

Universidad de la República Oriental del Uruguay
Facultad de Ciencias
PEDECIBA

Tesis de Maestría

Tropomiosina: isoformas y vacunas

Gabriela Alvite

Tribunal:

Orientadora:

Dra. Cecilia Fernández
Dra. Mónica Marín
Dra. Leda Roche

Dra. Adriana Esteves

Agosto del 2006

Sección Bioquímica
Facultad de Ciencias

Agradecimientos

A Marcelo por su apoyo incondicional.

A mi madre por inculcarme valores como la perseverancia.

A Adriana por su orientación y gran dedicación, de años.

A mis amigos de Bioquímica, de los cuales aprendo cada día y me acompañan siempre: Estela (imprescindible para localizar la expresión), Lucía, Ana, Cora y Claudio.

A todos mis compañeros de Bioquímica con los que siempre se comparte algo.

A Carlos Hormaeche por su empuje y entusiasmo.

A Alejandro Chabalgoity y a su grupo por permitirme usar su laboratorio e introducirme en el mundo de las inmunizaciones.

Al proyecto ECHINOSTOP (Unión Europea) por permitirme desarrollar gran parte del trabajo.

Al PEDECIBA Biología por apoyarme con una beca.

Al centro de secuenciación CTAG de Facultad de Ciencias por las innumerables secuencias.

A Vero y a Ana M. Hernández de Inmunología por asesorarme con los tests estadísticos.

Indice

Resumen	1
Introducción	2
Echinococcosis quística y su agente causante <i>Echinococcus granulosus</i>	2
Costos de la comunidad, epidemiología y diagnóstico	5
Vacunas contra cestodos parásitos	8
Uso de cepas de <i>Salmonella</i> y del virus vaccinia en vacunación	13
Proteínas transportadoras de ácidos grasos y tropomiosina de <i>E. granulosus</i>	19
Objetivos	24
Materiales y métodos	25
1. Material biológico	25
Material parasitario	
Ratones	
2. Medios de cultivo y soluciones	25
Medios de cultivo	
Soluciones	
3. Cepas de bacterias, virus y plásmidos	26
Bacterias	
Virus	
Plásmidos	
4. Líneas celulares y cultivo celular	29
5. Estrategias de clonado y selección de clones	29
Reacciones de ligación y transformaciones	
6. Titulación y transducción con fago P22	31
7. Infección viral y transfección de células eucariotas	32
8. Rastreo y selección de virus recombinantes	32
9. Producción y titulación de virus recombinantes	33
10. Purificación viral a gran escala mediante gradientes de sacarosa	33
11. RT-PCR y PCR	34
Cebadores	
12. Secuenciado y análisis de secuencia	38
13. Hibridización sobre amplificaciones de ADNg	39
14. Purificación de ADN	39
Purificación de ADN de plásmidos	
Purificación de ADN genómico	
Purificación de ADN viral	
Purificación de fragmentos de ADN	
15. Purificación de ARN	40
16. Producción y purificación de proteínas recombinantes	41
17. Sueros	41
18. Ensayos de estabilidad del plásmido <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	42
19. Protocolos de inmunización	42
20. Ensayos de ELISA	44

Determinación de IgG específicas en sueros de ratones	
Determinación de IgA específica y total en heces de ratones	
Determinación de IgG anti-LPS en sueros de ratones	
21. Análisis estadístico	45
22. Inmunolocalización de proteínas específicas	45
Inmunohistoquímica	
Inmunolocalización <i>in toto</i>	
23. Hibridización <i>in situ</i>	47
24. Electroforesis	48
Acidos Nucleicos	
Proteínas	
25. Western Blot	50
Resultados	51
1. Tropomiosina de <i>Echinococcus granulosus</i>	51
1. 1. Obtención de ADNc completo	51
1. 2. Análisis de secuencia	53
1. 3. Isoformas del gen <i>EgTrp</i>	57
1. 4. Estructura génica de <i>EgTrp</i>	63
1. 5. Hibridización sobre amplificaciones de ADNg	71
1. 6. Estudios de expresión	74
1. 6. 1. Western Blot y análisis de la masa molecular	74
1. 6. 2. Localización de la expresión de <i>EgTrp</i>	76
Inmunohistoquímicas	76
Inmunolocalización <i>in toto</i>	77
Hibridización <i>in situ</i>	78
2. Expresión de antígenos recombinantes de <i>E. granulosus</i> en cepas vacunales de <i>Salmonella</i> y en el virus vaccinia (MVA)	79
2. 1. Expresión de <i>EgTrp</i> y <i>EgFABP2</i> en cepas atenuadas de <i>Salmonella</i>	79
2. 1. 1. Clonado de <i>EgTrp</i> y <i>EgFABP2</i> en el plásmido pTECH2	79
2. 1. 2. Expresión de los antígenos recombinantes en cepas de <i>Salmonella</i>	80
2. 1. 3. Ensayos de estabilidad <i>in vitro</i>	84
2. 1. 4. Ensayos de estabilidad <i>in vivo</i>	86
2. 2. Expresión de <i>EgTrp</i> , <i>EgFABP1</i> y <i>EgFABP2</i> en el virus vaccinia Ankara (MVA)	88
2. 2. 1. Clonado de <i>EgFABP1</i> , <i>EgFABP2</i> y <i>EgTrp</i> en el vector de transfección pSC11	88
2. 2. 2. Infección celular y transfección	90
2. 2. 3 Confirmación de la presencia de la secuencia codificante de interés	91
2. 2. 4. Producción y purificación a gran escala de las placas virales seleccionadas	94
3. Ensayos de inmunización en ratones con cepas recombinantes de <i>Salmonella</i>	95
3. 1. Ensayos primarios de inmunización con las cepas Se795aroA recombinantes	95
3. 1. 1. Respuesta de IgG anti-LPS	95
3. 1. 2. Respuesta de IgG anti-TetC	98
3. 1. 3. Respuesta de IgG anti- <i>EgFABP2</i> y anti- <i>EgTrp</i>	99
3. 2. Segundo ensayo de inmunización en ratones	102
3. 2. 1. Respuesta de IgG anti- <i>EgTrp</i>	103
3. 2. 2. Respuesta de IgA anti- <i>EgTrp</i>	104
3. 2. 3. Respuesta de IgG anti-TetC	105

3. 2. 4. Respuesta de IgA anti-TetC	107
3. 2. 5. Respuesta de IgG anti-LPS	108
Discusión	111
Tropomiosina de <i>Echinococcus granulosus</i>	111
Obtención de ADNc completo y su análisis	111
Isoformas del gen <i>EgTrp</i>	112
Estructura génica de <i>EgTrp</i>	117
Estudios de expresión	119
Expresión de EgTrp y EgFABP2 en cepas atenuadas de <i>Salmonella</i>	122
Estudios de inmunización en ratones	124
Expresión de EgTrp, EgFABP1 y EgFABP2 en el virus vaccinia Ankara (MVA)	127
Conclusiones y perspectivas	129
Bibliografía	132

Abreviaturas

ADN	ácido desoxi-ribonucleico
ADNc	copia de ácido desoxi-ribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATP	trifosfato de adenosina
CTP	trifosfato de citosina
GTP	trifosfato de guanosina
UTP	trifosfato de uracilo
dATP	trifosfato de desoxi-adenosina
dGTP	trifosfato de desoxi-guanosina
dTTP	trifosfato de desoxi-timidina
α - ³² P-dCTP	trifosfato de desoxi-citosina marcado con fósforo 32
BCIP	fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil
Da	Dalton
EDTA	etilen diamino tetra acetato disódico
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactósido
Kb	kilobase
kDa	kilodalton
LB	Luria Bertani
NBT	azul de nitro-tetrazolio
nt	nucleótidos
SDS	dodecil sulfato de sodio
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR	retrotranscripción - reacción en cadena de la polimerasa

Resumen

La echinococcosis quística, causada por el platelminto parásito *Echinococcus granulosus*, es un grave problema sanitario y económico en varios países, incluyendo al nuestro, ya que afecta tanto al hombre como al ganado. Creemos que una manera efectiva de eliminar tan importante enfermedad, es mediante el desarrollo de vacunas orales que impidan la infección del hospedero definitivo, el perro.

La tropomiosina es una proteína muy antigénica y generalmente presenta varias isoformas generadas a partir de un mismo gen mediante el procesamiento alternativo del transcrito primario, existiendo en varios organismos más de un gen. Este tipo de procesamiento no ha sido reportado aún en *E. granulosus*. La tropomiosina de los mamíferos es utilizada como modelo de estudio del procesamiento alternativo.

Este trabajo tiene dos centros de interés, la caracterización del gen de la tropomiosina de *Echinococcus granulosus* (*EgTrp*) y sus isoformas, y el desarrollo de sistemas de expresión de los antígenos *EgTrp*, *EgFABP2* y *EgFABP1* de este parásito, para la vacunación oral de perros.

Utilizando RT-PCR hemos clonado la secuencia codificante de *EgTrp* correspondiente a la isoforma que llamamos A. Detectamos además, dos nuevas isoformas, a las que llamamos B y C. Nuestro ensayo de hibridización sobre amplificaciones de ADN indica que las isoformas reportadas provienen de un gen único de tropomiosina, el cual confirmamos que posee todos los exones presentes en las isoformas encontradas y presenta señales típicas de procesamiento alternativo del transcrito primario.

El patrón de expresión de la tropomiosina a nivel proteico, analizado por inmunohistoquímica e inmunolocalización *in toto*, y del ARNm, visto a través de hibridización *in situ*, es coincidente, con una expresión muy fuerte a nivel de las ventosas y una expresión más leve y generalizada en el resto del protoescolex.

Luego del desarrollo de varias construcciones de *Salmonella* recombinantes expresando la proteína de fusión TetCEgTrp o TetCEgFABP2, se seleccionan, mediante ensayos de estabilidad, las cepas recombinantes Se795aroA y LVR01 recombinantes para realizar ensayos de inmunización en ratones. A partir de ellos, se determina, midiendo la respuesta inmune humoral, que la vía de inoculación oral es más adecuada que la intravenosa y que TetCEgTrp se expresa mejor que TetCEgFABP2.

Finalmente, se obtuvieron los recombinantes virales MVA-pSC11, MVA-pEgTrp, MVA-pEgFABP2 y MVA-pEgFABP1 puros y con altos títulos virales.

Planteamos que las tres isoformas encontradas surgen del gen *EgTrp* mediante procesamientos alternativos del transcrito primario. No descartamos la existencia de más isoformas, las cuales podrían ser dilucidadas mediante ensayos de protección de nucleasa S1. Sería necesario realizar un experimento de *Southern Blot* sobre ADN genómico total para determinar el número de genes de tropomiosina. Podríamos correlacionar cada isoforma con su patrón de expresión mediante ensayos de hibridización *in situ*, utilizando como sonda las regiones diferenciales de las isoformas. Se recomienda el uso de las construcciones Se795aroA-pTECH2/EgTrp y LVR01-pTECH2/EgTrp en ensayos de inmunización oral en perros, con el consiguiente estudio de protección. También queda pendiente el estudio de la respuesta inmune celular a través de ensayos de proliferación y medida de niveles de citoquinas.

