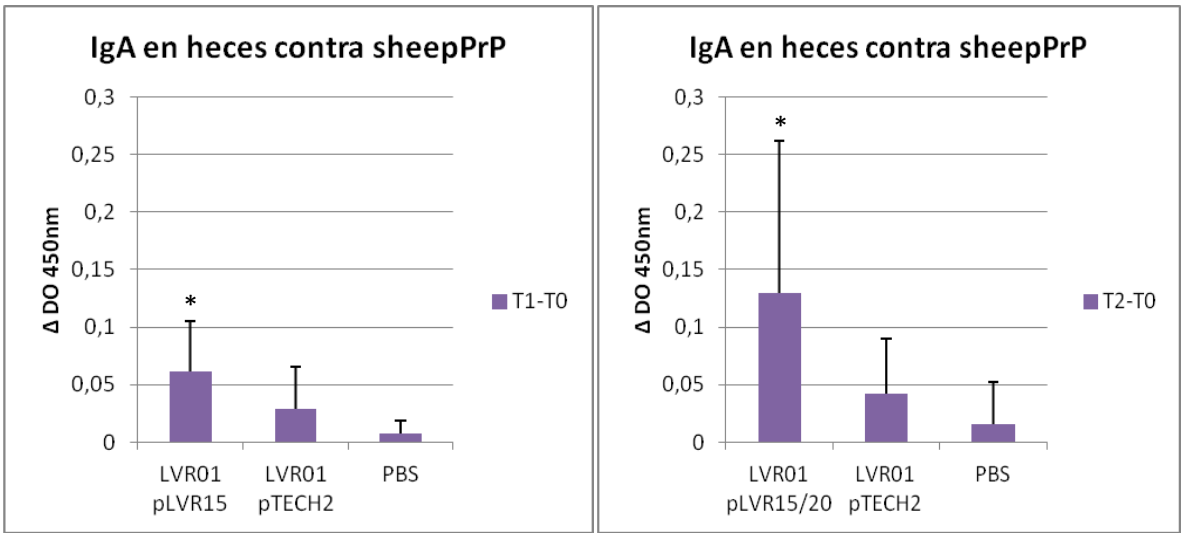


***Figura 25.*** Niveles de IgA anti-PrP en heces de los ratones inmunizados. Se grafica el promedio de los resultados obtenidos para 10 animales por grupo y la correspondiente desviación estandar. El grupo que recibió PrP es significativamente difrente al grupo PBS (*p<0.05) pero no al control pTECH2, para T1 y T2.

## 4.3 Ensayos preliminares de inmunización en ovejas.

Tres grupos de ovejas libres de *Salmonella* fueron inmunizadas oralmente con cuatro dosis de: *Salmonella* LVR01 portando la construcción pLVR15, *Salmonella* LVR01 transformada con pTECH2, o solución salina. Las ovejas fueron sangradas y se recolectaron heces y saliva antes y después de las cuatro dosis (T0 y T1 respectivamente) para medir la producción de anticuerpos a través del ensayo de ELISA. Al mes de la última dosis, los grupos recibieron a intervalos de una semana dos dosis iguales a las anteriores, salvo en el grupo con PrP, en los que se cambió el inóculo por *Salmonella* LVR01 portando la construcción pLVR20. Muestras de sangre, heces y saliva fueron tomadas nuevamente luego de las dos últimas dosis (T2). En ningún caso se observaron signos clínicos de salmonelosis en las ovejas inoculadas, indicando inocuidad de la cepa de *Salmonella* administrada.

Los ELISAs para evaluar el nivel de IgG en suero contra PrP de oveja mostraron que el grupo que recibió PrP desarrolló anticuerpos específicos anti-Prp obteniéndose valores significativamente mayores que los controles pTECH2 y PBS para T1 respecto a T0. Esta respuesta se mantuvo un mes después, luego de los dos refuerzos (Figura 26).

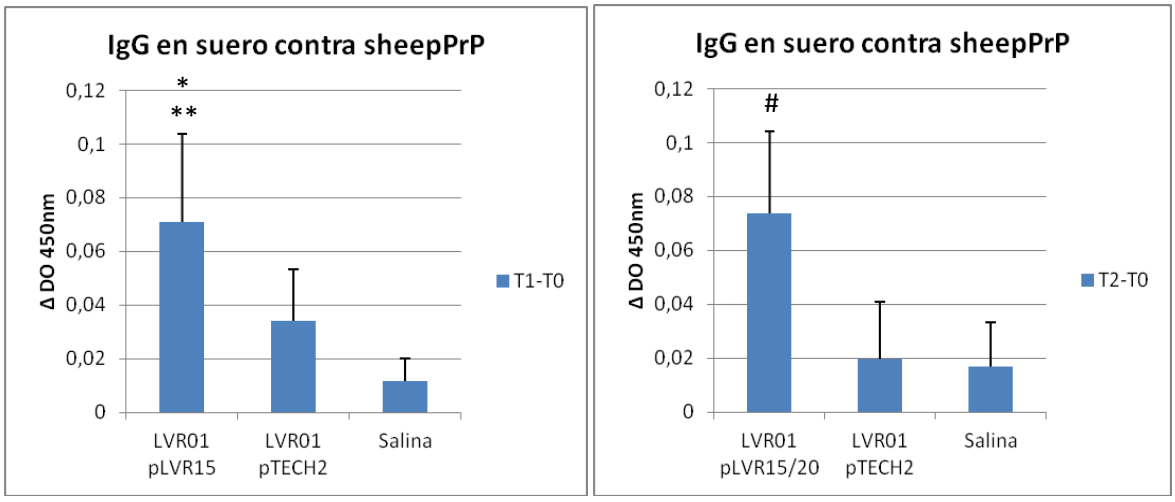


***Figura 26.*** Niveles promedio de IgG anti-PrP de oveja en suero de ovejas inmunizadas con cuatro dosis de la construcción pLVR15 (T1) y luego con dos refuerzos de pLVR20 (T2), y controles pTECH2 y salina. Se grafica el promedio de los resultados obtenidos para 10 animales por grupo y la correspondiente desviación estandar. El test de Mann-Whitney muestra que para T1 los niveles de IgG entre el grupo que recibió el PrP y los grupos control pTECH2 y PBS son significativamente diferentes (*$p < 0.05$ y **$p<0.005$ respectivamente), asi como también para T2 (#$p<0.05$).

En cuanto a la respuesta de IgG contra TetC en suero, el grupo que recibió el PrP y el grupo control pTECH2 alcanzaron niveles de anticuerpos significativamente mayores al grupo que recibió salina para T1 y T2 (Figura 27).

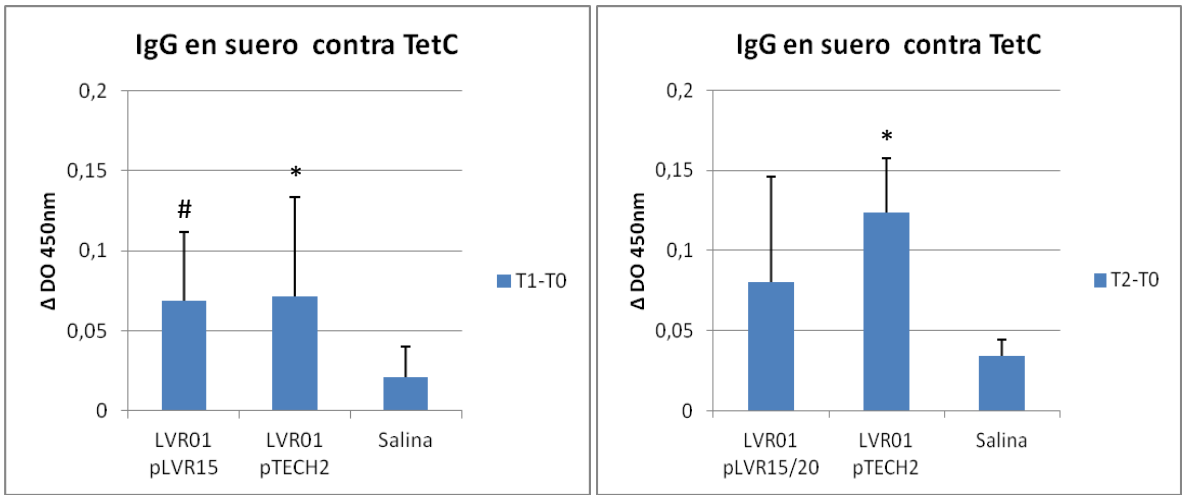


***Figura 27.*** Niveles promedio de IgG anti-TetC en suero de ovejas inmunizadas con cuatro dosis de la construcción pLVR15 (T1) y luego con dos refuerzos de pLVR20 (T2), y controles pTECH2 y salina. Se grafica el promedio de los resultados obtenidos para 10 animales por grupo y la correspondiente desviación estandar.Los niveles promedio de IgG anti-TetC en suero de las ovejas inmunizadas son significativamente diferentes entre el grupo control LVR01pTECH2 y el grupo que recibió salina para T1 y T2(*$p<0.05$), y entre el grupo que recibió PrP y el grupo que recibió salina para T1 (#$p<0.05$).

No se detectó respuesta de IgA en heces contra PrP de oveja en ningún punto analizado, así como tampoco respuesta de IgA en saliva (datos no mostrados).

# 5. DISCUSIÓN

Estudios previos realizados por nuestro grupo en colaboración con el grupo de los Dres. Goñi y Wisniewski permitieron demostrar la efectividad del uso de *Salmonella* LVR01 como vector para la expresión de PrP de ratón *in vivo*[154]. En ese trabajo, el vector bacteriano atenuado expresaba dos copias en tándem de la proteína PrP de ratón como fusión al fragmento C no tóxico de la toxina tetánica y bajo control del promotor inducible *in vivo* $P_{nirB}$. Esta construcción fue usada para vacunar ratones por la vía oral, demostrando por primera vez que la vacunación en mucosas con una cepa atenuada de *Salmonella* expresando el PrP de ratón era efectiva para quebrar la tolerancia a la proteína y llevaba a un atraso significativo o prevención de la enfermedad en ratones desafiados con *scrapie*. Esta vacuna de mucosas fue capaz de inducir anticuerpos IgA anti-PrP en el intestino e IgG anti-PrP a nivel sistémico. Los niveles de IgA a nivel local se correlacionaron con la respuesta terapéutica y no se evidenció toxicidad mediante este protocolo de vacunación. Las curvas de supervivencia luego del desafío con *scrapie* de los ratones vacunados indicaron que al día 300 luego del desafío oral, todos los animales del grupo control mostraron signos clínicos de la enfermedad, mientras que al día 500 luego del desafío, el 30% de los animales vacunados permanecía vivo y sin signos clínicos de la enfermedad o de toxicidad. Este hallazgo prometedor sugirió que este tipo de inmunización en mucosas podría ser un método útil para inducir inmunidad a un antígeno propio sin generar toxicidad.

En trabajos posteriores se optimizó el protocolo de vacunación y se estratificaron los resultados de los animales vacunados en grupos de altos y bajos respondedores en términos de su respuesta anti-PrP IgG sistémica e IgA en mucosas[155]. Esto permitió comprobar que el 100% de los ratones que presentaban títulos altos de IgA en mucosas e IgG sistémica antes del desafío, permanecieron sin síntomas de infección a los 400 días luego de la exposición al *scrapie*. Los cerebros de estos ratones clínicamente asintomáticos fueron examinados histológicamente y por Western Blot mostrando que estaban libres de PrPsc. Todos los animales del grupo control, y del grupo con títulos bajos de IgA y/o IgG anti-PrP mostraron signos clínicos de la

enfermedad para el día 205 luego del desafío. Estos resultados sugieren fuertemente que la vacunación efectiva en mucosas es un método útil para quebrar la tolerancia al PrP y prevenir la infección por la vía oral, que es la vía natural de infección.