Los virus recombinantes generados podrían ser utilizados como otra estrategia de vacunación oral de perros.

Introducción

Echinococcosis quística y su agente causante *Echinococcus granulosus*

La echinococcosis quística es una zoonosis parasitaria estimada como un grave problema sanitario y socio-económico en comunidades urbanas y rurales uruguayas. Ésta se desarrolla en un ciclo doméstico, en un escenario nacional de economía agropecuaria, con caracteres socio-ecológicos que contribuyen a la permanencia de esta enfermedad. Se reconoce un sólo agente etiológico, el helminto *Echinococcus granulosus*, que pertenece al phylum *Platelmintes*. Los platelmintos son organismos aplanados dorsoventralmente con cobertura externa celular, triploblásticos y acelomados que incluyen formas de vida libre y parásitas. Se definen cuatro especies dentro del género *Echinococcus*, *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. vogeli* y *E. oligarthrus*, las cuales presentan una gran especificidad de hospederos, posiblemente determinada por factores mecánicos, bioquímicos, fisicoquímicos, nutricionales e inmunológicos.

Echinococcus granulosus es un platelminto endoparásito, perteneciente a la clase Cestoda. En su forma adulta presenta un cuerpo o estróbila elongado, formado por no más de cinco unidades reproductoras conocidas como proglótides. En la región anterior presenta un órgano de fijación o escólex con cuatro ventosas y un rostelo con una doble fila de ganchos.

Como todo miembro de la familia Taeniidae, *Echinococcus* requiere de dos hospederos mamíferos para completar su ciclo de vida: un hospedero definitivo donde el adulto se desarrolla en el intestino delgado, y un hospedero intermediario en cuyas vísceras se desarrolla el quiste hidático o larva metacestode. El hospedero definitivo es un carnívoro que se infecta al ingerir protoescólices (PEs) que son producidos por multiplicación asexual en el estadio larvario de metacestode. En un solo quiste puede haber cientos de PEs y cada uno es capaz de desarrollarse generando un gusano adulto sexualmente maduro que apenas mide de 3 a 6 mm y es hermafrodita. Los adultos producen huevos, cada uno de los cuales contiene un sólo embrión (oncósfera); estos huevos se depositan con las heces del hospedero definitivo y son capaces de sobrevivir períodos variables dependiendo de las

condiciones ambientales. Los huevos son redondos, no operculados, con seis ganchos y cubierta radialmente estriada y resistente (Thompson, 1995).

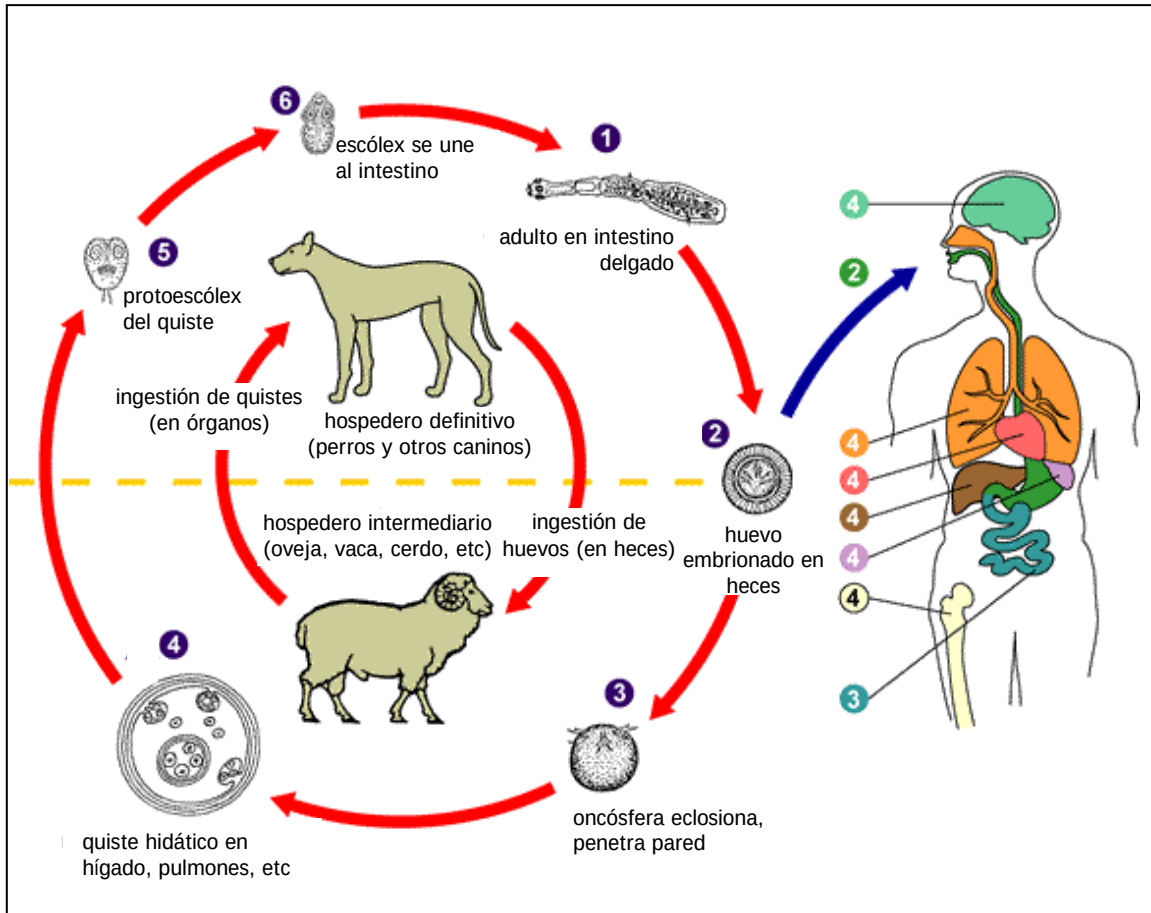


Figura 1. Ciclo de vida de *Echinococcus granulosus*.

La figura 1 ilustra el ciclo de *Echinococcus granulosus* donde el hospedero definitivo, generalmente el perro, se infecta por la ingesta de vísceras que contienen protoescólices. Estos se evaginan en el estómago y se alojan en el intestino delgado adoptando la forma adulta. El adulto se reproduce sexualmente y libera los huevos al medio donde pueden ser ingeridos por un hospedero intermediario. El humano, eventualmente, puede actuar de hospedero intermediario al ingerir accidentalmente huevos embrionarios. En el intestino

delgado del hospedero intermediario (ovinos, bovinos, porcinos, caprinos, equinos, camellos, ciervos, humanos) la oncósfera eclosiona penetrando la pared intestinal y pasando al sistema circulatorio o linfático. De este modo llega a los órganos blanco, generalmente hígado y/o pulmón, y allí se desarrolla la forma larvaria cerrándose el ciclo.

La larva metacestode o quiste hidático de *Echinococcus granulosus* se representa en la figura 2, es unilocular, esférica y contiene líquido en su interior. Está formada por una capa interna o capa germinativa, parcialmente sincitial, nucleada y rodeada externamente por una capa elástica y acelular de espesor variable, la capa laminar; ésta está rodeada a su vez por una capa fibrosa producida por el hospedador llamada capa adventicia.

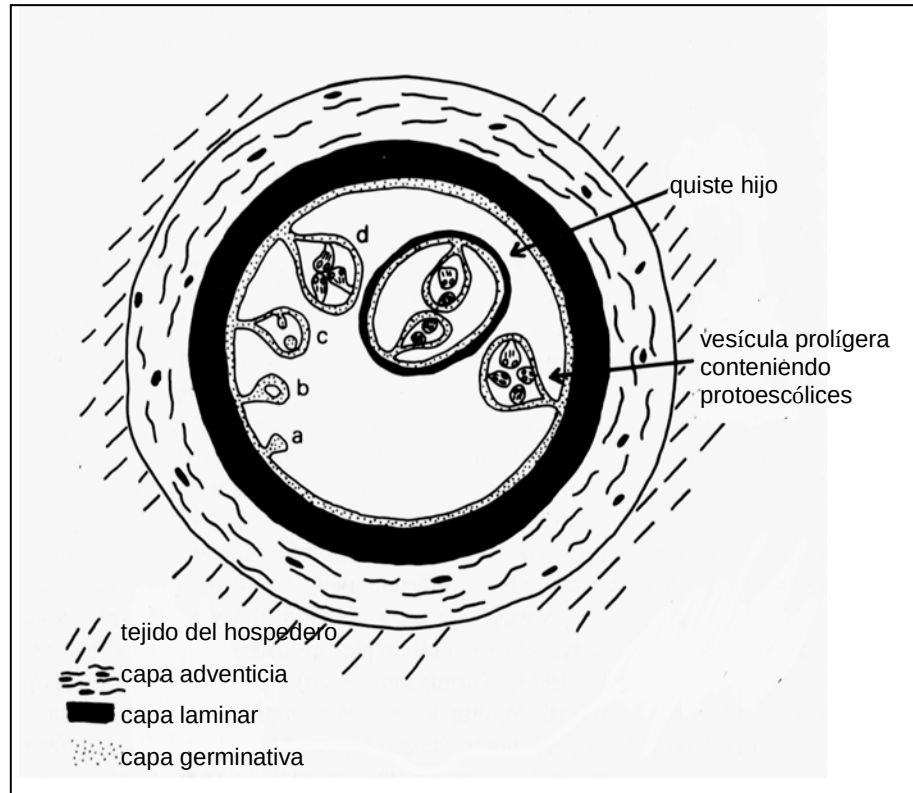


Figura 2. Representación esquemática de la larva metacestode o quiste hidático de *E. granulosus*. a, b, c, y d son etapas en el desarrollo de las vesículas que dan lugar a los PEs (prolígeras). Tomado de Thompson, 1995.

A partir de la capa germinativa se desarrollan directa o indirectamente todos los elementos de la hidátide. El desarrollo y crecimiento del quiste es lento, crecen de 1 a 5 cm por año y pueden alcanzar tamaños de hasta 20 cm. En su interior se encuentra una gran cantidad de líquido, junto con vesículas prolíferas, protoescólices y quistes hijos. Las vesículas prolíferas son espesamientos de la capa germinativa hacia adentro del quiste que quedan unidos por pedúnculos a la capa germinativa. En su interior se desarrollan los protoescólices. Por rotura del pedúnculo las vesículas pueden quedar libres en el líquido hidático, y a su vez, si la hidátide se rompe los escólices podrán ser liberados. Las vesículas hijas presentan la misma estructura de la hidátide madre (Thompson, 1995). Existe la posibilidad de ruptura del quiste hidático en cuyo caso puede producirse la resiembra de protoescólices, generando así nuevos quistes.

Costos de la comunidad, epidemiología y diagnóstico

El impacto socio-económico que produce este parásito se vincula principalmente con la estructura compleja de su ciclo biológico, dado que necesita para el desarrollo de todos sus estadios, animales de interés económico, mascotas, animales de trabajo y el hombre. Como consecuencia de esta diversidad de hospederos, incide sobre la salud de las personas y produce pérdidas en la economía, en la Salud Pública y depreciación en las tierras donde asienta el ciclo de transmisión.