Con el fin de desarrollar protocolos efectivos de inmunización en mucosas contra PrP de especies veterinarias que contribuyan a prevenir la propagación de *scrapie* y CWD, en este trabajo aplicamos la aproximación antes realizada en ratones, para generar vacunas a base de *Salmonella* atenuada que expresen PrP de alce y oveja. Es importante resaltar que el uso de una cepa atenuada de *Salmonella* atenuada elimina o disminuye el riesgo de desarrollar salmonelosis por parte del animal. Así, durante el desarrollo de los ensayos *in vivo* no se observaron signos de enfermedad en ningún animal.

Los resultados previos mostraban que la construcción en pTECH2 expresando dos copias en tándem del PrP de ratón, generaba buenos niveles de producción de la proteína. Sin embargo, al realizar construcciones similares pero con PrP de alce no logramos buenos niveles de expresión de la proteína. Los resultados obtenidos por Western Blot mostraron que el plásmido pTECH2 con la proteína clonada como fusión al fragmento C no tóxico de la toxina tetánica, tanto para una copia de PrP como para dos, generaba niveles muy bajos de la proteína de alce. Esto puede deberse a varias causas: una menor transcripción del gen, menor estabilidad del ARNm, menor traducción de la proteína, o incluso a una menor estabilidad proteica de la versión alce respecto a la versión ratón. La única diferencia entre estas construcciones que rindieron resultados tan distintos en niveles de proteínas es la secuencia de nucleótidos de los genes clonados. Si bien los genes PRNP de ratón y de alce son muy similares (82.1% de identidad a nivel de secuencia de nucléotidos y 87.1% de identidad a nivel de aminoácidos, ver ANEXO) existen diferencias puntuales que podrían explicar esta diferencia en los niveles de expresión y/o estabilidad de las proteínas resultantes.

La expresión del antígeno heterólogo como fusión a TetC se ha usado extensamente para aumentar la imunogenicidad del antígeno[154 187 188 189 190]. Sin embargo, con frecuencia se encuentran problemas al expresar antígenos como fusión a proteínas, que pueden estar relacionados con la solubilidad y la estabilidad de la proteína, así

como también su síntesis por diferencias en el uso de codones entre el organismo de origen y *Salmonella* o *E. coli*. Asumiendo como probable esta última posibilidad, intentamos mejorar la expresión del PrP de alce mediante el uso del plásmido pRARE. Este plásmido lleva los genes de ARNts para seis codones raros, y es usado para aumentar la expresión de proteínas eucariotas que contienen codones raramente usados en *E. coli*[183]. Cuando el ARNm de genes heterólogos es sobre expresado en *E. coli*, la traducción puede verse impedida por diferencias en el uso de codones, dada por la demanda de uno o más ARNt que son raros o ausentes en la población. Entonces la expresión de la proteína heteróloga puede ser muy baja. Para esto el ARNt de los codones raros es insertado en el vector de expresión o en un plásmido compatible. Sin embargo, no se logró mejorar la expresión de la proteína de alce mediante el uso de esta herramienta.

Otra aproximación que se empleó para lograr una buena expresión de PrP de alce fue cambiar el vector pTECH2 por el vector pBAD22. Este plásmido es un vector de expresión inducible por arabinosa, bajo control del promotor $P_{BAD}$. Si bien estos vectores han sido ampliamente usados para la expresión de proteínas en *E.coli*, *Salmonella enterica* y otras bacterias con buenos resultados[182 191 192 193], tampoco se logró mejorar la expresión de la proteína priónica de alce mediante esta construcción.

Finalmente, probamos con el vector pGEX-4T-1. Este vector permite la expresión del gen clonado como fusión a la glutatión S-transferasa (GST) en su extremo N-terminal, bajo control del promotor $P_{tac}$ inducible por IPTG y el represor $LacI^q$. La fusión de proteínas a GST es un método comúnmente usado para la expresión inducida de altos niveles de proteína y su purificación de los lisados bacterianos, así como también para la expresión de antígenos y la generación de respuestas inmunes específicas[194 195 196]. Mediante el clonado de *elkPrP* en el vector pGEX4T-1 (rindiendo el plásmido pLVR17), se logró mejorar notoriamente la expresión de la proteína, observándose un muy buen nivel de expresión mediante la inducción con IPTG. Sin embargo, la inducción de la expresión por IPTG bajo el control del promotor $P_{tac}$ hace que sea una opción costosa a la hora de producir grandes cantidades de inóculo, así como también requiere de la administración de IPTG al animal una vez inoculado para mantener la expresión *in vivo.*

Una estrategia comunmente usada para mejorar la estabilidad de un plásmido *in vivo*, es el uso de promotores inducibles *in vivo* para controlar la expresión de antígenos heterólogos. Un ejemplo de estos es el promotor $P_{nirB}$[197 198] . La expresión constitutiva del antígeno foráneo le impone una carga metabólica a la bacteria que usualmente favorece la pérdida del plásmido. Mediante el uso de promotores como $P_{nirB}$ la expresión del antígeno se mantiene mínima hasta que la bacteria recibe el estímulo apropiado *in vivo.*

Por esto hicimos una nueva construcción reemplazando el fragmento C de la toxina tetánica del plásmido pTECH2 por el fragmento GST-PrP de alce de la construcción en pGEX-4T-1. Así la construcción resultante, pLVR19, conserva la expresión del antígeno PrP como fusión a GST pero ahora bajo el control del promotor inducible *in vivo* $P_{nirB}$. El análisis por Western Blot de esta construcción muestra que los niveles de expresión de la proteína heteróloga son altos. Sin embargo, también notamos que la proteína expresada presenta un tamaño menor al esperado, 40kDa en lugar de 55kDa. Esto se puede deber a un clivaje de la fusión GST-PrP, el cual no afecta a la zona de PrP reconocida por el anticuerpo usado para revelar el blot. La construcción demostró ser la más estable con niveles del 98% de estabilidad *in vitro.*

En base a todos estos resultados, decidimos seleccionar las construcciones pLVR17 y pLVR19 para evaluar sus inmunogenicidades en la especie destino, alces, por nuestros colaboradores de la Universidad de Nueva York. Este trabajo está en curso.

En cuanto a la proteína PrP de oveja, ésta fue expresada eficientemente como fusión a TetC en el vector pTECH2, tanto la construcción llevando una sola copia de gen de PrP, pLVR13, como la que contiene dos copias, pLVR15, como muestra el análisis por Western Blot. Sin embargo, y a diferencia de lo observado para la construcción en pTECH2 con dos copias del gen de ratón (92% de estabilidad *in vitro*), la estabilidad de los plásmidos pLVR13 y pLVR15 resultó ser muy baja (0 y 22% de estabilidad *in vitro* respectivamente y valores cercanos a 0% de estabilidad *in vivo* para pLVR15). De nuevo, la única diferencia entre ambos grupos de construcciones (pTECH2-PRNP de ratón y pTECH2-PRNP de oveja) es la secuencia de los insertos clonados. Al realizar los alineamientos entre los genes PRNP de ratón y oveja vemos que son muy similares;

81.5% de identidad a nivel de nucleótidos y 87.1% de identidad a nivel de aminoácidos (ver ANEXO). Estas diferencias, a pesar de ser sutiles, podrían explicar las diferencias en los niveles de estabilidad plasmídica.

Un hecho que llama la atención al comparar las secuencias de los genes y proteínas de alce versus oveja es que, a pesar de ser tan altamente homólogos (97.8% de identidad a nivel de nucleótidos y 97.7% de identidad a nivel de aminoácidos, ver ANEXO), se obtengan niveles de proteínas tan distintos cuando clonados en el vector pTECH2, tanto para una como dos copias en tándem (ver en figura 19 las construcciones pLVR12 y pLVR14 versus pLVR13 y pLVR15). Estas diferencias de expresión sin embargo no se observan en las construcciones hechas tanto en pGEX4T-1 como en las construcciones híbridas $P_{nirB}$GST-PrP, lo que indica cómo la distinta combinación entre el vector de clonaje y el inserto clonado puede afectar el resultado final buscado, que es la expresión de las proteínas correspondientes.

Para el gen PRNP de oveja, también fue realizada la construcción en el vector pGEX-4T-1 la cual llamamos pLVR18, y se generó la construcción pLVR20, reemplazando TetC por la fusión GST-sheepPrP en pTECH2.

De todas las construcciones de oveja fueron seleccionadas pLVR15 y pLVR20 para la evaluación de su inmunogenicidad en ratones y ovejas. La proteína expresada como fusión a TetC presentaba buenos niveles de expresión, pero este plásmido presentó bajo porcentaje de estabilidad tanto *in vitro* como *in vivo*, mientras que la construcción donde PrP se expresa como fusión a GST bajo control de $P_{nirB}$ mostró ser la más estable y a su vez generar buenos niveles de proteína. Si bien en este último caso la proteína resultante presentaba un peso molecular menor al esperado, el hecho de que fuese reconocida por el anticuerpo específico sugería que podría mantener su inmunogenicidad. Los ensayos de estabilidad fueron realizados luego de comenzar con los ensayos en animales por lo que se comenzó usando la construcción pLVR15 y luego se utilizó la construcción pLVR20 como refuerzo.

Se inocularon ratones por vía oral en un régimen de cuatro dosis iniciales de la cepa LVR01 portando el pLVR15, y dos refuerzos de la misma cepa portando el pLVR20. Se

determinó la presencia de anticuerpos en suero y en heces contra PrP de oveja. En una primera instancia los ratones del grupo control inoculado con *Salmonella* LVR01 portando el plásmido pTECH2 vacío mostraron la existencia de una respuesta contra el antígeno PrP. Este resultado inesperado puede deberse a que el antígeno utilizado en el ELISA, la proteína priónica de oveja recombinante, fue producido en *E. coli*. Es probable que la purificación de la proteína, que fue donada por el Dr. Wisniewski, no fuera completa y que el preparado contuviera contaminantes proteicos o lipopolisacarídicos de origen bacteriano. *E. coli* y *Salmonella* pertenecientes ambas a la familia de las Enterobacterias, son lo suficientemente homólogas entre sí como para que exista la posibilidad de una reacción cruzada y que los anticuerpos anti-*Salmonella* producidos por los animales inmunizados se unan al remanente de *E. coli* presente en la preparación del antígeno utilizada para sensibilizar las placas de ELISA.

Se procedió entonces a incubar las muestras de sueros y heces con extractos bacterianos para evitar la posible reacción cruzada encontrada. Luego de este paso, se repitieron los ELISAs, obteniéndose resultados diferentes a los previos. El grupo que recibió PrP mostró niveles significativamente mayores de anticuerpos IgG anti-PrP en suero que los grupos control tanto luego de las cuatro dosis iniciales como luego de los refuerzos. También se determinó la presencia de anticuerpos anti-TetC en suero. Los resultados indicaron que el grupo control pTECH2 generó niveles significativamente más altos de anticuerpos anti-TetC que el grupo que recibió la fusión TetC-PrP. Esto puede deberse a que la expresión de TetC se ve disminuida cuando se expresa como fusión a un antígeno (resultados no mostrados).