Las pérdidas que produce la echinococcosis quística en el ganado ovino, bovino, porcino y caprino, se deben al decomiso en los frigoríficos de las vísceras parasitadas. El impacto en las personas se mide por el número de enfermos (morbilidad), por las lesiones anatómicas y fisiológicas que produce (patogenia), por el número de fallecidos (mortalidad), por los años de vida perdidos (AVPP) y por los años vividos sin una buena calidad de vida (AVADs). Como se menciona anteriormente, los perros infectados eliminan heces con huevos al medio, esta contaminación es la esencia misma de transmisión de la hidatidosis, ya que los huevos pueden sobrevivir hasta más de tres años en estas condiciones. Su impacto ambiental se mide por las pérdidas que produce la contaminación de los suelos, de las aguas superficiales, y de las quintas y granjas (Guarnera, 2005).

En 1998 se realizó un estudio en Uruguay con 2035 ovejas, de las cuales 1019 eran corderos y 1016 eran adultos, se examinaron secciones seriadas de muestras de hígado, pulmón y corazón de cada individuo (Cabrera y cols., 2003). Al analizar la estructura morfológica de la larva se encontró que en animales jóvenes 29% de las lesiones eran calcificadas y 71% eran hialinas, mientras que en animales mayores la proporción fue 34.4% calcificados versus 65.6% hialinos. Los quistes calcificados son aquellos no viables, mientras que los hialinos pueden ser fértiles o no-fértiles dependiendo de la existencia de protoescolices o no en el líquido hidático.

Para la masa ovina nacional, en 2002 la prevalencia fue 3.85% y en bovinos en 2003 fue 6.55%, con diagnóstico histopatológicos complementarios de lesiones en hígado y pulmones (Cabrera, 2005). Un estudio realizado previamente en el año 1994, mostró una prevalencia de 15.2% para ovejas jóvenes y 33.9% para ovejas adultas, estos datos muestran la reducción de las tasas de manera significativa. Los autores proponen que estos datos reflejan una reducción de las áreas contaminadas con huevos de *E. granulosus*; si bien este hecho parece alentador es en realidad preocupante dado que podría causar una pérdida de la inmunidad contra este parásito, luego de un cierto tiempo.

También se determinó la presentación de la parasitosis en bovinos, mediante el examen de 1987 reses de todas las edades, correspondientes a 60 tropas provenientes del litoral noroeste de Uruguay durante el año 2004. Se diagnosticó la hidatidosis a través del análisis post mortem en playa de faena y posterior confirmación morfológica en laboratorio. Se registró una tasa de parasitación por quiste hidático de 10.8% de los animales y de 80% de las tropas. La localización por órgano afectado fue de 79% en pulmón, de 16.7% en hígado y 3.7% en pulmón e hígado simultáneamente. Se registró una evolución de los quistes pulmonares como hialinos, caseificados y calcificados de 53, 27, y 20% y en hígado de 69, 25, y 5% respectivamente, con una fertilidad del 10% en los tipo hialino (Hernández y cols., 2005).

En 2004, la prevalencia nacional de echinococcosis canina se determinó en una muestra de 1988 predios rurales con Bromhidrato de Arecolina, evidenciando que de 4260 canes, el 0.40% presentaba *E. granulosus* en el 0.70% de los predios.

Desde 1993 hasta el 2003, la prevalencia quirúrgica en humanos relevada por la Comisión de Hidatidosis en centros públicos y privados, fue 4.53/100.000 habitantes.

La vigilancia epidemiológica mediante el monitoreo de los hospederos involucrados permite evaluar y planificar las medidas de control de la echinococcosis quística.

En Uruguay, ésta situación sanitaria se pretende controlar aplicando un programa oficial nacional basado en una estructura legal con recursos humanos y materiales que permita llegar a las metas previstas.

Si bien existe un buen control de la echinococcosis quística aún sigue siendo un problema en el país y es necesario continuar con un alto nivel de control y vigilancia.

En otras regiones del mundo existe una alta prevalencia de esta enfermedad parasitaria, tanto en América del Sur como en Canadá, Asia, África, Europa y Australia. A nivel de América, es importante en países como Chile, Argentina, Brasil y Perú. Por ejemplo, en Asia Central la tasa de incidencia quirúrgica anual llega hasta 25 casos/100.000 por año, y las poblaciones de perros rurales presentan prevalencias cercanas al 25% (Torgerson y cols., 2005). Por otro lado, la echinococcosis quística humana es prevalente en el norte de África y en el este medio de África. Es hiper endémica en Irán, Turquía, Iraq, Jordania, Maruecos, Libia, Túnez, y Argelia, y endémica en Egipto (Sadjjadi, 2005).

En Europa, las áreas más afectadas son la costa mediterránea, especialmente parte de España y el sur de Italia, donde la tasa de incidencia anual en humanos alcanza 4-8/100.000 (Romig y cols., 2006; Garippa y cols., 2004) y las zonas de Gran Bretaña que presentan un número alto de ovejas (Eckert y cols., 2001).

El diagnóstico temprano de la enfermedad se lleva a cabo mediante ultrasonografía y otras técnicas imagenológicas como la tomografía computada, y está apoyado por tests serológicos positivos. Recientemente se compararon los 6 antígenos más utilizados para los métodos inmunológicos: líquido hidático total, antígeno B nativo, dos antígenos

recombinantes del antígeno B, péptidos sintéticos derivados del antígeno B y un recombinante de la malato-deshidrogenasa del parásito. Se demostró que el líquido hidático total es el más adecuado, lográndose una eficiencia diagnóstica del 81.4% cuando se lo emplea en la técnica de ELISA (Santillán, 2005).

Si bien una vez detectado el quiste hidático el único tratamiento posible es la cirugía, con el riesgo de la ruptura del mismo y la resiembra de protoescolices, en los últimos años se ha introducido el tratamiento médico con benzimidazoles. Esto ha posibilitado una mejora en la calidad de vida de los pacientes quienes llegan a la cirugía con menores riesgos debido a que estos fármacos actúan sobre las formas larvarias del parásito. El albendazole es la droga más utilizada en la actualidad para el tratamiento quimioterapéutico de la hidatidosis humana (Elisondo y cols., 2005).

Vacunas contra cestodes parásitos

El estadio adulto del ciclo de vida de los cestodes parásitos es susceptible a la aplicación de anti-helmínticos altamente efectivos. Sin embargo, los hospederos definitivos donde los gusanos adultos han sido eliminados por tratamientos anti-helmínticos, permanecen susceptibles a la re-infección. De esta manera, el control de la enfermedad es insuficiente, al menos que el tratamiento anti-helmíntico se de repetidamente a intervalos menores del período pre-patente del parásito. Este esquema de control ha sido aplicado exitosamente para la erradicación de la hidatidosis en Nueva Zelanda (Gammel y cols., 2001). Desafortunadamente, en muchos países no se dispone de recursos suficientes para que esto sea un método efectivo para el control de la hidatidosis. Una opción es el desarrollo de vacunas, especialmente para aplicación en el hospedero definitivo de *E. granulosus*, y así cortar el ciclo del parásito, ya que existen varios hospederos intermediarios pero predominantemente uno definitivo (perro).

Sin embargo, hasta el momento las investigaciones se han centrado en el desarrollo de vacunas para ser utilizadas en los hospederos intermediarios.

Los efectos anti-parasíticos de sueros de hospederos ya sea inmunizados activamente o infectados con estos parásitos, se reflejan en la habilidad del suero de matar oncósferas activadas en cultivos *in vitro* (Heath, 1973; Heath y Lawrence, 1981). Esta correlación *in vitro* ha sido aplicada efectivamente en investigaciones acerca de la naturaleza de la respuesta inmune protectora contra *E. granulosus* (Heath y Lawrence, 1996; Woollard y cols., 2000, 2000a, 2001). Heath y Lawrence (1996) llevaron a cabo una serie de experimentos con el objetivo de identificar antígenos en oncósferas de *E. granulosus*, capaces de inducir inmunidad protectora en ovinos. Encontraron dos antígenos de 23 y 25 kDa reconocidos por antisuero donde aparecen anticuerpos letales, y sugieren que estos antígenos se exponen en la superficie de las oncósferas y son blancos potenciales del ataque mediado por el complemento y por anticuerpos. Además, sólo las ovejas que son inyectadas con esta fracción de antígenos producen anticuerpos capaces de matar las oncósferas de *E. granulosus in vitro*. Posteriormente concluyeron que uno o los dos antígenos son protectivos.

La incapacidad para propagar la mayoría de los cestodes tanto *in vitro* como *in vivo* impidió el desarrollo de vacunas prácticas contra este grupo de parásitos hasta el advenimiento de la tecnología del ADN recombinante en los '80. Esta tecnología proveyó los medios por los cuales se puede producir importantes cantidades de antígeno. Esta técnica fue aplicada inmediatamente en cestodes, con la primer librería de ADNc y expresión de un antígeno helmíntico en *T. taeniaeformis*, por Bowtell y cols. (1984).

La significancia de la hidatidosis en salud pública ha estimulado un período de investigación en inmunidad contra *E. granulosus*, particularmente en ovinos que son el hospedero intermediario mayoritario involucrado en la transmisión del parásito. Se ha investigado exhaustivamente la inmunidad a la re-infección luego de una infección inicial producida por la administración oral de huevos de *E. granulosus* (Sweatman y cols., 1963; Dempster y cols., 1995) y/o la inyección parenteral de huevos u oncósferas activadas (Gemmell, 1966; Heath y cols., 1979, 1981; Heath y Lawrence, 1996).

Estas investigaciones identificaron las condiciones de exposición a infecciones de *E. granulosus*, que conducen a altos niveles de inmunidad contra infecciones desafío orales subsecuentes con huevos del parásito.

El rol que juegan los anticuerpos en la inmunidad contra *E. granulosus* ha sido controversial. Heath y cols. (1992) especularon que la inmunidad de *E. granulosus* en ovejas estaba asociada con la aparición de anticuerpos IgG₂ y que la falla de la transferencia de protección calostroal se debía al pasaje solamente de anticuerpos IgG₁ a los corderos vía calostro. Sin embargo, Dempster y col. (1995) demostraron que las ovejas que habían sido expuestas a tres infecciones orales con huevos de *E. granulosus*, así como ovejas que han sido inmunizadas con antígenos de oncósferas de este parásito, transfirieron niveles de inmunidad significativos a corderos vía calostro.