Los niveles de anticuerpos IgA anti-PrP detectados en heces del grupo que recibió PrP también fueron mayores a los de los grupos control, aunque esta diferencia sólo fue significativa cuando se lo compara contra el grupo tratado con PBS.

Por otro lado, también se realizaron ensayos de inmunización en ovinos. No hay trabajos de vacunación contra PrP realizados en esta especie, y se ha publicado poco acerca de la inmunidad contra *Salmonella*. Los ovinos expuestos a *S*. *enterica* producen anticuerpos específicos contra esta bacteria. Por ejemplo, se ha demostrado que la inoculación de ovejas con una cepa mutante *aroA* de *S*. Typhimurium induce IgM

específica en suero acompañada por respuestas proliferativas fuertes de linfocitos B, pero las respuestas proliferativas de células T específicas son pobres[199 200]. Esto podría estar indicando que el sistema inmune humoral en ovejas responde de manera eficiente a la infección por *S. enterica* mientras que la inmunidad mediada por células es ineficiente en estos animales. Todavía queda por establecer si la respuesta humoral es protectiva frente a la salmonelosis ovina.

En esta tesis se realizó un ensayo preliminar de imunogenicidad en ovinos, en el cual se inocularon ovejas por vía oral con cuatro dosis iniciales de *Salmonella* LVR01 conteniendo la construcción con dos copias de PrP de oveja, y dos refuerzos de la misma cepa portando la construcción pLVR20. Luego se determinó la presencia de anticuerpos en suero, heces y saliva contra PrP de oveja.

No se detectaron anticuerpos IgA anti-PrP en heces así como tampoco en saliva. Sin embargo, sí se pudo detectar una respuesta específica anti-PrP en suero. El grupo que recibió PrP mostró niveles significativamente mayores de anticuerpos IgG anti-PrP que los grupos control tanto luego de las cuatro dosis iniciales como luego de los refuerzos. Los niveles de anticuerpos obtenidos en oveja fueron bajos, lo que concuerda con lo que se ha visto en trabajos previos. Ovejas inmunizadas con cepas de *Salmonella* atenuadas *aroA*, generaron niveles muy bajos de anticuerpos IgG específicos contra la bacteria en suero, como tampoco se detectaron anticuerpos IgA en heces[201 202 203 204]. En el caso particular de nuestros ensayos, también hay que considerar que al tratarse PrP de una proteína propia es de esperar que los niveles de anticuerpos generados sean bajos.

En cuanto a la presencia de anticuerpos anti-TetC en suero, el grupo que recibió PrP y el grupo control pTECH2 desarrollaron niveles de anticuerpos contra TetC en suero más altos que el control PBS luego de las cuatro dosis iniciales. Estos niveles se mantuvieron luego de los dos refuerzos un mes más tarde.

En su conjunto, estos resultados sugieren que el uso de *Salmonella* como vector para inmunización oral puede ser una herramienta eficiente para quebrar la tolerancia contra antígenos propios en esta especie de interés veterinario.

# 6. CONCLUSIONES

Cepas de *Salmonella* vivas atenuadas han sido ampliamente utilizadas durante las últimas dos décadas como vector de expresión de antígenos heterólogos para el desarrollo de vacunas, tanto preventivas como terapéuticas contra una variedad de enfermedades. El éxito de *Salmonella* como vector de inmunización se basa en sus cualidades para infectar células presentadoras de antígeno, el conocimiento existente acerca de su genética y patogénesis y en la plasticidad del sistema, que permite la modulación de la respuesta inmune generada.

Se ha descrito que en modelos murinos es posible inducir inmunidad protectiva en la mucosa gástrica quebrando la tolerancia al PrP usando *Salmonella* vivas atenuadas como vector para PrP. La infección oral es la principal ruta de transmisión del *prion* en muchas prionosis, y es por tanto central contar con métodos que permitan generar niveles de IgA secretoria suficientes como para prevenir la entrada del $PrP^{Sc}$ antes de que entre en contacto con el $PrP^{c}$. En este trabajo evaluamos la hipótesis de que también es posible inducir respuesta inmune en mucosas en especies veterinarias y quebrar la tolerancia al PrP, y así evaluar la capacidad de utilizar la ruta oral para la inmunización efectiva de estas especies.

Por un lado, desarrollamos vectores de *Salmonella* que expresan la proteína priónica de alce u oveja para su evaluación inicial en modelos murinos y posteriormente en especies destino. Se realizaron distintas construcciones buscando generar la que mejor exprese la proteína y a la vez sea estable *in vivo.* Se eligieron dos construcciones que cumplían con estas características para su uso en ensayos de inmunogenicidad en ratones y ovinos. La respuesta inmune generada en ratones y ovejas contra la proteína priónica de oveja se evaluó luego de la inmunización por vía oral con distintas construcciones de *Salmonella* portando los diversos plásmidos. Los ensayos en ratones mostraron que es posible generar una respuesta inmune contra PrP tanto en mucosas como a nivel sistémico, con un régimen de administraciones orales repetidas. En cuanto al ensayo de inmunogenicidad en ovinos, la mayoría de los estudios recientes en EETs para esta especie usan ratones transgénicos, y muy poco se ha trabajado en el

huésped natural. Los resultados obtenidos en esta tesis mostraron que es posible generar una respuesta inmune humoral sistémica mediante la inmunización por vía oral, aunque tal como se reporta en trabajos previos de inmunización oral con cepas de *Salmonella* atenuadas, los niveles de anticuerpos generados fueron bajos y no fue posible detectar anticuerpos a nivel de mucosas. Tampoco fue posible evaluar si la respuesta inmune generada en ambos modelos es protectora frente a un desafío con *scrapie*, ya que está prohibido el ingreso de PrP*Sc* siendo este país una zona libre de la enfermedad. En el contexto de esta Maestría no se evaluó la respuesta inmune celular generada, aunque este trabajo será realizado en el futuro inmediato.

En conclusión, los trabajos realizados en esta tesis son una contribución inicial al estudio de la inmunización en mucosas mediante el uso de *Salmonella* atenuadas para aportar información para el desarrollo de nuevas terapias profilácticas para enfermedades priónicas.

Sin embargo, queda mucho trabajo por hacer, probando con otros vectores de expresión diferentes, promotores y proteínas de fusión, debido a su posible efecto sobre la respuesta inmune generada y su estabilidad; el vector vivo es otra variable a tener en cuenta, ya que diferentes cepas inducen distintas respuestas. También se puede evaluar la posibilidad de co-administrar citoquinas mediante este sistema, esta sería una forma alternativa de modular la respuesta inmune, mejorando la inmunogenicidad del sistema.

# 7. REFERENCIAS


[1]Prusiner, S. B., (2001) Neurodegenerative diseases and prions N Eng J Med. 344(20), 1516–1526.

[2]Wisniewski, T., Aucouturier, P., Soto, C., Frangione, B. (1998) The prionoses and other conformational disorders. Amyloid 5, 212–224.

[3] Aguzi A., Sigurdson C., Heikenwalder M. (2008) Molecular mechanisms of prion pathogenesis. Annu Rev Pathol 3, 11-40

[4] Prusiner, S. B. (1982)Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**, 136–144.

[5] Lee et al. (1998) Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. Genome Res. 8, 1022-1037

[6] Mahal et al. (2001) Isolation and functional characterization of the promoter region of the human prion protein gene. Gene 268 105-114.

[7] Stahl N., Bladwin M.A., Burlingame A.L. and Prusiner S.B. (1990). Identification of glycoinositol phospholipid linked and truncated forms of the scrapie prion protein. Biochemistry 29, 8879-8884.

[8] Mitteregger G. et al. (2009) Role of copper and manganese in prion disease progression. Brian Res 1292, 155-164.

[9] Davies P. et al. (2009) Manganese enhaces prion protein survival in model soils and increases prion infectivity to cells. Plos One 4(10) e7518

[10] Brazier et al. (2010) Manganese chelation therapy extends survival in a mouse model of M1000 prion disease. J Neurochem 14(2), 440-451.

[11] Sigurdson EM, et al (2003) Copper chelation delays the onset of prion disease. J Biol Chem 278, 46199-202.

[12] Knight R.S. and Will R.G. (2004). Prion diseases. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 75, 36-42.

[13] Westergard et al. (2007) The celular prion protein (PrPc): its physiological function and role in disease. Biochim Biophys Acta. 1772 (6): 629-644.

[14] Linden R. et al. (2008) Physiology of the prion protein. Physiol Rev 88(2), 673-728

[15] Collinge J., Whittington M.A., Sidle K.C., Smith C.J., Palmer M.S., Clarke A.R. and Jefferys J.G. (1994). Prion protein is necessary for normal synaptic function. Nature 370, 295-297.

[16] Sandra E. Encalada, Kenneth L. Moya, Sylvain Lehmann and Ralph Zahn. (2008) The Role of the Prion Protein in the Molecular Basis for Synaptic Plasticity and Nervous System Development. JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE Volume 34, Number 1, 9-15.

[17]Aucouturier, P., Carnaud C. (2002) The immune sistem and prion diseases: a relationship pf complicity and blindness, Journal of Leukocyte Biology 72, 1075- 1083.

[18] Kocisko D.A., Come J.H., Priola S.A., Chesebro B., Raymond G.J., Lansbury P.T. and Caughey B. (1994). Cell-free formation of protease-resistant prion protein. Nature 370, 471-474.

[19] Aguzzi A., Montrasio F. and Kaeser P.S. (2001). Prions: health scare and biological challenge. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2, 118-126.

[20] Diaz-Espinoza R, Soto C. (2010) Generation of prions in vitro and the protein-only hypothesis. Prion;4(2):53-9.

[21] Jarrett J.T. and Lansbury P.T. Jr (1993). Seeding 'one-dimensional crystallization' of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? Cell 73, 1055-1058.

[22] Michalczyk et al. (2007) Current concepts in human prion protein (prp) misfolding, Prnp gene polymorphisms and their contribution to CJD. Histol Histopathol 22: 1149-1159

[23]Marsh, R.F., Kincaid, A.E., Bessen, R.A., and Bartz, J.C. (2005) Interespecies transmisión of chronic wasting disease prions to squirrel monkeys (Saimiri sciureus). Journal of Virology 79:13794-13796.

[24] Priola SA. (1999) Prion protein and species barriers in the transmissible spongiform encephalopathies. *Biomed Pharmacother* 53:27–33.

[25] Collinge J, Clarke AR. (2007) A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science* 318:930–936.

[26] Moore RA, Vorberg I, Priola SA. (2005) Species barriers in prion diseases-brief review. *Arch Virol Suppl* 19:187–202.

[27] Passos, D.T., Ribeiro, L.A.O., Rodrigues, N.C., Hepp, D. and Weimer, T.A. 2008. PrP polymorphisms in Brazilian sheep. *Small Ruminant Res.,* 74: 130-133.

[28] Williams ES. (2003) Scrapie and chronic wasting disease. *Clin Lab Med* 23:139–159.

[29] Mohan J., Brown K.L., Farquhar C.F., Bruce M.E., Mabbott N.A., (2004) Scrapie transmission following exposure through the skin is dependent on follicular dendritic cells in lymphoid tissues, J. Dermatol. Sci. 35:101–111.