Es posible lograr niveles de protección altos y confiables contra parásitos metazoarios complejos usando antígenos recombinantes definidos. Se han logrado niveles de protección entre 90 y 100% con antígenos recombinantes contra infecciones de *Taenia ovis* en ovinos, de *Taenia saginata* en bovinos y de *Echinococcus granulosus* en ovinos (Klei, 1997; Newton y Munn, 1999; Knox, 2000; Knox y cols., 2001; Capron y cols., 2002). Johnson y cols. (1989) describieron el clonado del antígeno hospedero-protectivo de oncósferas de *T. ovis*, To45W. La proteína recombinante To45W-GST fue confirmada como antígeno protector y esto condujo a su evaluación como vacuna contra infecciones de *T. ovis* en ovejas (Dempster y cols., 1996; Lawrence y cols., 1996; Harrison y cols., 1999). Con respecto a *T. saginata*, se observó que los antígenos recombinantes TSA-9 y TSA-18 (proteínas homólogas a To45W y to18 de *T. ovis*) por separado no inducían altos niveles de protección en ensayos de vacunación en vacunos. Sin embargo, los vacunos vacunados con estos dos antígenos juntos estaban fuertemente protegidos contra infecciones desafío con *T. saginata* (Lightowlers y cols., 1996a).

La proteína de fusión EG95-GST de *E. granulosus* indujo altos niveles de protección en ovinos contra una infección desafío con huevos de este parásito, en dos ensayos independientes (Lightowlers y cols., 1996).

El clonado y expresión de antígenos recombinantes de oncósferas de *E. granulosus*, y los ensayos de vacunación con estos antígenos en ovinos, ha sido descrito por Lightowlers y cols. (1996). Una librería de expresión de ADNc fue rastreada usando antisuero hiperinmune de ovejas producido contra oncósferas de *E. granulosus*. El producto de un clon (EG95) indujo el mayor nivel de protección en ovejas vacunadas con dicho antígeno recombinante (Lightowlers y cols., 1996), lográndose 94 y 96% de protección en ovinos contra una infección desafío con huevos de *E. granulosus* en dos ensayos independientes. EG95 podría ser el antígeno nativo de 23 kDa previamente mencionado (Heath y Lawrence, 1996; Woollard y cols., 2000a, 2001).

La vacuna EG95 ha sido efectiva en ensayos de vacunación experimentales en ovejas en Australia, Nueva Zelanda y Argentina (Lightowlers y cols., 1996, 1999) y en China (Heath y cols., 2003), sugiriendo que esta vacuna tiene el potencial de ser utilizado en el control de la transmisión de la hidatidosis a través de ovejas en diferentes partes del mundo. Se ha demostrado que la vacuna mantiene su efectividad por 12 meses, y los altos niveles de inmunidad se mantienen mediante inmunizaciones refuerzo cada 12 meses (Heath y cols., 2003). La misma ha sido probada en otros hospederos como cabras y vacas, obteniéndose también protección. Se transfieren altos niveles de inmunidad desde ovejas y vacas a corderos y terneros. Actualmente se está llevando a cabo en China un experimento a gran escala que comprende la vacunación de 150.000 corderos (Lightowlers y cols., 2003).

Las vacunas recombinantes de *T. ovis*, *T. saginata*, *T. solium* y *E. granulosus* se producen como proteínas de fusión a GST expresadas en *E. coli*. Teóricamente estas proteínas pueden ser producidas de forma ilimitada, pero es común que existan dificultades en la producción a gran escala de estas proteínas. Un método de producción alternativo de estas vacunas puede ser el uso de péptidos sintéticos basados en la secuencia conocida de los antígenos recombinantes protectivos. Woollard y cols. (1998) usaron péptidos solapantes de 14 aminoácidos de EG95 para mapear los determinantes de unión a anticuerpos. Con ellos se realizaron diversos ensayos de vacunación (Woollard y col., 2000, 2000a), demostrándose mediante ensayos de inhibición de ELISA que la proteína EG95 completa era capaz de impedir que los anticuerpos anti-EG95 de ovejas se unieran a EG95 unido a

las placas de ELISA; mientras que ninguno de los fragmentos individuales, ni usados simultáneamente, fueron capaces de inhibir la unión de estos anticuerpos. Basándose en estos experimentos se concluyó que los epitopes protectores eran conformacionales.

Se puede especular que la introducción de una vacuna generada a partir de un antígeno definido para impedir la cysticercosis o la hidatidosis, puede ser capaz de seleccionar de la población parasitaria parásitos con variantes antigénicas que no sean susceptibles a la vacuna. La transmisión de esta variante puede llevar a que el parásito resistente reemplace al genotipo susceptible a la vacuna mientras la vacuna se continúa utilizando (Lightowers y cols., 2003). Esto es muy factible que ocurra para *E. granulosus* porque se sabe que esta especie varía ampliamente ya que se han encontrado diferentes cepas alrededor del mundo (Thompson y McManus, 2002). El monitoreo de los efectos del uso de una vacuna en el genotipo de la población parasitaria puede proveer información a este respecto.

Si bien este tipo de vacunas es muy promisorio el costo de vacunación masiva de ovinos es elevado y no se logra la interrupción del ciclo del parásito debido a la existencia de otros hospederos intermediarios.

Marsland y cols. (2003) han construido un virus recombinante *Orf* (*Parapoxvirus*) que expresa el antígeno EG95 de *E. granulosus*. La expresión de esta proteína está regulada por un promotor de poxvirus temprano/tardío, y se logran niveles de expresión similares a los generados por virus *vaccinia* recombinantes. La construcción de virus *vaccinia* atenuados recombinantes y su uso como vectores vacunales ha sido muy estudiado (Moss, 1996). Si bien este recombinante no ha sido evaluado aún, el uso de virus recombinantes *orf* puede ser una herramienta valiosa para la presentación de antígenos en ovejas, por tratarse de un sistema de expresión de antígenos heterólogos similar al del virus *vaccinia*.

Hashemitabar y cols. (2005) realizaron ensayos para inducir inmunidad protectora en ratones y ovejas mediante la aplicación de antígenos de protoescolices y líquido hidático o antígenos de *E. granulosus* adultos. En estos estudios, se logró inducir inmunidad protectora en ratones con proteínas de PE y con líquido hidático, y en ovejas con homogeinados de adultos de *E. granulosus*, y los niveles de protección fueron de 72.1,

82.6, y 90.9% respectivamente. De este modo postulan que los antígenos crudos de *E. granulosus* pueden ser un buen candidato para vacunación de los hospederos intermediarios.

Existe poca información sobre estudios inmunológicos en perros censando antígenos de *E. granulosus*. Carol y Nieto (1998) usaron complejos inmunoestimulantes (iscoms) de antígenos del tegumento de protoescolices de *E. granulosus*, como inmunógenos en perros por la ruta intranasal lográndose una respuesta de anticuerpos de IgA secretoria significativa en saliva. Sin embargo, no se detectaron anticuerpos sistémicos de isotipo IgM, IgG o IgA en el plasma. Los autores concluyen que el tejido linfoide asociado a la mucosa nasofaríngea de perros está más estrictamente compartimentalizada que en otros mamíferos, siendo esta una ruta poco efectiva para la inoculación de antígenos en perros.

Otro estudio en perros fue realizado por Chabalgoity y cols. (2001), inmunizando perros por vía oral, con una construcción de *Salmonella* atenuada recombinante que expresa una proteína transportadora de ácidos grasos de *E. granulosus* (EgFABP1). Los perros generaron una buena respuesta humoral contra el antígeno pero una respuesta inmune celular pobre. Los autores proponen a la cepa de *Salmonella* utilizada (LVR01), como un buen vector para la construcción de vacunas orales para perros.

Uso de cepas de *Salmonella* y del virus vaccinia en vacunación

El uso de bacterias atenuadas que son incapaces de causar enfermedad clínica pero disparan una infección autolimitante que conduce a la estimulación de inmunidad protectora representa una alternativa atractiva con respecto a las vacunas construidas en base a subunidades bacterianas o bacterias muertas. La habilidad de las vacunas bacterianas vivas atenuadas de replicar en el huésped resulta en la producción de respuestas inmunes fuertes y duraderas, las cuales mimetizan a las estimuladas por infecciones naturales (McGhee y cols., 1992; Shata y cols., 2000).

Idealmente, la tasa de crecimiento de la vacuna bacteriana viva no debería ser aumentada significativamente en animales inmunodeficientes. Sin embargo, la atenuación excesiva

puede comprometer la habilidad de la vacuna de persistir en los tejidos y de inducir inmunidad protectora (Mastroeni y cols., 2000).

La bacteria *Salmonella* ha sido ampliamente utilizada como vacuna bacteriana viva atenuada. Recientemente se han introducido múltiples mutaciones atenuantes, definidas e irreversibles en el genoma de *Salmonella* en genes involucrados en la supervivencia de la bacteria. Ellos incluyen a genes "de mantenimiento" como los involucrados en la biosíntesis de componentes estructurales bacterianos (por ej. LPS, proteínas de la membrana externa) o en la síntesis de metabolitos esenciales (purinas, pirimidinas, histidina, metionina, AMPc, y aminoácidos aromáticos) y "genes de virulencia verdaderos", involucrados específicamente en la resistencia bacteriana a mecanismos de defensa del huésped (Fields y cols., 1986). Por ejemplo, *htrA* (Johnson y cols., 1991) está involucrado en la resistencia al estrés oxidativo.

El uso de *Salmonellas* vivas atenuadas que portan plásmidos recombinantes con información para sintetizar un antígeno de interés, es una estrategia atractiva para la construcción de vacunas multivalentes. De esta forma el antígeno recombinante se muestra efectivamente al sistema inmune generándose una respuesta inmune óptima.

Antígenos heterólogos pueden expresarse en *Salmonella* como fusiones con proteínas recombinantes o nativas. La fusión con antígenos como la toxina del tétanos puede aumentar la inmunogenicidad de "antígenos débiles". Por ejemplo, la expresión de proteínas completas o de múltiples copias en tandem de péptidos como fusiones C-terminales al fragmento C de la toxina del tétanos (TetC) aumenta la inmunogenicidad de las construcciones (Khan y cols., 1994; 1994a). Existe una corta región bisagra entre TetC y el antígeno clonado que provee una separación espacial y temporal entre las dos proteínas para promover el plegamiento correcto.

Las vacunas recombinantes pueden disparar inmunidad humoral protectora. Por ejemplo, respuestas protectoras de anticuerpos contra la proteína M de *Salmonella pyogenes*, la proteína de superficie externa mayor (OspA) de *Borrelia burgdorferi*, el antígeno capsular F1 de *Yersinia pestis*, el fragmento T de la toxina del tétanos o PspA de *S. pneumoniae* han

sido generadas por vacunación con *Salmonellas* recombinantes (Poirier y cols., 1988; Chatfield y cols., 1992b; Dunne y cols., 1995; Oyston y cols., 1995; Leary y cols., 1997; Titball y cols., 1997). Destacamos especialmente la vacunación oral de ratones con una cepa de *Salmonella* atenuada expresando el antígeno Sm14. Este antígeno pertenece a la misma familia que uno de los antígenos que plantearemos estudiar (EgFABP2) y fue aislado también de un platelminto parásito, *Schistosoma mansoni*. Esta construcción logró un nivel de protección contra schistosomiasis importante y disminuyó el número de huevos en el intestino de los ratones vacunados (Pacheco y cols., 2005).