[30] Scott J.R., Foster J.D., Fraser H., (1993) Conjunctival instillation of scrapie in mice can produce disease, Vet. Microbiol. 34:305–309.

[31] Taylor D.M., McConnell I., Fraser H., (1996) Scrapie infection can be established readily through skin scarification in immunocompetent but not immunodeficient mice, J. Gen. Virol. 77:1595–1599.

[32] Brotherston J.G., Renwick C.C., Stamp J.T., Zlotnik I., (1968) Spread of scrapie by contact to goats and sheep, J. Comp. Path. 78:9–17.

[33] Dickinson A.G., Stamp J.T., Renwick C.C., (1974) Maternal and lateral transmission of scrapie in sheep, J. Comp. Pathol. 84:19–25.

[34] Dickinson A.G., Scrapie in sheep and goats, in: Kimberlin R.H. (Ed.), Slow virus diseases of animals and man, North Holland Publishing Company, Amsterdam, the Netherlands, 1976, pp. 209–241.

[35] Hoinville L.J., (1996) A review of the epidemiology of scrapie in sheep, Rev.-Off. Int. Epizoot 15:827–852.

[36] Ligios C., Sigurdson C.J., Santucciu C., Carcassola G., Manco G., Basagni M., Maestrale C., Cancedda M.G., Madau L., Aguzzi A., (2005) PrPSc in mammary glands of sheep affected by scrapie and mastitis, Nat. Med. 11:1137–1138.

[37] Siso S., Gonzalez L., Jeffrey M., Martin S., Chianini F., Steele P., (2006) Prion protein in kidneys of scrapie-infected sheep, Vet. Rec. 159:327–328.

[38] Vascellari M., Nonno R., Mutinelli F., Bigolaro M., Di Bari M.A., Melchiotti E., Marcon S., D'Agostino C., Vaccari G., Conte M., De Grossi L., Rosone F., Giordani F., Agrimi U., (2007) PrPSc in salivary glands of scrapie-affected sheep, J. Virol. 81:4872–4876.

[39] Holada K, Vostal JG, Theisen PW, et al. (2002) Scrapie infectivity in hamster blood is not associated with platelets. *J Virol* 76:4649–4650.

[40] Andréoletti O., Lacroux C., Chabert A., Monnereau L., Tabouret G., Lantier F., Berthon P., Eychenne F., Lafond Benestad S., Elsen J.M., Schelcher F., (2002) PrP(Sc) accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission, J. Gen. Virol. 83:2607–2616.

[41] Brotherston J.G., Renwick C.C., Stamp J.T., Zlotnik I., (1968) Spread of scrapie by contact to goats and sheep, J. Comp. Path. 78:9–17.

[42] Dickinson A.G., Stamp J.T., Renwick C.C., (1974) Maternal and lateral transmission of scrapie in sheep, J. Comp. Pathol. 84:19–25.

[43] Ryder S., Dexter G., Bellworthy S., Tongue S., (2004) Demonstration of lateral transmission of scrapie between sheep kept under natural conditions using lymphoid tissue biopsy, Res. Vet. Sci. 76:211–217.

[44] Foster J., McKenzie C., Parnham D., Drummond D., Goldmann W., Stevenson E., Hunter N., (2006) Derivation of a scrapie-free sheep flock from the progeny of a flock affected by scrapie, Vet. Rec. 159:42–45.

[45] Ryan MT, Sweeney T. (2005)Genetic susceptibility to scrapie in sheep: a clinically relevant theme in veterinary medical education. *J Vet Med Educ* 32:544–550.

[46] Luhken G, Buschmann A, Brandt H, et al. (2007) Epidemiological and genetical differences between classical and atypical scrapie cases. *Vet Res* 38:65–80.

[47] Le Dur A, Beringue V, Andreoletti O, et al. (2005) A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16031–16036.

[48] Konold T, Davis A, Bone GE, et al. (2006) Atypical scrapie cases in the UK. *Vet Rec* 158:280.

[49] Seuberlich T, Heim D, Zurbriggen A.(2010) Atypical transmissible spongiform encephalopathies in ruminants: a challenge for disease surveillance and control. J Vet Diagn Invest. Nov;22(6):823-42

[50] Korth C, Stierli B, Streit P, Moser M, Schaller O, et al. (1997) Prion (PrPSc)-specific epitope defined by a monoclonal antibody. Nature 390:74–77.

[51] Nonno R, Di Bari MA, Cardone F, Vaccari G, Fazzi P, et al. (2006) Efficient transmission and characterization of Creutzfeldt–Jakob disease strains in bank voles. PLoS Pathogens 2(2): e12. DOI: 10.1371/journal.ppat.0020012

[52] Baker HF, Ridley RM, Wells GA.(1993) Experimental transmission of BSE and scrapie to the common marmoset. *Vet Rec*132:403–406.

[53] Laude H, Vilette D, Le Dur A, et al.(2002) New in vivo and ex vivo models for the experimental study of sheep scrapie: development and perspectives. *C R Biol* 325:45–57.

[54] Wells G.A.H., Scott A.C., Johnson C.T., Gunning R.F., Hancock R.D., Jeffrey M., Bradley R., Dawson M., (1987) A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle, Vet. Rec. 121:419–420.

[55] Artigas, R., Passos, D., Hepp, D., Weimer, T. y Postiglioni, A.(2011) Polimorfismos de los codones 136 Y 171 del den *PrP* en una majada de ovino criollo del Uruguay. *Arch. Zootec. 60 (231): 817-820. 2011*

[56] Collee JG, Bradley R. (1997) BSE: a decade on—Part I. *Lancet* 349:636–641.

[57] Collee JG, Bradley R. (1997) BSE: a decade on—Part II. *Lancet* 349:715–721.

[58] Schonberger LB. (1998) New-variant Creutfeldt-Jakob disease and bovine spongiform encephalopathy: the strengthening etiologic link between two emerging diseases. In: Scheld WM, Craig WA, Hughes JM, eds. *Emerging infections 2*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1–15.

[59] Will RG, Ironside JW, Zeidler M, et al. (1996) A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 347:921–925

[60] Will RG, Zeidler M, Stewart GE, et al. (2000) Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 47:575–582.

[61] Zerr I, Poser S. (2004) Epidemiology and risk factors of transmissible spongiform encephalopathies in man. *Contrib Microbiol* 11:98–116.

[62] van Duijn CM, Delasnerie-Laupretre N, Masullo C, et al. (1998) Casecontrol study of risk factors of Creutzfeldt-Jakob disease in Europe during 1993–95. European Union (EU) Collaborative Study Group of Creutzfeldt-Jakob disease (CJD). *Lancet* 351:1081–1085.

[63] Ward HJ, Everington D, Cousens SN, et al. (2006) Risk factors for variant Creutzfeldt-Jakob disease: a case-control study. *Ann Neurol* 59:111–120.

[64] Baeten L.A., Powers B.E., Jewell J.E., Spraker T.R., Miller M.W., (2007) A natural case of chronic wasting disease in a free-ranging moose (*Alces alces shirasi*), J. Wildl. Dis. 43:309–314

[65] Williams E.S., Young S., (1982) Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy, J. Wildl. Dis. X 16:89–98.

[66] Williams E.S., Young S., (1982) Spongiform encephalopathy of Rocky Mountain elk, J. Wildl. Dis. 18:465–471.

[67] Dubé C., Mehren K.G., Barker I.K., Peart B.L., Balachandran A., (2006) Retrospective investigation of chronic wasting disease of cervids at the Toronto Zoo, 1973-2003, Can. Vet. J. 47:1185–1193.

[68] Williams E.S., (2005) Chronic wasting disease, Vet. Pathol. 42:530–549.

[69] Belay ED, Maddox RA, Williams ES, et al. (2004) Chronic wasting disease and potential transmission to humans. *Emerg Infect Dis* 10:977–984.

[70] Williams E.S., Young S., (1980) Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy, J. Wildl. Dis. 16:89–98.

[71] Sigurdson CJ. (2008) A prion disease of cervids: chronic wasting disease. Vet Res. Jul-Aug;39(4):41.

[72] Watts J.C., Balachandran A., Westaway D., (2006) The expanding universe of prion diseases, PLoS Pathog. 2:e26.

[73] Aguzzi A., Polymenidou M., (2004) Mammalian prion biology. One century of evolving concepts, Cell 116:313–327.

[74] O'Rourke K.I., Besser T.E., Miller M.W., Cline T.F., Spraker T.R., Jenny A.L., et al., (1999) PrP genotypes of captive and free-ranging Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*) with chronic wasting disease, J. Gen. Virol. 80:2765–2769.

[75] Jewell J.E., Conner M.M., Wolfe L.L., Miller M.W., Williams E.S., (2005) Low frequency of PrP genotype 225SF among free-ranging mule deer (*Odocoileus hemionus*) with chronic wasting disease, J. Gen. Virol. 86:2127–2134.

[76] Angers R.C., Browning S.R., Seward T.S., Sigurdson C.J., Miller M.W., Hoover E.A., Telling G.C., (2006) Prions in skeletal muscles of deer with chronic wasting disease, Science 311:1117.

[77] Mawhinney S., Pape W.J., Forster J.E., Anderson C.A., Bosque P., Miller M.W., (2006) Human prion disease and relative risk associated with chronic wasting disease, Emerging Infect. Dis. 12:1527–1535.

[78] Kong Q., Huang S., Zou W., Vanegas D., Wang M.,Wu D., et al., (2005) Chronic wasting disease of elk: transmissibility to humans examined by transgenic mouse models, J. Neurosci. 25:7944–7949.

[79] Sandberg M. (2010) Chronic wasting disease prions are not transmissible to transgenic mice over-expressing human prion protein. J Gen Virol 91(10) 2651-2657

[80] Marsh R.F., Kincaid A.E., Bessen R.A., Bartz J.C., (2005) Interspecies transmission of chronic wasting disease prions to squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*), J. Virol. 79:13794–13796.

[81] Schätzl H.M., Da CostaM., Taylor L., Cohen F.E., Prusiner S.B., (1995)Prion protein gene variation among primates, J. Mol. Biol. 245:362–374.

[82] Safar JG. (2008) Transmission and detection of prions in feces. J Infect Dis 198(1), 81-89.

[83] Mathiason et al. (2010) B cells and patelets harbor prion infectivity in the blood of deer infected with chronic wasting disease. J Virol 84(10), 5097-5107.

[84] Haley NJ. (2009) Detection of CWD prions in urine and saliva of deer by transgenic mouse bioassay. Plos One 4(3), e4848

[85] Denkers ND. (2010) Aerosol and nasal transmission of chronic wasting disease in cervidized mice. J Gen Virol 91(6), 1651-1658.

[86] Browning S.R., Mason G.L., Seward T., Green M., Eliason G.A., Mathiason C., et al., (2004) Transmission of prions from mule deer and elk with chronic wasting disease to transgenic mice expressing cervid PrP, J. Virol. 78:13345–13350.

[87] Kong Q., Huang S., Zou W., Vanegas D., Wang M.,Wu D., et al., (2005) Chronic wasting disease of elk: transmissibility to humans examined by transgenic mouse models, J. Neurosci. 25:7944–7949.

[88] LaFauci G., Carp R.I., Meeker H.C., Ye X., Kim J.I., Natelli M., et al., (2006) Passage of chronic wasting disease prion into transgenic mice expressing Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*) PrPC, J. Gen. Virol. 87:3773–3780.