Salmonella puede expresar antígenos heterólogos de otros patógenos, y puede ser administrada en superficies mucosas para producir respuestas inmunes sistémicas y locales fuertes. En varios casos se ha demostrado que estas vacunas recombinantes pueden producir protección contra salmonellosis y contra el/los patógeno/s de donde deriva el/los antígenos heterólogos (Roberts, 1994; Hormaeche, 1995).

La expresión de la proteína GST P28 de *Schistosoma mansoni* como una fusión a TetC en una cepa vacunal de *Salmonella* condujo a una vacuna experimental capaz de proteger a ratones contra salmonellosis, tétanos y schistosomiasis luego de la administración de una sola dosis (Khan y cols., 1994a). Una sola dosis de una cepa vacunal de *Salmonella* expresando copias en tandem de un péptido de la glicoproteína D (gD) del virus herpes simplex como fusión a TetC produjo altos títulos de anticuerpos específicos en suero y protegió a ratones contra el desafío viral (Chabalgoity y cols., 1996). Las fusiones a TetC también han sido usadas para la expresión estable de antígenos heterólogos que de otra manera eran susceptibles a la degradación proteolítica (Gomez-Duarte y cols., 1995; Barry y cols., 1996).

La expresión desregulada de alto nivel de antígenos extraños puede ser tóxica para la bacteria, conduciendo a la selección de cepas que han perdido el plásmido. Es por ello que se emplea promotores inducibles *in vivo*, fuertes pero regulables, asegurando una baja actividad *in vitro* que aumenta cuando la bacteria alcanza localizaciones apropiadas en el tejido (por ej. fagocitos y células presentadoras de antígenos). Un promotor muy usado es el de la reductasa del óxido nítrico de *E. coli* (*nirB*), el cual es activado en condiciones

anaeróbicas (Oxer y cols., 1991). Este promotor ha sido utilizado exitosamente en vacunas de *Salmonella* para dirigir la expresión de antígenos recombinantes de bacterias, virus y parásitos (Chatfield y cols., 1992a; Khan y cols., 1994; 1994a; Karem y cols., 1995; Chabalgoity y cols., 1996; 1997; Londono y cols., 1996; McSorley y cols., 1997).

Además, las *Salmonellas* recombinantes han sido evaluadas para el desarrollo de vacunas menos convencionales como vacunas anti-tumor, vacunas vivas orales contra la alergia o vacunas contra la infertilidad (Srinivasan y cols., 1995; Vrtala y cols., 1995; Medina y cols., 1999).

El virus vaccinia es un poxvirus (miembro del género Orthopoxvirus de la familia Poxviridae) introducido en 1982 como un vector para la expresión transitoria de genes en células de mamíferos (Panicali y Paoletti, 1982; Mackett y cols., 1982). Este sistema de expresión difiere de otros en que la transcripción ocurre en el citoplasma de la célula en vez de en el núcleo.

Este sistema de expresión de antígenos es ampliamente usado debido a que este virus, fuertemente atenuado, presenta un amplio rango de hospederos, permite el clonado de fragmentos largos de ADN, usa promotores y señales de terminación de la transcripción específicos de vaccinia, presenta transcripción temprana y tardía, produce altos niveles de síntesis proteica, genera un correcto transporte, secreción, procesamiento y modificaciones post-traduccionales.

Genes o secuencias codificantes derivadas de procariotas, eucariotas o virus han sido expresados usando vectores del virus vaccinia. Generalmente, el gen de interés es clonado corriente abajo de un promotor de vaccinia y este cassette de expresión es insertado en el genoma viral por recombinación homóloga. El cassette es flanqueado por ADN de vaccinia para permitir la recombinación homóloga cuando el plásmido es transfectado en células que han sido previamente infectadas con el virus vaccinia salvaje. Comúnmente el cassette es flanqueado por segmentos del gen no-esencial de timidina quinasa (TK) de vaccinia, de modo que la recombinación resulta en la inactivación de TK. Los virus con un fenotipo TK⁻ pueden distinguirse de los TK⁺ infectando una línea celular TK⁻ en presencia de 5-bromo-

deoxiuridina, la cual es fosforilada por la TK y es letalmente incorporada en el genoma viral. La co-expresión del gen *lacZ* de *Eschericia coli* permite el rastreo mediante color de las placas virales recombinantes con X-gal (Moss y Flexner, 1987).

Los virus vaccinia recombinantes han sido importantes para estudios inmunológicos (Bennink y Yewdell, 1990), y pueden ser utilizados para infectar animales y así poder determinar respuestas humorales y celulares contra proteínas específicas. La inocuidad del virus vaccinia ha sido utilizada para controlar y erradicar la viruela en humanos (Behbehani, 1983), estimulando su desarrollo como vector de clonado y expresión. Se han utilizado virus recombinantes expresando antígenos de superficie de la gripe, de la hepatitis B y del herpes simplex, para conferir protección contra estas enfermedades (Smith y cols., 1984).

Se ha construido un virus vaccinia recombinante que expresa la glicoproteína del virus de la rabia (cepa ERA). Este virus recombinante ha sido empleado con éxito contra la rabia. Se llevaron a cabo experimentos en conejos, ratones y zorros, en los que se obtuvo una alta respuesta humoral y una gran protección contra el virus de la rabia (Kieny y cols., 1984; Blancou y cols., 1986). Los zorros fueron inoculados por vía subcutánea, intradérmica u oral, con 10^8 unidades formadoras de placa (ufp) por individuo. En todos los casos se obtuvo protección completa contra una infección desafío severa con el virus de la rabia (Blancou y cols., 1986).

Utilizando una construcción similar como vacuna se logró la erradicación a gran escala de la rabia en zorros de los bosques del sur de Bélgica, simplemente arrojando cabezas de pollo u otro tipo de alimento inoculado con el virus recombinante (Brochier y cols., 1991).

El MVA deriva de la cepa Ankara del virus vaccinia luego de más de 500 pasajes en fibroblastos de embriones de pollo, de esta manera se logró su atenuación. La misma fue censada mediante la infección de casi 120000 individuos caucásicos sin ningún reporte de efectos secundarios, aunque muchos de ellos presentaban alto riesgo de desarrollo de complicaciones (Mayr y cols., 1978). El defecto en el ciclo de vida viral del MVA se da en

las etapas finales del programa morfogenético, no alterándose la expresión génica viral temprana o tardía o los niveles de expresión de proteínas heterólogas (Sutter y Moss, 1992).

Diferentes modelos animales virales y tumorales (Carroll y cols., 1997) han sido utilizados para demostrar la eficacia de MVA recombinantes en el desarrollo de inmunidad protectora. Se logró inmunidad contra el virus influenza y el virus parainfluenza tipo 3 luego de inoculación intramuscular e intranasal del MVA recombinante expresando hemaglutinina y nucleoproteínas en modelos murinos (Sutter y cols., 1994; Wyatt y cols., 1996). En ratones ha sido demostrado que MVA es un vector eficiente para el desarrollo de inmunidad de mucosas contra antígenos del HIV (Belyakov y cols., 1999). MVA recombinantes producen una baja respuesta inmune contra sí mismo mientras provoca una respuesta inmune mayor contra el antígeno heterólogo.

Las citoquinas activadas en respuesta al MVA están sesgadas hacia un patrón del tipo Th1. En ratones infectados con MVA los niveles de citoquinas proinflamatorias IL-6 y factor de necrosis tumoral alfa fueron mayores que en los infectados con vaccinia salvaje (cepa "Western Reserve"). Esto es relevante para el desarrollo de estrategias de vacunación con MVA en donde se requiere más de una inmunización, ya que la respuesta inmune contra el vector es baja y la respuesta inmune contra el antígeno recombinante aumenta con los refuerzos repetidos o con la combinación de vectores (Ramírez y cols., 2000).

MVA recombinantes produciendo antígenos del virus de inmunodeficiencia se encuentran entre los primeros vectores virales en ser evaluados como candidatos vacunales en humanos (Cosma y cols., 2003; Mwau y cols., 2004).

La capacidad principal de MVA de producir respuesta de anticuerpos neutralizantes de virus altamente efectivas, ha sido demostrada por la caracterización de vectores vacunales contra el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) y el citomegalovirus (CMV) humano (Wang y cols., 2004; Bisht y cols., 2004).

El potencial para activar el complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) de clase I y II restringido a las respuestas de células T CD8⁺ y CD4⁺ contra antígenos recombinantes, ha convertido a las vacunas de MVA en atractivas para aproximaciones inmunoterapéuticas

contra cáncer y enfermedades intracelulares parasitarias o infecciosas bacterianas. Las vacunas en base a MVA recombinantes expresando diferentes antígenos asociados a tumores específicos para una variedad de cánceres están siendo testeadas en ratones (Hodge y cols., 2003; Mulryan y cols., 2002; Espenschied y cols., 2003) y humanos (Rochlitz y cols., 2003).

Se han invertido grandes esfuerzos para el desarrollo de vacunas contra la malaria causada por parásitos *Plasmodium* spp. Preclínicamente, regímenes de inmunización primera inmunización-recuerdo heterólogos han producido una fuerte inmunidad de células T CD8+ y han mostrado protección sustancial en ratones contra *Plasmodium berghei* (Anderson y cols., 2004) o *Plasmodium yoelii* (Gonzalez-Aseguinolaza y cols., 2003). Además la seguridad y la inmunogeneicidad han sido establecidas en ensayos clínicos con voluntarios humanos, expuestos naturalmente (Moorthy y cols., 2003) o experimentalmente a *Plasmodium falciparum* (McConkey y cols., 2003).

Proteínas transportadoras de ácidos grasos y tropomiosina de *E. granulosus*

Una línea central de investigación de la Sección Bioquímica de la Facultad de Ciencias ha sido el estudio de las bases moleculares del desarrollo de *Echinococcus granulosus* y de la adaptación específica hospedero-parásito. En este marco, se aislaron una serie de genes como marcadores moleculares.

A pesar de que actualmente se dispone de un número importante de genes de este parásito, muy poco se conoce sobre las características antigénicas y las propiedades inmunogénicas de las proteínas correspondientes.

Hemos seleccionado para desarrollar este trabajo de maestría dos proteínas transportadoras de ácidos grasos (FABP) y una tropomiosina de *E. granulosus*.

Las FABPs son proteínas citosólicas de bajo peso molecular (14-15 kDa). Estas proteínas podrían ser claves para la supervivencia y desarrollo del parásito en tanto serían las responsables de la internalización de ácidos grasos, provenientes del hospedero, y su distribución dentro de los compartimentos celulares del parásito. Estas proteínas revisten

vital importancia en tanto los cestodes son incapaces de sintetizar *de novo* sus ácidos grasos de cadena larga, ellos dependen de la captación de estos lípidos del hospedero (Smyth y McManus, 1989).

Mediante el rastreo de una librería de ADNc de protoescolices, Esteves y cols. (1993, 2003) aislaron varios genes de expresión diferencial en PEs, usando suero anti-protoescolices y suero anti-capa germinativa generados en conejos. La secuencia codificante aislada de uno de ellos está completa y codifica para una proteína de 15.5 kDa con una alta homología con las FABPs, de esta manera fue nombrada EgFABP1. Este gen se expresa en la región subtegumentaria y como era esperable, no se observa expresión en la capa germinativa de la larva metacestode.