[89] Meade-White K., Race B., Trifilo M., Bossers A., Favara C., Lacasse R., et al., (2007) Resistance to chronic wasting disease in transgenic mice expressing a naturally occurring allelic variant of deer prion protein, J. Virol. 81:4533–4539.

[90]Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H. & Bostock, C. J. (1997). Transmissions to mice indicate that `new variant ' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389, 498±501.

[91]Hill, A. F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K. C. L., Gowland, I. & Collinge, J. (1997). The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 389, 448±450.

[92] Gambetti P. et al. (2008) A novel human disease with abnormal prion protein sensitive to protease. Ann Neurol 63, 697-708

[93]Gilch, S., Schätzl, H.M. (2003) Promisig developements bringing prion diseases closer to therapy and prophylaxis. Trends in Mol. Medicine 9, 367- 369

[94] Glatzel M, Ott PM, Lindner T, et al. (2003) Human prion diseases: epidemiology and integrated risk assessment. *Lancet Neurol*. 2:757-763.

[95] Hsiao K, Baker HF, Crow TJ, et al. (1989) Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature*. 338:342-345.

[96] Brown P, Preece M, Brandel JP, et al. (2000) Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease at the millennium. *Neurology*. 55:1075-1081.

[97] Aguzzi A, Weissmann C. (1996) Spongiform encephalopathies: a suspicious signature. *Nature*. 383:666-667.

[98] Gambetti P, Kong Q, Zou W, Parchi P, Chen SG. (2003) Sporadic and familial CJD: classification and characterisation. *Br Med Bull*. 66:213-239.

[99] Hill AF, Joiner S, Wadsworth JD, et al. (2003) Molecular classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain* 126:1333-1346.

[100] Harder A, Jendroska K, Kreuz F, et al. (1999) Novel twelvegeneration kindred of fatal familial insomnia from Germany representing the entire spectrum of disease expression. *Am J Med Genet* 87: 311-316.

[101] Windl O, Giese A, Schulz-Schaeffer W, et al. (1999) Molecular genetics of human prion diseases in Germany. *Hum Genet*.;105:244-252.

[102] Ghetti B, Dlouhy SR, Giaccone G, et al. (1995) Gerstmann-Straussler-Scheinker disease and the Indiana kindred. *Brain Pathol*.;5:61-75.

[103] Glatzel et al. (2005) Human Prion Diseases, molecular and clnical aspects. *Arch Neurol.62:545-552*

[104] Padovani A, D'Alessandro M, Parchi P, et al. (1998) Fatal familial insomnia in a new Italian kindred. *Neurology*.;51:1491-1494.

[105] Brown P, Preece M, Brandel JP, et al. (2000) Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease at the millennium. *Neurology*.;55:1075-1081.

[106]Hamaguchi T, (2009) The risk of iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease through medical and surgical procedures Neuropathology. 29(5):625-31.

[107] Collins SJ, Lawson VA, Masters PC. (2004) Transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet*.;363:51-61.

[108] Aguzzi A. (1996) Between cows and monkeys. *Nature*.;381:734.

[109] Ironside JW. (2010) Variant Creutzfeld-Jakob disease. Hemophilia 16 (suppl. 5), 175-180.

[110] Valleron AJ, Boelle PY, Will R, Cesbron JY. (2001) Estimation of epidemic size and incubation time based on age characteristics of vCJD in the United Kingdom. *Science*.;294:1726-1728.

[111] Salinas D., Lewin S., Perna A., Salamano R., Ketzoian C., Rodriguez M., Mañana G., Vernengo L. (2007) Enfermedades prionicas en el ser humano en el Uruguay: registro de los últimos 20 años. Arch Med Interna XXIX (1): 8-13.

[112] Heppner F.L., Christ A.D., Klein M.A., Prinz M., Fried M., Kraehenbuhl J.P., Aguzzi A., (2001) Transepithelial prion transport by M cells, Nat. Med. 7:976–977.

[113] Neutra M.R., Pringault E., Kraehenbuhl J.P., (1996) Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses, Annu. Rev. Immunol. 14:275–300.

[114] Mishra R.S., Basu S., Gu Y., Luo X., Zou W. Q., Mishra R., Li R., Chen S. G., Gambetti P., Fujioka H., Singh N., (2004) Protease-resistant human prion protein and ferritin are cotransported across Caco-2 epithelial cells: implications for species barrier in prion uptake from the intestine, J. Neurosci. 24:11280–11290.

[115] Rescigno M., Rotta G., Valzasina B., Ricciardi Castagnoli P., (2001) Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers, Immunobiology 204:572–581.

[116] Rescigno M., Urbano M., Valzasina B., Francolini M., Rotta G., Bonasio R., Granucci F., Kraehenbuhl J.P., Ricciardi Castagnoli P., (2001)Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria, Nat. Immunol. 2:361–367.

[117] Kujala P, Raymond CR, Romeijn M, Godsave SF, van Kasteren SI, et al. (2011) Prion Uptake in the Gut: Identification of the First Uptake and Replication Sites. PLoS Pathog 7(12): e1002449.

[118] Andréoletti O., Berthon P., Marc D., Sarradin P., Grosclaude J., van Keulen L., Schelcher F., Elsen J. M., Lantier F., (2000) Early accumulation of PrP(Sc) in gutassociated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie, J. Gen. Virol. 81:3115–3126.

[119] Hadlow W.J., Kennedy R.C., Race R.E., (1982) Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus, J. Infect. Dis. 146:657–664.

[120] Van Keulen L.J.M., Vromans M.E.W., van Zijderveld F.G., (2002) Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep, APMIS 110:23–32.

[121] Loeuillet C, Lemaire-Vieille C, Naquet P, Cesbron-Delauw MF, Gagnon J, Cesbron JY. (2010) Prion replication in the hematopoietic compartment is not required for neuroinvasion in scrapie mouse model. PLoS One. 5;5(10). pii: e13166.

[122] Jeffrey M., Gonzalez L., (2007) Classical sheep transmissible spongiform encephalopathies: pathogenesis, pathological phenotypes and clinical disease, Neuropathol. Appl. Neurobiol. 33:373–394.

[123] Van Keulen L.J.M., Schreuder B.E.C., Vromans M.E.W., Langeveld J.P.M., Smits M.A., (1999) Scrapie associated prion protein in the gastro-intestinal tract of sheep with natural scrapie, J. Comp. Pathol. 121:55–63.

[124] Bueler HR, et al. (1993) Mice devoid or PrP are resistant to scrapie. Cell; 73:1339-47

[125] Mc Bride et al. (1992) PrP protein is asociated with folicular dendritic cells of spleen and lymph nodes in uninfected and scrapie infected mice. J Pathol; 168:413-8

[126] Prinz et al. (2002) Lymph nodal prion replication and neuroinvasion in mice devoid of follicular dendritic cells. Proc Natl Acad Sci USA; 99:919-24.

[127] Montrasio et al. (2000) Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. Science;288:1257-9.

[128] Aguzzi et al. (2005) Prions, cytokines and chemokines:a meeting in lympoid organs. Immunity;22:145-54.

[129] Aucouturier et al. (2001) Infected splenic dendritic cells are suficient for prion transmision to the CNS in mouse scrapie. J Clin Invest; 108: 703-8.

[130] Jeffrey et al. (2000) Sites of prion protein accumulation in scrapie-infected mouse spleen revealed by immuno-electron microscopy. J Pathol; 191:323-32

[131] Carp, R. I., and Callahan, S. M., (1981) In vitro interaction of scrapie agent and mouse peritoneal macrophages. *Intervirology* 16, 8–13.

[132] Gwynivere et al. (2006) Prion diseases and the gastrointestinal tract. Can J Gastroenterol;20:18-24

[133] Bruce M.E., Brown K.L.,Mabbott N.A., Farquhar C.F., Jeffrey M., (2000) Follicular dendritic cells in TSE pathogenesis, Immunol. Today 21:442–446.

[134] Van Keulen et al. (2008) TSE pathogenesis in cattle and sheep. Vet. Res. 39:24

[135] Herrmann L.M., Baszler T.V., Knowles D.P., Cheevers W.P., (2002) PrP(Sc) is not detected in peripheral blood leukocytes of scrapie-infected sheep: determining the limit of sensitivity by immunohistochemistry, Clin. Diagn. Lab. Immunol. 9:499–502.

[136] Jackman R., Everest D.J., Schmerr M.J., Khawaja M., Keep P., Docherty J., (2006) Evaluation of a preclinical blood test for scrapie in sheep using immunocapillary electrophoresis, J. AOAC Int. 89:720–727.

[137] Schmerr M.J., Jenny A.L., Bulgin M.S., Miller J.M., Hamir A.N., Cutlip R.C., Goodwin K.R., (1999) Use of capillary electrophoresis and fluorescent labeled peptides to detect the abnormal prion protein in the blood of animals that are infected with a transmissible spongiform encephalopathy, J. Chromatogr. A 853:207–214.

[138] Iwata N., Sato Y., Higuchi Y., Nohtomi K., Nagata N., Hasegawa H., Tobiume M., Nakamura Y., Hagiwara K., Furuoka H., Horiuchi M., Yamakawa Y., Sata T., (2006) Distribution of PrP(Sc) in cattle with bovine spongiform encephalopathy slaughtered at abattoirs in Japan, Jpn. J. Infect. Dis. 59:100–107

[139] Furnes et al. (2003) The enteric nervous system and its extrinsic connections. Textbook of Gastroenterology, 4th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 12-33.

[140] Hoffmann C., Ziegler U., Buschmann A., Weber A., Kupfer L., Oelschlegel A., Hammerschmidt B., Groschup M.H., (2007) Prions spread via the autonomic nervous system from the gut to the central nervous system in cattle incubating bovine spongiform encephalopathy, J. Gen. Virol. 88:1048–1055.

[141] Lil L., Napper S., Cashman NR. (2010) Immunotherapy for prion diseases: opportunities and obstacles. Immunotherapy 2(2), 269-282

[142] Brazier MW. Et al. (2009) Therapeutic interventions ameliorating prion disease. Anti Infect Ther 7(1), 83-105.

[143] Berg, L. J., (1994) Insights into the role of the immune system in prion diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 429–432

[144] Prusiner, S. B., Groth, D., Serban, A., Koehler, R., Foster, D., Torchia, M., Burton, D., Yang, S. L., and DeArmond, S. J., (1993) Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10608–10612.

[145] Williamson, R. A., Peretz, D., Smorodinsky, N., Bastidas, R., Serban, H., Mehlhorn, I., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., and Burton, D. R., (1996) Circumventing tolerance to generate autologous monoclonal antibodies to the prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 7279–7282.

[146] Porter, D. D., Porter, H. G., and Cox, N. A., (1973) Failure to demonstrate a humoral immune response to scrapie infection in mice. *J. Immunol.* 111, 1407–1410,

[147] Manuelidis L (1998) Vaccination with an attenuated Creutzfeldt-Jakob disease strain prevents expression of a virulent agent. Proc Natl Acad Sci USA 95, 2520–2525.

[148] Pankiewicz J, Prelli F, Sy MS, Kascsak RJ, Kascsak RB, Spinner DS, Carp RI, Meeker HC, Sadowski M & Wisniewski T (2006) Clearance and prevention of prion infection in cell culture by anti-PrP antibodies. Eur J Neurosci 24, 2635–2647.