Un segundo gen de la familia de las FABPs (*EgFABP2*) fue aislado a partir del rastreo de una biblioteca genómica de *E. granulosus* utilizando como sonda la secuencia codificante de *EgFABP1* (Esteves y cols., 2003a). La secuencia codificante de *EgFABP2* está completa y presenta 76% de identidad con EgFABP1. Ambas proteínas presentan similitud con la subfamilia de las FABPs cardíacas de mamíferos y ambas se expresan en protoescolices.

Las propiedades fisicoquímicas, estructurales y filogenéticas de EgFABP1 han sido estudiadas en detalle (Esteves y cols., 1997; Paulino y cols., 1998; Alvite y cols., 2001, Jakobsson y cols., 2003).

Se ha observado que FABPs homólogas de *Schistosoma mansoni* y *Fasciola hepatica* confieren un alto grado de protección en ratones y ovejas (Hillyer y cols., 1988; Tendler y cols., 1995; Martinez-Fernandez y cols., 2004; Hillyer y cols., 2005). Estas dos moléculas generan protección cruzada, y la FABP de *S. mansoni* ha sido propuesta como un candidato vacunal dual para ambas infecciones helmínticas (Tendler y cols., 1995).

El uso de cepas de *Salmonella* atenuadas para presentar antígenos recombinantes al sistema inmune es una estrategia atractiva para la construcción de vacunas multivalentes. Ha sido demostrado que estas vacunas recombinantes pueden producir protección contra el patógeno de donde deriva el antígeno heterólogo.

Se han realizado ensayos de vacunación oral de perros con la cepa de *Salmonella* LVR01 recombinante: LVR01-pTECH2/EgFABP1 (Chabalgoity y cols., 2001). Previamente se demuestra que EgFABP1 es inmunogénica en ratones cuando es expresada por la cepa vacunal de *Salmonella* atenuada SL3261 (Chabalgoity y cols., 1997). En ambos ensayos EgFABP1 se expresa como una proteína de fusión con el fragmento C de la toxina del tétanos (TetC).

Esta construcción generó en perros respuesta inmune humoral anti-*Salmonella*, anti-TetC, y anti-EgFABP1 y respuesta inmune celular anti-*Salmonella*, anti-TetC y anti-EgFABP1 (en una proporción de perros, 1 de 3). Este sistema es auspicioso para la generación de una vacuna oral multivalente para perros (Chabalgoity y cols., 2001).

La secuencia codificante de la tropomiosina de *E. granulosus* también fue aislada como un gen de expresión diferencial, mediante el rastreo de una librería de ADNc de protoescleróticos utilizando sueros producidos contra PE y contra la capa germinal (Esteves y cols., 2003). La secuencia de ADNc aislada codifica para una proteína con alta homología con las tropomiosinas; en base a ésta comparación la secuencia no estaría completa, faltando alrededor de 321 b del extremo 5'.

La tropomiosina es una proteína muy antigénica y está ampliamente distribuida a lo largo de la escala evolutiva desde levaduras hasta vertebrados. Generalmente presenta varias isoformas a partir de un mismo gen, que surgen a partir del procesamiento alternativo del transcrito primario, existiendo en varios organismos más de un gen (Perry, 2001; Schevzov y cols., 2005). Algunas de estas isoformas son componentes de células musculares, mediando la contracción mediante la asociación con actina y miosina. Las isoformas no musculares estabilizarían la estructura de los microfilamentos e intervendrían en el movimiento de los gránulos intracelulares. Este gen es utilizado como modelo para el estudio del procesamiento alternativo del transcrito primario en vertebrados (Perry, 2001).

La tropomiosina pertenece a una familia multigénica de proteínas de unión a la actina. Esta proteína forma dímeros cabeza-cola con estructura α -helicoidal "coiled-coil", uniéndose a lo largo del surco α -helicoidal de los polímeros de actina. Muchas de las proteínas fibrosas con estructura "coiled-coil", la tropomiosina inclusive, presentan un patrón típico de

heptapéptidos formados por repetidos de siete residuos de forma (*a-b-c-d-e-f-g*) donde los residuos *a* y *d* son generalmente apolares (Crick, 1953; Stone y cols., 1975; Cohen y Parry, 1990).

La tropomiosina es uno de los pocos antígenos que inducen inmunidad protectora contra nemátodos parásitos en experimentos de vacunación, por ejemplo en *Onchocerca volvulus* (Taylor y cols., 1996; Jenkins y cols., 1998). También, se ha descubierto que la tropomiosina es el principal alérgeno de los moluscos (Hou Chu y cols., 2000).

Fraize y cols. (2005) investigaron la inmunogenicidad de rEgA31 y rEgTrp en ratones. EgA31 se expresa en protoescolices y pertenece a la familia de paramiosinas (Fu y cols., 1999). Se ha demostrado que rEgA31 induce la producción de anticuerpos y respuesta inmune celular activa durante la infección de *E. granulosus* en perros (Fu y cols., 2000). Estos dos antígenos separados y juntos generaron altos títulos de anticuerpos IgG e IgA. El isotipo IgG predominante fue IgG₁ en los tres ensayos (los dos antígenos por separado y juntos). También inducen respuesta inmune celular, generando una respuesta mixta Th1/Th2.

Si bien el rol de la tropomiosina (Trp) en el músculo esquelético se conoce bien, su rol en las células no-musculares es poco conocido y se postula que estabilizaría los filamentos de actina modulando la interacción con proteínas responsables de la regulación de la dinámica de actina. Los filamentos de actina están formados por filamentos de composición diferente que surgen de la combinación de distintas isoformas de actina y tropomiosina, reguladas temporalmente y espacialmente en la mayoría de los sistemas celulares (Gunning y cols., 2005).

En el músculo esquelético la tropomiosina regula la contracción muscular (Greaser y Gergely, 1971). En el estado relajado, la Trp bloquea el sitio de unión de miosina en la actina y la miosina es desenganchada del filamento de actina. Luego de la estimulación neuronal del músculo y liberación del calcio intracelular, el complejo troponina-tropomiosina une calcio. Esto conduce un movimiento lateral de la Trp en el surco mayor

del filamento de actina, descubriendo el sitio de unión de miosina de la actina necesario para la unión de las cabezas de miosina a la actina (Gordon y cols., 2000; Tobacman, 1996). Esta interacción conduce al desplazamiento de los filamentos de miosina con respecto a la actina y a la contracción muscular.

Las más de 40 isoformas de tropomiosina existentes en un mismo organismo (mamíferos y aves) se generan a partir de cuatro genes diferentes cuyos transcritos primarios pueden originarse mediante el uso alternativo de promotores y/o mediante procesamiento alternativo (Pittenger y cols., 1994).

Históricamente, las tropomiosinas se dividen entre dos clases, las de alto peso molecular y las de bajo peso molecular, de 284 AA y 247 AA respectivamente.

Las isoformas de tropomiosina son cuantitativamente y cualitativamente reguladas en el desarrollo entre los diferentes tipos celulares (Perry, 2001; Schevzov y cols., 2005) y en estados de enfermedad como el cáncer (Matsumura y cols., 1983; Hendricks y Weintraub, 1981; Cooper y cols., 1985; Leavitt y cols., 1987; Wang y cols., 1996; Franzen y cols., 1996). El repertorio selectivo, incluyendo número y tipo de isoformas de tropomiosina expresadas en diferentes tipos celulares, es estrictamente regulado por mecanismos aún desconocidos (Schevzov y cols., 2005).

Las tropomiosinas son funcionalmente distintas y desarrollan algunas funciones esenciales. La variedad de combinaciones entre isoformas de tropomiosina y actina genera filamentos de actina diferentes. La elección de isoforma provee un mecanismo que controla espacialmente el tamaño del conjunto de filamentos de actina y confiere diferencias funcionales entre ellos. Las diferencias funcionales surgen de la habilidad de las tropomiosinas de regular en forma específica los motores de miosina con los filamentos de actina. La especificidad de la función de cada isoforma de tropomiosinas ha sido demostrada en modelos genéticos desde levaduras a mamíferos.

Objetivos

La búsqueda y caracterización de moléculas candidatas a vacunas antihelmínticas contra la echinococosis quística ha ocupado varias décadas de estudio y aún no ha cesado. Creemos que una manera efectiva de eliminar tan importante enfermedad en el tercer mundo, es mediante el desarrollo de vacunas que impidan la infección del hospedero definitivo. Éste se limita a cánidos principalmente perros, facilitando así la administración de las vacunas por vía oral. De esta manera se lograría bloquear el ciclo del parásito impidiendo la producción de huevos infectivos capaces de infectar a los diversos hospederos intermediarios.

La tropomiosina es una proteína muy antigénica y generalmente presenta varias isoformas (musculares y no-musculares) generadas a partir de un mismo gen mediante el procesamiento alternativo del transcrito primario, existiendo en varios organismos más de un gen. Este tipo de procesamiento no ha sido reportado aún en *E. granulosus*. La tropomiosina de los mamíferos es utilizada como modelo de estudio del procesamiento alternativo.

Este trabajo tiene dos centros de interés, la caracterización del gen de la tropomiosina de *Echinococcus granulosus* (*EgTrp*) y sus isoformas, y el desarrollo de sistemas de expresión de los antígenos *EgTrp*, *EgFABP2* y *EgFABP1* de este parásito, para la vacunación oral de perros.

1) En cuanto a la caracterización de *EgTrp*, nos proponemos dilucidar la organización génica, el patrón del procesamiento alternativo y la localización de la expresión de la tropomiosina de *Echinococcus granulosus*. A partir de este estudio no sólo se aportará información al conocimiento de la biología del parásito sino que podrían surgir moléculas vinculadas al procesamiento del transcrito primario que pueden resultar blancos de drogas o vacunas.

2) Para desarrollar el segundo objetivo, nos propusimos clonar y expresar los antígenos *EgTrp* y *EgFABP2* en cepas vacunales de *Salmonella* atenuadas y en el virus vaccinia Ankara modificado (aquí incluimos a *EgFABP1*). Se estudiará también la inmunogenicidad de estas construcciones en ratones. Estos estudios permitirán elegir la combinación sistema de expresión-antígeno más eficiente para ser evaluado en perros, incluyéndose ensayos de protección.

Materiales y métodos

1. Material biológico

Material parasitario

El material parasitario utilizado proviene de quistes hidáticos frescos de hígado, pulmón y corazón de vaca, obtenidos de diversos frigoríficos uruguayos (principalmente Schneck y San Jacinto). Las vísceras se lavan con etanol 70% previo a la disección del quiste. El líquido hidático se extrae con jeringa, los protoescólices (PE) decantan y se lavan varias veces con PBS estéril. En algunos casos se filtran con gasa para retirar los restos de membrana. Se monitorea la vitalidad y número, mediante tinción con eosina y observación al microscopio. Luego son procesados para inmunolocalización o para extracción de ácidos nucleicos o proteínas.

También se extraen las membranas germinativa y laminar por desprendimiento, las cuales se lavan en PBS para obtención de PE.