[149] Sigurdsson EM, Sy MS, Li R, Scholtzova H, Kascsak RJ, Kascsak R, Carp RI, Meeker HC, Frangione B & Wisniewski T (2003) Anti-PrP antibodies for prophylaxis following prion exposure in mice. Neurosci Lett 336, 185–187.

[150] Wisniewski T. et al. (2007) Is vaccination against transmisible spongiform encephalopaties feasible? Sci Tech Rev 26(1) 243-251.

[151] Wisniewski T., Goñi F. (2010) Immunomodulation for prion and prion-related diseases. Expert Rev Vaccines 9(12),

[152]Beekes, M., and McBride, P.A., (2007) The spread of prions through the body in naturally acquired transmisible spongiform ebcephalopathies. FEBS J; 274: 588- 605

[153] Sadowski M & Wisniewski T (2007) Disease modifying approaches for Alzheimer's pathology. Curr Pharm Des 13, 1943–1954.

[154]Goñi, F., Knudsen E, Schreiber F, Scholtzova H, Pankiewicz J, Carp R, Meeker HC, Rubenstein R, Brown DR, Sy MS, Chabalgoity JA, Sigurdsson EM, Wisniewski T. (2005) Mucosal vaccination delays or prevents prion infection via an oral route. Neurosci.; 133 : 413-421

[155]F. Goñi, F. Prelli, F. Schreiber, H. Scholtzova, E. Chung, R. Kascsak, D. R. Brown, E. M. Sigurdsson, J. A. Chabalgoity and T. Wisniewski. (2008) High titers of mucosal and systemic anti-prp antibodies abrogate oral prion infection in mucosal-vaccinated mice. *Neuroscience* 153 679–686.

[156] Paterson Y. (1999) Intracellular bacterial vaccine vectors. Immunology, cell biology and genetics. John Wiley & Sons, Inc.

[157] Al-Ramadi BK, Al-Dhaheri MH, Mustafa N, Abouhaidar M, Xu D, Liew FY, Lukic ML, Fernandez-Cabezudo MJ. (2001) Influence of vector-encoded cytokines on anti-*salmonella* immunity: divergent effects of interleukin-2 and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun*, 69:3980-3988.

[158] Popoff MY, Bockemuhl J, Gheesling LL. Supplement 2002 (no.46) to the Kauffmann-White scheme. Res Microbiol 2004; 155(7):568-70.

[159] Ohl ME, Millar SI. (2001) *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annu. Rev. Med*., 52:259-274.

[160] Jensen VB, Harty JT, Jones BD. (1998) Interactions of the invasive pathogens *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* and *Shigella flexneri* with M cells and murine Peyer's patches. *Infect. Immun*., 66(8):3758-3766.

[161] Sansonetti P. (2002) Host-pathogen interactions: the seduction of molecular cross talk. *Gut*, 50(III):2-8.

[162] Raupach B, Mecsas J, Heczko U, Falkow S, Finlay BB. (1999) Bacterial epithelial cell cross talk. In: Defence of mucosal surfaces: pathogenesis, immunity and vaccines. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.

[163] Brumell JH, Steel-Mortimer O, Finlay BB. (1999) Bacterial invasion: force feeding by *Salmonella*. *Curr. Biol*., 9:277-280.

[164] Darwin KH, Miller VL. (1999) Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin. Microbiol. Rev*., 12(3):405-428.

[165] Cossart P, Sansonetti PJ. (2004) Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science*, 304:242-248.

[166] Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, *et al*.(2001) Dendritic cells express tight junction proteins and

penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. Nat Immunol; 2(4): 361-7.

[167] Steele-Mortimer O. (2008) The Salmonella-containing vacuole: moving with the times. Curr Opin Microbiol; 11(1): 38-45.

[168] Mèresse S, Steele-Mortimer O, Moreno E, Desjardins M, Finlay B, Gorvel J-P. (1999) Controlling the maturation of pathogen-containing vacuoles: a matter of life and death. *Nature Cell*. *Biol*., 1:183-188.

[169] Richter-Dahlfors A, Buchan AMJ, Finlay BB. (1997) Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella typhimurium* resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic affect on phagocytes in vivo. *J. Exp. Med*., 186(4):569-580.

[170] Kochi SK, Killeen KP, Ryan US. (2003) Advances in the development of bacterial vector technology. Expert Rev. *Vaccines*, 2(1): 31-43

[171] Mastroeni P, Chabalgoity JA, Dunstan SJ, Maskell DJ, Dougan G. (2001) *Salmonella*: immune response and vaccines. *Vet. J*., 161(2):132-164.

[172] Garmory H, Brown KA, Titball RW. (2002) *Salmonella* vaccines for use in humans: present and future perspectives. *FEMS Micro. Rev*., 26:339-353.

[173] Kohler JJ, Pathangey L, Hasona A, Progulske-Fox A, Brown TA. (2000) Long-term immunological memory induced by recombinant oral *Salmonella* vaccine vectors. *Infect. Immun*., 68(7):4370-4373.

[174] Moreno M. et al. (2010) *Salmonella* as Live Trojan Horse for Vaccine Development and Cancer Gene Therapy. Current Gene Therapy, 10.

[175] Hopkins S, et al. (1995) A recombinant Salmonella typhimurium vaccine induces local immunity by four different routes of immunization. Infect Immun. Sep;63(9):3279-86.

[176] Covone et al. (1998) Levels of expression and immunogenicity of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains expressiong *Escherichia coli* mutant heat-labile toxin. *Infect Immunity*, 66, 305-11.

[177] Coulson et al. (1994) Bacillus anthracis protective antigen, expressed in *Salmonella typhimurium* SL3261, affords protection against anthrax spore challenge. Vaccine, 12,1395-401.

[178] Chabalgoity et al. (1997) Expression and immunogenicity of an *Echinococcus granulosus* fatty-acid protein in live attenuated *Salmonella* vaccine strains. *Infect Immunity*, 65, 2402-12.

[179] Galen et al. (1999) Optimization of plasmid maintenance in the attenuated live vector vaccine strain *Salmonella typhi* CVD 908-*htrA*. *Infect Immunity*, 67,6424-33.

[180]Khan CMA, Villareal-Ramos B, Pierce RJ, Demarco de Hormaeche R, McNeill H, Ali T, Chatfield S, Capron A, Dougan G, Hormaeche CE. (1994) Construction, expression and immunogenicity of multiple tandem copies of the *Schistosoma mansoni* peptide 115-131 of the P28 glutathione S-transferase expressed as C-terminal fusion to tetanus toxin fragment C in a live aro-attenuated vaccine strain of *Salmonella*. *J. Immunol.*, 153:5634-5642

[181] Kaelin, W.G. *et al.* (1992) Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties *Cell 70,* 351

[182] Guzman LM, et al. (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. J. Bacteriol. 177: 4121-4130.

[183] Novy, R., Drott, D., Yaeger, K., and Mierendorf, R. (2001) *inNovations* 12, 1–3.

[184] Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J Mol Biol 166:557-80.

[185] Chabalgoity JA, Moreno M, Carol H, Dougan G, Hormaeche CE. (2000) Salmonella typhimurium as a basis for a live oral Echinococcus granulosus vaccine. *Vaccine*, 19(4-5):460-469.

[186] Brown, A., C. E. Hormaeche, R. Demarco de Hormaeche, M. Winther, G. Dougan, D. J. Maskell, and B. A. Stocker. 1987. An attenuated aroA Salmonella typhimurium vaccine elicits humoral and cellular immunity to cloned beta-galactosidase in mice. J Infect Dis 155:86-92

[187] Boutajangout A, Goni F, Knudsen E, *et al*. (2009) Diminished Amyloidbeta burden in Tg2576 mice following a prophylactic oral immunization with a salmonella-based amyloid-beta derivative vaccine. J Alzheimers Dis.

[188] Buckley AM, Wang J, Hudson DL, *et al*. (2010) Evaluation of live attenuated Salmonella vaccines expressing Campylobacter antigens for control of C. jejuni in poultry. Vaccine 28(4): 1094-105.

[189] Petavy AF, Hormaeche C, Lahmar S, *et al*. (2008) An oral recombinant vaccine in dogs against Echinococcus granulosus, the causative agent of human hydatid disease: a pilot study. PLoS Negl Trop Dis 2(1): e125.

[190] Ward SJ, Douce G, Figueiredo D, Dougan G, Wren BW. (1999) Immunogenicity of a Salmonella typhimurium aroA aroD vaccine expressing a nontoxic domain of Clostridium difficile toxin A. Infect Immun 67(5): 2145-52.

[191] John E. Cronan (2006). A family of arabinose-inducible *Escherichia coli* expression vectors having pBR322 copy control. Plasmid 55 (2) 152-157.

[192] Spadiut et al. (2010) Evaluation of different expression systems for the heterologous expression of pyranose 2-oxidase from Trametes multicolor in E. coli. Microbial Cell Factories, 9:14

[193] Lu C, Bentley WE, Rao G (2004) A high-throughput approach to promoter study using green fluorescent protein. Biotechnol Prog 20:1634-1640

[194] Wenbao Zhang et al. (2006). Vaccination of Dogs against *Echinococcus granulosus,* the Cause of Cystic Hydatid Disease in Humans. JID 194:966–74.

[195] López-Monteon, A. (2003). Specific antibody immune response against the parasitic portion of a glutathione-S-transferase fusion protein. FASEB 17, 621-627.

[196] Riggs, P., and La Vallie, E. R. (1997) Protein expression: introduction to expression by fusion proteins vectors. In *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, John Wiley & Sons, New York.

[197]Dunstan SJ, Simmons CP, Strugnell RA. (1999) Use of *in vivo*-regulated promoters to deliver antigens from attenuated Salmonella enterica var. Typhimurium. Infect Immun 67(10): 5133-41.

[198] Chabalgoity JA, Villareal-Ramos B, Khan CM, Chatfield SN, de Hormaeche RD, Hormaeche CE. (1995) Influence of preimmunization with tetanus toxoid on immune responses to tetanus toxin fragment C-guest antigen fusions in a Salmonella vaccine carrier. Infect Immun 63(7): 2564-9.

[199] Brennan, F.R. et al. (1995). *In vitro* studies with lymphocytes from sheep orally inoculated with an aromatic- dependent mutant of *Salmonella Typhimurium*. Res Vet Sci, 58 152-7.

[200] Mukkur, T.K. et al. (1995). Systemic and mucosal intestinal antibody response of sheep immunized with aromatic-dependent live or killed *Salmonella typhimurium*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 18, 27-39.

[201] Lascelles AK, Beh KJ, Mukkur TKS, Willis G. (1988) Immune response of sheep to oral and subcutaneous administration of live aromatic-dependent mutant of *Salmonella typhimurium* (SL 1479). *Vet Immunol Immunopathol* 18:259-267.

[202] Brennan, F.R. et al. (1994) Differences in the immune responses of mice and sheep to an aromatic-dependent mutant of *Salmonella typhimurium.* ***J .*** *Med. Microbiol*. - Vol. 41 2&28

[203] Begg AP, Walker KH, Love DN, Mukkur TKS. (1990) Evaluation of protection against experimental salmonellosis in sheep immunised with 1 or 2 doses of live aromatic-dependent *Salmonella typhimurium. Aust Vet J* 67: 294-298.

[204] Mukkur TKS, Walker KH. (1992) Development and duration of protection against salmonellosis in mice and sheep immunised with live aromatic-dependent *Salmonella typhimurium. Res Vet Sci* 52: 147-153.