Ratones

Los ratones utilizados tanto para los estudios de estabilidad del plásmido *in vivo* como para inmunizaciones fueron hembras BALB-C mayores de 8 semanas, provenientes del bioterio del Instituto de Higiene (UdelaR), del Instituto Rubino (DILAVE, MGAP) y del Departamento de Medicina Veterinaria Clínica (Cambridge, U.K.).

2. Medios de cultivo y soluciones

Medios de cultivo utilizados para crecimiento de bacterias:

LB 1X:	2TY:
Peptona 10 g/l	Triptona 16 g/l
Extracto de levadura..... 5 g/l	Extracto de levadura 10 g/l
NaCl..... 5 g/l	NaCl 5 g/l

LB Agar: LB 1X + 15 g/l de agar

Medios de cultivos para células eucariotas:

RPMIc 1640 (NCBI) complementado con:	GMEM (Sigma) complementado con:
10% SFB (suero fetal bovino)	10% SFB (suero fetal bovino) o
4 mM glutamina	10% SFBN (suero fetal de bovino neonato) o
100 µg/ml streptomicina-neomicina	2% SFB o
	2% SFBN
	10% TPB (caldo triptosa fosfato)
	100 µg/ml penicilina-estreptomicina
	2 mM de glutamina

Soluciones

Las soluciones empleadas fueron preparadas según Sambrook y cols., 1989. Las soluciones particulares serán indicadas en el texto.

TAE 50X:

Tris base 242 g/l
Ácido acético glacial 57.1 ml/l
EDTA 0.5M (pH 8.0) 100 ml/l

TBST:

Tris-HCl pH 8 10 mM
NaCl 150 mM
Tween 20 0.1 %

Tampón fosfatasa alcalina:

Tris-HCl pH 9.5 100 mM
NaCl 100 mM
MgCl₂ 5 mM

SSC 20X

Citrato tri-sódico 88.23 g/l
NaCl 175.32 g/l
pH entre 7 y 8

PBS:

NaCl 8 g/l
NaH₂PO₄ 0.9 g/l
KH₂PO₄ 0.2 g/l
KCl 0.2 g/l

TE:

Tris-HCl pH 8 10 mM
EDTA 1 mM

NBT:

0.5 g de NBT en 10 ml de
dimetilformamida 70%

BCIP:

0.5 g de BCIP (sal sódica) en 10
ml de dimetilformamida 100 %

3. Cepas de bacterias, virus y plásmidos

Bacterias

E. coli XL1-Blue : *sup E44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ F⁺ (proAB⁺ lacI^q lacZΔM15 Tn10(tet^r))*

E. coli DH5α: *sup E44 ΔlacU169 (φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 rel A1*

E. coli BL21-CodonPlus(DE3)-RIL: *E. coli* B F- *ompT hsdS(r_B-m_B-) dcm⁺ Tet^r gal λ (DE3) endA Hte (argU ileY leuW Cam^r)*

E. coli M15(pREP4): *Nal^S Str^S rif^S lac⁻ ara⁻ gal⁻ mtl⁻ F⁻ recA⁺ uvr⁺*

Salmonella typhimurium SL5338: *galE r⁻ m⁺* (Brown y cols., 1987)

Cepas atenuadas vacunales de *Salmonella*:

- *S. typhimurium* C5aroD (*aroD*) (Miller y cols., 1989)

- *S. typhimurium* SL3261 (*aroA*) (r^+ , m^+) (Hoiseth y Stocker, 1981)
- *S. enteritidis* Se795aroA (*aroA*) (Cooper y cols., 1990)
- *S. typhimurium* BRD726 ($\Delta htrA$) (Chatfield y cols., 1992)
- *S. typhimurium* C5htrA ($\Delta htrA$) (Johnson y cols., 1991)
- *S. typhimurium* LVR01 (*aroC*) (Chabalgoity y cols., 2001)

Virus

Bacteriófago p22: fago temperado derivado de *S. typhimurium* LT22

Virus Vaccinia Ankara modificado (MVA): derivado de la cepa Ankara de vaccinia virus, a través de más de 500 pasajes en fibroblastos de embriones de pollo

Plásmidos

pGEM-T easy (Promega): derivado del pBluescript II KS, conveniente para el clonado de productos de PCR, contiene los promotores para la ARN polimerasa T7 y SP6 flanqueando el sitio de clonado múltiple en la región codificante del α -péptido de la enzima β -galactosidasa.

pQE11 (Qiagen): vector de expresión derivado de los plásmidos pDS56/RBSII y pDS781/RBSII-DHFRS; contiene un elemento promotor/operador regulable por el represor *lacI* de *E. coli* e inducible por IPTG, el sitio de unión al ribosoma RBSII, y un segmento que codifica para 6 histidinas en la región N-terminal de la proteína recombinante. Presenta el gen β -lactamasa (Amp^r).

pET-5a (Promega): vector de expresión derivado del plásmido pBR322; la expresión de la proteína recombinante se encuentra bajo el control transcripcional del bacteriófago T7, la misma es inducida por IPTG. El vector presenta un sitio de unión al ribosoma.

pTECH2: permite la expresión de proteínas como fusiones C-terminales al fragmento C de la toxina del tétanos (TetC), conducida por el promotor inducible anaeróticamente *nirB* (Khan y cols., 1994). Presenta el gen β -lactamasa (Amp^r) y el origen de replicación del pBR322. (figura 3)

pSC11: vector de coexpresión que dirige la inserción de un gen heterólogo junto con el gen β -galactosidasa de *Escherichia coli*, en el locus de timidina quinasa del genoma del virus vaccinia. Contiene un promotor temprano-tardío *P7.5* adyacente a un sitio de policlonado, y un promotor tardío *P11* para expresar el gen *LacZ*. El cassette de expresión está flanqueado por segmentos del gen *TK* de vaccinia. Presenta gen de resistencia a la ampicilina. (Chakrabarti y cols., 1985). (figura 4)

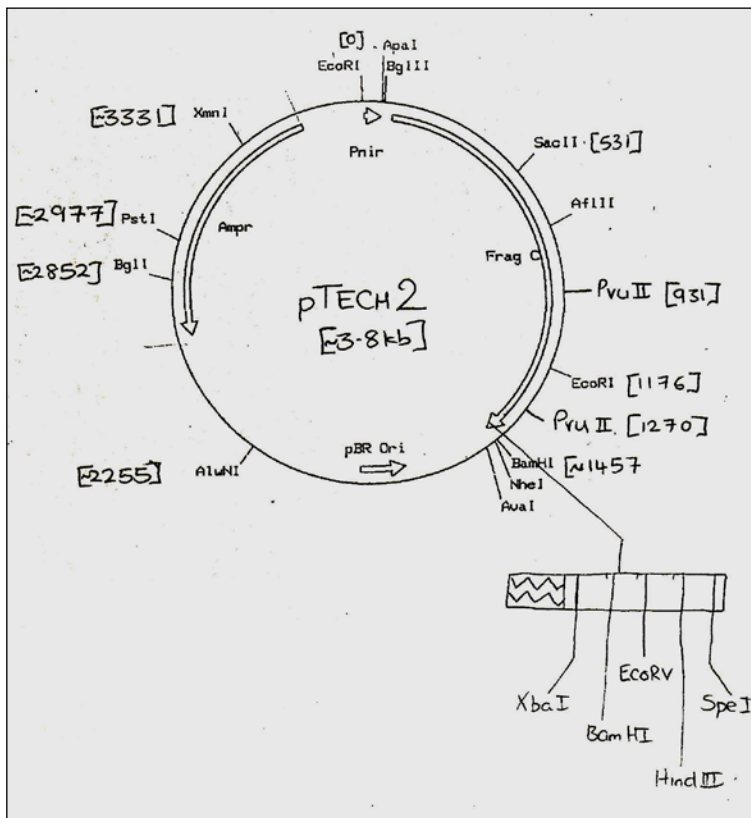


Figura 3. Vector de expresión pTECH2.

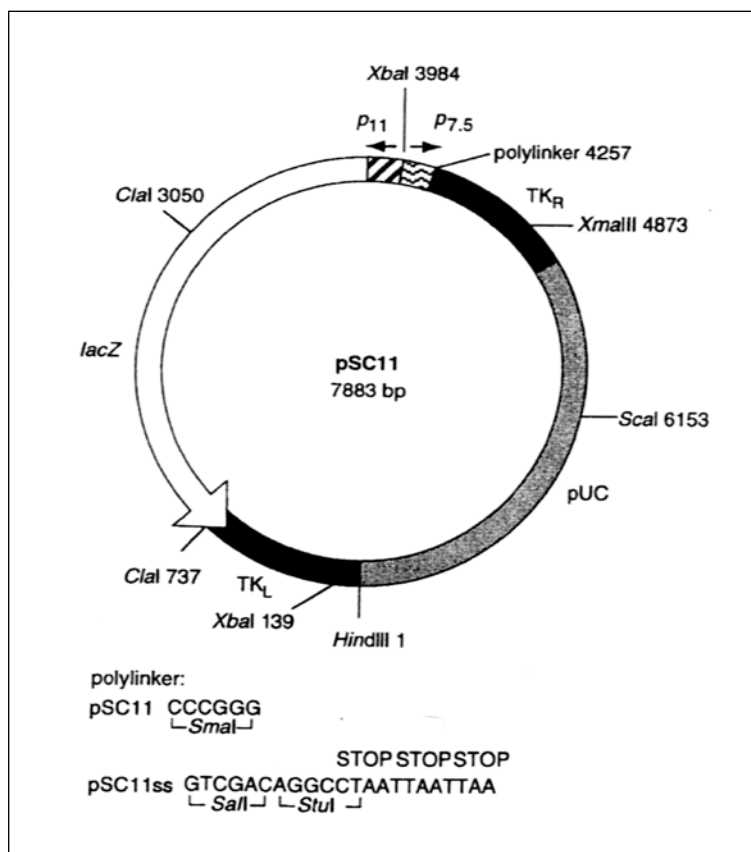


Figura 4. Vector de expresión pSC11.

4. Líneas celulares y cultivo celular

Células QT35: línea celular derivada de fibrosarcoma de codorniz Japonesa (fibroblastos)

Células BrdU BHK: línea celular de fibroblastos de riñón de hamster bebé, TK

Las células se descongelan y se crecen en GMEM complementado (Glasgow Minimum Essential Medium) con 10% de SFB para las células QT35 y 10% de SFBN para las BrdU BHK.

Se incuban en estufa a 37°C con atmósfera de 5% de CO₂. Cuando las células están confluentes, se retira el medio, se lavan con PBS 1X y se tratan con tripsina/EDTA (0.25% tripsina/0.02% EDTA) 5 minutos a 37°C. Se colocan en un tubo con medio y se centrifugan 5 minutos a 1800xg. El precipitado se resuspende en medio de cultivo y las células se cuentan en un hematocitómetro.