# ANEXO

## 1. Alineamiento de genes usando herramienta informatica LALIGN

### Raton vs Alce

82.1% identity in 767 nt overlap (8-765:14-771); score: 2518 E(10000): 1e-201

```
        10        20        30        40        50        60
mou_Pr ACCTTGGCTACTGGCTGCTGGCCCTCTTTGTGACTATGTGGACTGATGTCGGCCTCTGCA
       :: : :::  :::: : :: :  ::::::::: : ::::::: ::: :: ::::::::::
elk_Pr ACATAGGCAGCTGGATCCTAGTTCTCTTTGTGGCCATGTGGAGTGACGTGGGCCTCTGCA
            20        30        40        50        60        70

        70        80        90          100       110       120
mou_Pr AAAAGCGGCCAAAGCCTGGAGGG---TGGAACACCGGTGGAAGCCGGTATCCCGGGCAGG
       : ::::: ::::: ::::::::    :::::::: :: :: ::::: :: :: :: ::::
elk_Pr AGAAGCGACCAAAACCTGGAGGAGGATGGAACACTGGGGGGAGCCGATACCCGGGACAGG
            80        90       100       110       120       130

          130       140       150       160          170       180
mou_Pr GAAGCCCTGGAGGCAACCGTTACCCACCTCAGGGTGGCAC---CTGGGGGCAGCCCCACG
       :::: :::::::::::::: :: :::::::::: ::      :::::: :::::::: :
elk_Pr GAAGTCCTGGAGGCAACCGCTATCCACCTCAGGGAGGGGGTGGCTGGGGTCAGCCCCATG
            140       150       160       170       180       190

             190       200       210       220       230       240
mou_Pr GTGGTGGCTGGGGACAACCCCATGGGGGCAGCTGGGGACAACCTCATGGTGGTAGTTGGG
       : :::::::::: ::::: ::::: ::  ::::::: :: :: ::::::::: : ::::
elk_Pr GAGGTGGCTGGGGCCAACCTCATGGAGGTGGCTGGGGTCAGCCCCATGGTGGTGGCTGGG
            200       210       220       230       240       250

             250       260          270       280       290
mou_Pr GTCAGCCCCATGGCGGTGGA---TGGGGCCAAGGAGGGGGTACCCATAATCAGTGGAACA
       : ::::: ::::: ::::::   ::::: :::::    :::::::: : ::::::::::
elk_Pr GACAGCCACATGGTGGTGGAGGCTGGGGTCAAGGT---GGTACCCACAGTCAGTGGAACA
            260       270       280          290       300       310

      300       310       320       330       340       350
mou_Pr AGCCCAGCAAACCAAAAACCAACCTCAAGCATGTGGCAGGGGCTGCGGCAGCTGGGGCAG
       ::::::: :::::::::::::: : :::::::::::: ::::: :::::::: ::::
elk_Pr AGCCCAGTAAACCAAAAACCAACATGAAGCATGTGGCAGGAGCTGCTGCAGCTGGAGCAG
             320       330       340       350       360       370

      360       370       380       390       400       410
mou_Pr TAGTGGGGGGCCTTGGTGGCTACATGCTGGGGAGCGCCATGAGCAGGCCCATGATCCATT
       : :: :::::::: ::::::::::::::::: :: ::::::::::::::  : :: ::::
elk_Pr TGGTAGGGGGCCTCGGTGGCTACATGCTGGGAAGTGCCATGAGCAGGCCTCTTATACATT
             380       390       400       410       420       430

      420       430       440       450       460       470
mou_Pr TTGGCAACGACTGGGAGGACCGCTACTACCGTGAAAACATGTACCGCTACCCTAACCAAG
       ::::::: ::::  :::::::: ::::: ::::::::::::::::: ::::: :::::::
elk_Pr TTGGCAATGACTATGAGGACCGTTACTATCGTGAAAACATGTACCGTTACCCCAACCAAG
             440       450       460       470       480       490

      480       490       500       510       520       530
mou_Pr TGTACTACAGGCCAGTGGATCAGTACAGCAACCAGAACAACTTCGTGCACGACTGCGTCA
       ::::::::::::::::::::::::: :  :::::::::: ::: ::::: ::::: ::::
elk_Pr TGTACTACAGGCCAGTGGATCAGTATAATAACCAGAACACCTTTGTGCATGACTGTGTCA
             500       510       520       530       540       550
```

```
      540       550       560       570       580       590
mou_Pr ATATCACCATCAAGCAGCACACGGTCACCACCACCACCAAGGGGGAGAACTTCACCGAGA
       : :::::  ::::::: ::::: ::::::::::::::::::::::::::::::::::: :
elk_Pr ACATCACAGTCAAGCAACACACAGTCACCACCACCACCAAGGGGGAGAACTTCACCGAAA
              560       570       580       590       600       610

      600       610       620       630       640       650
mou_Pr CCGATGTGAAGATGATGGAGCGCGTGGTGGAGCAGATGTGCGTCACCCAGTACCAGAAGG
       : ::  : :::::::::::::: :: :::::::: :::::: ::::::::::::::  :
elk_Pr CTGACATCAAGATGATGGAGCGAGTTGTGGAGCAAATGTGCATCACCCAGTACCAGAGAG
              620       630       640       650       660       670

      660       670       680       690       700       710
mou_Pr AGTCCCAGGCCTATTACGACGGGAGAAGATCCAGCAGCACCGTGCTTTTCTCCTCCCCTC
       : ::: :::: :::::: :    ::: :  : ::    : :   :: ::::::::::::::
elk_Pr AATCCGAGGCTTATTACCAA---AGAGGGGCAAGTGTGATC---CTCTTCTCCTCCCCTC
              680       690           700           710       720

      720       730       740       750       760
mou_Pr CTGTCATCCTCCTCATCTCCTTCCTCATCTTCCTGATCGTGGGATAG
       :::: :::::::::::::: :::::::: :: :: :: :: ::::::
elk_Pr CTGTGATCCTCCTCATCTCTTTCCTCATTTTTCTCATAGTAGGATAG
         730       740       750       760       770
```

## Raton vs Oveja

81.5% identity in 767 nt overlap (8-765:14-771); score: 2487 E(10000): 3.9e-199

```
       10        20        30        40        50        60
mou_Pr ACCTTGGCTACTGGCTGCTGGCCCTCTTTGTGACTATGTGGACTGATGTCGGCCTCTGCA
       :: : :::   ::: : ::::  ::::::::: : ::::::: ::: :: ::::::::::
sheep_ ACATAGGCAGTTGGATCCTGGTTCTCTTTGTGGCCATGTGGAGTGACGTGGGCCTCTGCA
            20        30        40        50        60        70

       70        80           90       100       110       120
mou_Pr AAAAGCGGCCAAAGCCTGG---AGGGTGGAACACCGGTGGAAGCCGGTATCCCGGGCAGG
       : ::::: ::::: :::::   ::: :::::::: :: :: ::::: :: :: :: ::::
sheep_ AGAAGCGACCAAAACCTGGCGGAGGATGGAACACTGGGGGGAGCCGATACCCGGGACAGG
            80        90       100       110       120       130

         130       140       150       160          170       180
mou_Pr GAAGCCCTGGAGGCAACCGTTACCCACCTCAGGGTGGCAC---CTGGGGGCAGCCCCACG
       : :: ::::::::::::::: :: :::::::::: ::      :::::: :::::::: :
sheep_ GCAGTCCTGGAGGCAACCGCTATCCACCTCAGGGAGGGGGTGGCTGGGGTCAGCCCCATG
            140       150       160       170       180       190

             190       200       210       220       230       240
mou_Pr GTGGTGGCTGGGGACAACCCCATGGGGGCAGCTGGGGACAACCTCATGGTGGTAGTTGGG
       : :::::::::: ::::: ::::: ::  ::::::: :: :: ::::::::: : ::::
sheep_ GAGGTGGCTGGGGCCAACCTCATGGAGGTGGCTGGGGTCAGCCCCATGGTGGTGGCTGGG
            200       210       220       230       240       250

             250       260          270       280       290
mou_Pr GTCAGCCCCATGGCGGTGGA---TGGGGCCAAGGAGGGGGTACCCATAATCAGTGGAACA
       : ::::: ::::: :::::::   ::::: :::::    :::: ::: : ::::::::::
sheep_ GACAGCCACATGGTGGTGGAGGCTGGGGTCAAGGT---GGTAGCCACAGTCAGTGGAACA
            260       270       280          290       300       310

      300       310       320       330       340       350
mou_Pr AGCCCAGCAAACCAAAAACCAACCTCAAGCATGTGGCAGGGGCTGCGGCAGCTGGGGCAG
       ::::::: :: :::::::::::: : :::::::::::::: ::::: :::::::: ::::
sheep_ AGCCCAGTAAGCCAAAAACCAACATGAAGCATGTGGCAGGAGCTGCTGCAGCTGGAGCAG
            320       330       340       350       360       370
```

```
      360       370       380       390       400       410
mou_Pr TAGTGGGGGGCCTTGGTGGCTACATGCTGGGGAGCGCCATGAGCAGGCCCATGATCCATT
       : :: :::::::::::::::::::::::::: :: : ::::::::::::  : :: ::::
sheep_ TGGTAGGGGGCCTTGGTGGCTACATGCTGGGAAGTGTCATGAGCAGGCCTCTTATACATT
              380       390       400       410       420       430

      420       430       440       450       460       470
mou_Pr TTGGCAACGACTGGGAGGACCGCTACTACCGTGAAAACATGTACCGCTACCCTAACCAAG
       ::::::: ::::  :::::::: ::::: ::::::::::::::::: ::::: :::::::
sheep_ TTGGCAATGACTATGAGGACCGTTACTATCGTGAAAACATGTACCGTTACCCCAACCAAG
              440       450       460       470       480       490

      480       490       500       510       520       530
mou_Pr TGTACTACAGGCCAGTGGATCAGTACAGCAACCAGAACAACTTCGTGCACGACTGCGTCA
       :::::::::: :::::::::::::: :: :::::::::::::: ::::: ::::: ::::
sheep_ TGTACTACAGACCAGTGGATCAGTATAGTAACCAGAACAACTTTGTGCATGACTGTGTCA
              500       510       520       530       540       550

      540       550       560       570       580       590
mou_Pr ATATCACCATCAAGCAGCACACGGTCACCACCACCACCAAGGGGGAGAACTTCACCGAGA
       : :::::  :::::::: ::::: :::::::::::::::::::::::::::::::::: :
sheep_ ACATCACAGTCAAGCAACACACAGTCACCACCACCACCAAGGGGGAGAACTTCACCGAAA
              560       570       580       590       600       610

      600       610       620       630       640       650
mou_Pr CCGATGTGAAGATGATGGAGCGCGTGGTGGAGCAGATGTGCGTCACCCAGTACCAGAAGG
       : ::   : ::::: :::::::: :::::::::::: :::::: ::::::::::::::  :
sheep_ CTGACATCAAGATAATGGAGCGAGTGGTGGAGCAAATGTGCATCACCCAGTACCAGAGAG
              620       630       640       650       660       670

      660       670       680       690       700       710
mou_Pr AGTCCCAGGCCTATTACGACGGGAGAAGATCCAGCAGCACCGTGCTTTTCTCCTCCCCTC
       : :::::::: :::::: :  :: :   :      ::     : :: :: :: ::::::::
sheep_ AATCCCAGGCTTATTACCAAAGGGGGGCA------AGTGTGATCCTCTTTTCTTCCCCTC
              680       690             700       710       720

      720       730       740       750       760
mou_Pr CTGTCATCCTCCTCATCTCCTTCCTCATCTTCCTGATCGTGGGATAG
       :::: ::::::::::::::: :::::::: :: :: :: :: ::::::
sheep_ CTGTGATCCTCCTCATCTCTTTCCTCATTTTTCTCATAGTAGGATAG
          730       740       750       760       770
```

## Alce vs oveja

97.8% identity in 771 nt overlap (1-771:1-771); score: 3702 E(10000): 0

```
              10        20        30        40        50        60
elk_Pr ATGGTGAAAAGCCACATAGGCAGCTGGATCCTAGTTCTCTTTGTGGCCATGTGGAGTGAC
       ::::::::::::::::::::::::: :::::::: :::::::::::::::::::::::::
sheep_ ATGGTGAAAAGCCACATAGGCAGTTGGATCCTGGTTCTCTTTGTGGCCATGTGGAGTGAC
              10        20        30        40        50        60

              70        80        90       100       110       120
elk_Pr GTGGGCCTCTGCAAGAAGCGACCAAAACCTGGAGGAGGATGGAACACTGGGGGGAGCCGA
       :::::::::::::::::::::::::::::::: :::::::::::::::::::::::::::
sheep_ GTGGGCCTCTGCAAGAAGCGACCAAAACCTGGCGGAGGATGGAACACTGGGGGGAGCCGA
              70        80        90       100       110       120

             130       140       150       160       170       180
elk_Pr TACCCGGGACAGGGAAGTCCTGGAGGCAACCGCTATCCACCTCAGGGAGGGGGTGGCTGG
       :::::::::::::: :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
sheep_ TACCCGGGACAGGGCAGTCCTGGAGGCAACCGCTATCCACCTCAGGGAGGGGGTGGCTGG
             130       140       150       160       170       180
```

```
             190       200       210       220       230       240
elk_Pr GGTCAGCCCCATGGAGGTGGCTGGGGCCAACCTCATGGAGGTGGCTGGGGTCAGCCCCAT
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
sheep_ GGTCAGCCCCATGGAGGTGGCTGGGGCCAACCTCATGGAGGTGGCTGGGGTCAGCCCCAT
             190       200       210       220       230       240

             250       260       270       280       290       300
elk_Pr GGTGGTGGCTGGGGACAGCCACATGGTGGTGGAGGCTGGGGTCAAGGTGGTACCCACAGT
       :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::: :::::::
sheep_ GGTGGTGGCTGGGGACAGCCACATGGTGGTGGAGGCTGGGGTCAAGGTGGTAGCCACAGT
             250       260       270       280       290       300

             310       320       330       340       350       360
elk_Pr CAGTGGAACAAGCCCAGTAAACCAAAAACCAACATGAAGCATGTGGCAGGAGCTGCTGCA
       :::::::::::::::::::: ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
sheep_ CAGTGGAACAAGCCCAGTAAGCCAAAAACCAACATGAAGCATGTGGCAGGAGCTGCTGCA
             310       320       330       340       350       360

             370       380       390       400       410       420
elk_Pr GCTGGAGCAGTGGTAGGGGGCCTCGGTGGCTACATGCTGGGAAGTGCCATGAGCAGGCCT
       :::::::::::::::::::::: :::::::::::::::::::::: ::::::::::::::
sheep_ GCTGGAGCAGTGGTAGGGGGCCTTGGTGGCTACATGCTGGGAAGTGTCATGAGCAGGCCT
             370       380       390       400       410       420

             430       440       450       460       470       480
elk_Pr CTTATACATTTTGGCAATGACTATGAGGACCGTTACTATCGTGAAAACATGTACCGTTAC
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
sheep_ CTTATACATTTTGGCAATGACTATGAGGACCGTTACTATCGTGAAAACATGTACCGTTAC
             430       440       450       460       470       480

             490       500       510       520       530       540
elk_Pr CCCAACCAAGTGTACTACAGGCCAGTGGATCAGTATAATAACCAGAACACCTTTGTGCAT
       :::::::::::::::::::: ::::::::::::::: :::::::::::: ::::::::::
sheep_ CCCAACCAAGTGTACTACAGACCAGTGGATCAGTATAGTAACCAGAACAACTTTGTGCAT
             490       500       510       520       530       540

             550       560       570       580       590       600
elk_Pr GACTGTGTCAACATCACAGTCAAGCAACACACAGTCACCACCACCACCAAGGGGGAGAAC
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
sheep_ GACTGTGTCAACATCACAGTCAAGCAACACACAGTCACCACCACCACCAAGGGGGAGAAC
             550       560       570       580       590       600

             610       620       630       640       650       660
elk_Pr TTCACCGAAACTGACATCAAGATGATGGAGCGAGTTGTGGAGCAAATGTGCATCACCCAG
       ::::::::::::::::::::::: :::::::::: :::::::::::::::::::::::::
sheep_ TTCACCGAAACTGACATCAAGATAATGGAGCGAGTGGTGGAGCAAATGTGCATCACCCAG
             610       620       630       640       650       660

             670       680       690       700       710       720
elk_Pr TACCAGAGAGAATCCGAGGCTTATTACCAAAGAGGGGCAAGTGTGATCCTCTTCTCCTCC
       :::::::::::::::: ::::::::::::::: :::::::::::::::::::: :: :::
sheep_ TACCAGAGAGAATCCCAGGCTTATTACCAAAGGGGGGCAAGTGTGATCCTCTTTTCTTCC
             670       680       690       700       710       720

             730       740       750       760       770
elk_Pr CCTCCTGTGATCCTCCTCATCTCTTTCCTCATTTTTCTCATAGTAGGATAG
       :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
sheep_ CCTCCTGTGATCCTCCTCATCTCTTTCCTCATTTTTCTCATAGTAGGATAG
             730    740       750       760       770
```

## 2. Alineamiento de proteínas usando herramienta informatica LALGIN

### Raton vs Alce

87.1% identity in 256 aa overlap (2-254:4-256); score: 1600 E(10000): 3.4e-154

```
              10        20        30         40        50
Mou_Pr ANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKPGG-WNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGT-WGQP
       ...: :.:.:::.::.:::::::::::::: :::::::::::::::::::::::::  :::: 
Elk_Pr SHIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGGWGQP
            10        20        30        40        50        60

      60        70        80         90       100       110
Mou_Pr HGGGWGQPHGGSWGQPHGGSWGQPHGGG-WGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHVAGAAAAG
       ::::::::::.::::::.:::::::: ::::: ::.:::::::::::.:::::::::: 
Elk_Pr HGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGGWGQGG-THSQWNKPSKPKTNMKHVAGAAAAG
            70        80        90        100       110       120

      120       130       140       150       160       170
Mou_Pr AVVGGLGGYMLGSAMSRPMIHFGNDWEDRYYRENMYRYPNQVYYRPVDQYSNQNNFVHDC
       ::::::::::::::::::.::::::.:::::::::::::::::::::::::.:::.::::: 
Elk_Pr AVVGGLGGYMLGSAMSRPLIHFGNDYEDRYYRENMYRYPNQVYYRPVDQYNNQNTFVHDC
            130       140       150       160       170       180

      180       190       200       210       220       230
Mou_Pr VNITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCVTQYQKESQAYYDGRRSSSTVLFSS
       ::::.:::::::::::::::::::.::::::::::.::::.::.:::  .:..:..:::: 
Elk_Pr VNITVKQHTVTTTTKGENFTETDIKMMERVVEQMCITQYQRESEAYY--QRGASVILFSS
            190       200       210       220          230       240

      240       250
Mou_Pr PPVILLISFLIFLIVG
       ::::::::::::::::
Elk_Pr PPVILLISFLIFLIVG
              250
```

### Raton vs Oveja

87.1% identity in 256 aa overlap (2-254:4-256); score: 1603 E(10000): 1.7e-154

```
              10        20        30         40        50
Mou_Pr ANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKPGG-WNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGT-WGQP
       ...: :.:.:::.::.:::::::::::::: :::::::::::::::::::::::::  :::: 
Sheep_ SHIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGGWGQP
            10        20        30        40        50        60

      60        70        80         90       100       110
Mou_Pr HGGGWGQPHGGSWGQPHGGSWGQPHGGG-WGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHVAGAAAAG
       ::::::::::.::::::.:::::::: ::::: .:.:::::::::::.:::::::::: 
Sheep_ HGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGGWGQGG-SHSQWNKPSKPKTNMKHVAGAAAAG
            70        80        90        100       110       120

      120       130       140       150       160       170
Mou_Pr AVVGGLGGYMLGSAMSRPMIHFGNDWEDRYYRENMYRYPNQVYYRPVDQYSNQNNFVHDC
       ::::::::::::.::::.::::::.:::::::::::::::::::::::::::::::::: 
Sheep_ AVVGGLGGYMLGSVMSRPLIHFGNDYEDRYYRENMYRYPNQVYYRPVDQYSNQNNFVHDC
            130       140       150       160       170       180

      180       190       200       210       220       230
```

```
Mou_Pr VNITIKQHTVTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCVTQYQKESQAYYDGRRSSSTVLFSS
       :::::::::::::::::::::.:.::::::::::.::::.::::::  .:..:..::::
Sheep_ VNITVKQHTVTTTTKGENFTETDIKIMERVVEQMCITQYQRESQAYY--QRGASVILFSS
            190       200       210       220         230       240

      240       250
Mou_Pr PPVILLISFLIFLIVG
       ::::::::::::::::
Sheep_ PPVILLISFLIFLIVG
            250
```

## Alce vs Oveja

97.7% identity in 256 aa overlap (1-256:1-256); score: 1835 E(10000): 7.1e-178

```
               10        20        30        40        50        60
Elk_Pr MVKSHIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGGW
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
Sheep_ MVKSHIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGGW
               10        20        30        40        50        60

               70        80        90       100       110       120
Elk_Pr GQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGGWGQGGTHSQWNKPSKPKTNMKHVAGAAA
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::.:::::::::::::::::::::::
Sheep_ GQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGGWGQGGSHSQWNKPSKPKTNMKHVAGAAA
               70        80        90       100       110       120

              130       140       150       160       170       180
Elk_Pr AGAVVGGLGGYMLGSAMSRPLIHFGNDYEDRYYRENMYRYPNQVYYRPVDQYNNQNTFVH
       ::::::::::::::.:::::::::::::::::::::::::::::::::.:::.:::
Sheep_ AGAVVGGLGGYMLGSVMSRPLIHFGNDYEDRYYRENMYRYPNQVYYRPVDQYSNQNNFVH
              130       140       150       160       170       180

              190       200       210       220       230       240
Elk_Pr DCVNITVKQHTVTTTTKGENFTETDIKMMERVVEQMCITQYQRESEAYYQRGASVILFSS
       ::::::::::::::::::::::::::::.:::::::::::::::::.::::::::::::::
Sheep_ DCVNITVKQHTVTTTTKGENFTETDIKIMERVVEQMCITQYQRESQAYYQRGASVILFSS
              190       200       210       220       230       240

              250
Elk_Pr PPVILLISFLIFLIVG
       ::::::::::::::::
Sheep_ PPVILLISFLIFLIVG
              250
```