Para obtener confluencia al otro día se siembra:

- 0.9 x 10⁶ células QT35 por pocillo en una placa de 6 pocillos
- 0.8 x 10⁶ células BrdUBHK por pocillo en una placa de 6 pocillos
- 2 x 10⁶ células QT35 o BrdUBHK en un frasco T25
- 1 x 10⁷ células QT35 o BrdUBHK en un frasco T75
- 5 x 10⁶ células QT35 o BrdUBHK en un frasco T175 (crecimiento 3 días para confluencia)

5. Estrategias de clonado y selección de clones

Para el clonado en pTECH2, las secuencias codificantes de *EgFABP2* y *EgTrp* se amplifican por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) utilizando cebadores específicos con un sitio de restricción para *Bam* H1 en el cebador directo y un sitio de restricción para *Hind* III en el cebador reverso. Se utiliza como molde pET5a-EgFABP2 y pQE11-EgTrp respectivamente. Los productos de PCR y el plásmido pTECH₂ se digieren con *Bam* H1 y *Hind* III. Se realiza reacciones de ligación y transformación química de las bacterias SL5338 competentes. Las colonias recombinantes son rastreadas en base a la diferente movilidad plasmídica en electroforesis de agarosa luego de la purificación de plásmido. También se verifica la presencia del inserto en los plásmidos recombinantes mediante PCR con los cebadores específicos previamente utilizados, y digestiones con las enzimas de restricción usadas para el clonado. Se confirma la secuencia del fragmento insertado mediante secuenciación automática con cebadores del plásmido.

Para el clonado de las secuencias codificantes de *EgFABP1*, *EgFABP2* y *EgTrp* en pSC11 se realiza una PCR utilizando cebadores específicos con el codón de inicio en el cebador directo y un codón de terminación en el cebador reverso. Se utiliza como molde pET5a-EgFABP1, pTECH₂/EgFABP2 y pTECH₂/EgTrp respectivamente. Se trata el producto de PCR con Klenow (fragmento mayor de la ADN polimerasa I) (Invitrogen) para asegurar la existencia de extremos romos. Se extrae el producto de PCR tratado con fenol-cloroformo y se fosforila con T4 polinucleótido quinasa (Invitrogen) para agregar un grupo fosfato al extremo 5' que permita la ligación.

Por otro lado, se digiere el plásmido pSC11 con SmaI, se purifica y se trata con la fosfatasa CIP (fosfatasa intestinal de ternero) (Roche) para evitar posibles ligaciones sin inserto. Luego, se lleva a cabo la ligación de extremos romos y la transformación química de células *E. coli* DH5 α . El rastreo de las colonias recombinantes se realiza mediante digestiones enzimáticas y PCR como se menciona anteriormente. Por último se confirma la secuencia mediante secuenciación automática utilizando el cebador p7.5 del plásmido pSC11.

El clonado de la secuencia codificante completa de la tropomiosina de *E. granulosus* se llevó a cabo mediante PCR con un cebador directo diseñado a partir de la secuencia de *E. multilocularis* (Df5nt directo) y el cebador reverso diseñado a partir de la secuencia ya conocida de la tropomiosina de *E. granulosus* (Df5ct reverso). Se utiliza ADNc de *E. granulosus* como molde. Posteriormente se clona el producto de PCR en el vector pGEM-T Easy (Promega) y se transforman células *E. coli* XL1-Blue competentes. Se seleccionan las colonias recombinantes blancas crecidas en LB-agar con ampicilina, X-gal e IPTG. El clonado se verifica mediante digestiones, PCR y secuenciación.

Reacciones de ligación y transformaciones

En todos los casos, las reacciones de ligación entre el plásmido y el fragmento a clonar, se hacen entre 10 y 16°C durante toda la noche. Se utiliza 50 ng de plásmido, el triple en relación molar de fragmento, ATP 1mM, y buffer de ligación 1X en un volumen final de 10 μ l (10 mM Tris-acetato, 10 mM acetato de magnesio, 50 mM acetato de potasio). Para la transformación de las distintas cepas de *E. coli* se agrega a la mezcla anterior 50 μ l de células competentes y se incuban 20 minutos en hielo. Luego se colocan 90 segundos a 42°C, 2 minutos en hielo, y finalmente se crecen a 37°C con agitación en 500 μ l de LB durante 1 hora. Se plaquea en LB-agar con 50 μ g/ml de ampicilina, y cuando es necesario se agrega X-gal e IPTG en una concentración final de 40 μ g/ml.

Las distintas cepas de *E. coli* competentes se preparan de la siguiente forma:

- se inocula una colonia aislada de una placa fresca en 50 ml de LB con los antibióticos apropiados al tipo de célula. Se incuba toda la noche a 37°C.
- Se inoculan 200 ml de LB con 4 ml del cultivo del día anterior conteniendo 4 ml de cloruro de magnesio 1M y se crecen a 37°C con agitación hasta una D.O.= 0.4.
- Las células se centrifugan 10 minutos a 1380xg a 4°C y se resuspende el precipitado en 60 ml de solución Tfb1.
- Se deja 2'30'' en hielo y se centrifuga en las mismas condiciones
- El precipitado se resuspende en 6 ml de Tfb2. Se hacen alícuotas de 200 μ l, se congelan rápidamente en N₂ líquido y se guardan a -80°C.

Solución Tfb1: 30 mM KOAc, 50mM MnCl₂, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 15 % (w/v) glicerol, se ajusta el pH con HOAc hasta pH 5.8.

Solución Tfb2: 10 mM Mops pH 7.0, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15 % (w/v) glicerol

Ambas soluciones se filtran (poro 0.2 μ) y se guardan a -20°C .

La cepa de *S. typhimurium* SL5338 competente se prepara de la siguiente forma:

- se inocula una colonia aislada de una placa fresca en 3 ml de LB y se incuba toda la noche a 37°C .
- se inocula 25 ml de LB con 250 μl del precultivo del día anterior y se crece a 37°C con agitación hasta una D.O. = 0.4 -0.5.
- El cultivo es enfriado durante 20' y se centrifuga 1380xg durante 15' a 4°C .
- El precipitado se resuspende en 11 ml de cloruro de magnesio 0.1 M.
- Se centrifuga en las mismas condiciones y el precipitado se resuspende en 1.1 ml de cloruro de calcio 0.1M
- Se hace un lavado adicional con cloruro de calcio y se agrega 10 μl de TES (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl) cada 200 μl de solución de cloruro de calcio. Se incuba 30' en hielo y se congela rápidamente alícuotas de 100 μl a -80°C .

6. Titulación y transducción con fago P22

Para titular el fago P22 se funde top agarosa y se mantiene en un baño a 45°C . Se mezclan 4 ml de top agarosa y 0.1 ml de bacterias SL5338 (provenientes de precultivo fresco), y se vuelcan sobre una placa de LB sin antibióticos. Se hacen diluciones del bacteriófago P22 hasta 10^{-6} en PBS1X+ LB (1/10). Se divide la placa en 6 secciones, se siembra 1 μl de las diferentes diluciones en cada sección y se incuba toda la noche a 37°C . Se cuenta el número de unidades formadoras de placas de lisis (ufp) en la última dilución que se observan.

Para la transducción con fagos, primero se hacen las preparaciones de fagos recombinantes y luego se transduce con estos fagos. Todas las cepas atenuadas vacunales de *Salmonella* recombinantes se obtuvieron mediante este método.

Se inocula 3 ml de LB con un ansa de un precultivo fresco de la bacteria recombinante dadora (SL5338-pTECH₂/EgFABP2 y SL5338-pTECH₂/EgTrp), con un ansa de fago P22 (1 μl de stock 7×10^9 ufp/ml) y con los antibióticos necesarios para seleccionar la bacteria recombinante. Se incuba toda la noche a 37°C con agitación. Se agrega 1 ml de cloroformo, se mezcla bien y se centrifuga a 1380xg durante 5'. El sobrenadante conteniendo los fagos recombinantes se guarda con cloroformo en vidrio a 4°C y se titula.

Se inocula 3 ml de LB con la bacteria receptora (C5aroD, SL3261, Se795aroA, BRD726, C5htrA, LVR01) y se incuba toda la noche a 37°C con agitación. Se centrifuga brevemente 1ml del precultivo y el precipitado se resuspende en 0.1ml de LB. Se agrega 1 μl de fago recombinante obtenido infectando la cepa dadora y se incuba a temperatura ambiente durante media hora. Se agrega 1 ml de LB precalentado a 37°C y se incuba media hora a 37°C . Luego se centrifuga brevemente, se resuspende en 0.1 ml de LB y se plaquea en LB-agar con antibiótico. Se selecciona una o más colonias y se crecen por lo menos dos veces en medio selectivo antes de hacer un precultivo durante toda la noche para corroborar la presencia de plásmido o la expresión de proteínas.

Se realizan dos controles, plaqueando el fago recombinante y plaqueando las bacterias receptoras, en placas de LB-ampicilina. Se espera no ver crecimiento.

7. Infección viral y transfección de células eucariotas

La infección viral se lleva a cabo en frascos T25 conteniendo aproximadamente 2×10^6 células QT35. Se infecta con 0.05 ufp/célula del virus MVA tipo salvaje stock (1.03×10^8 ufp/ml). Se diluye la cantidad apropiada de virus en 1.5 ml de GMEMc/2% SFB, se agrega a la monocapa de células y se incuba a 37°C por 1 hora. La transfección de las células con el plásmido pSC11 recombinante se realiza mediante dos métodos, en uno se forma un precipitado de fosfato de calcio y ADN, y en el otro se utiliza el reactivo FuGENE6 (Roche). En el primer caso se coloca en un tubo 5 µg de ADN plasmídico recombinante, 15 µg de ADN de esperma de salmón, 450 µl de HBSS 2X (2xHEPES-*buffered saline solution*), 30 µl de CaCl_2 3M y agua hasta 900 µl. Se deja 30 minutos a temperatura ambiente para permitir la precipitación del ADN. Se remueve el inóculo viral, se agrega el precipitado y se incuba 30 minutos a temperatura ambiente. Se agrega 5 ml de GMEMc/2% SFB y se incuba 3 horas en estufa a 37°C. Se retira el medio, se agrega 5 ml de medio fresco y se incuba en estufa durante 2 o 3 días.

En el segundo método, se mezclan en un tubo 88 µl de GMEMc sin SFB, 12 µl de FuGENE6 y 4 µg de ADN plasmídico recombinante (6 µl FuGENE: 2 µg de ADN) y se deja 15-45 minutos a temperatura ambiente. Se quita el inóculo viral y se lava la monocapa con medio sin SFB. Se agrega 2.5 ml de GMEMc sin SFB y la mezcla del tubo, se incuba 4 hs a 37°C y se agrega 2.5 ml de GMEMc/4% SFB. Se incuba 2-3 días en estufa esperando que ocurra recombinación homóloga entre el plásmido y el genoma viral a nivel del gen TK.

Luego de este período si se observa un buen efecto citopático, se rastrillan las células y se centrifugan 10 minutos a 1800xg a 4°C. El precipitado se resuspende en 1 ml de GMEMc/2% SFB.

8. Rastreo y selección de virus recombinantes

Las células infectadas y transfectadas se lisan mediante 3 ciclos de congelado y descongelado a -80°C y posterior sonicación de tres ciclos de 30 segundos a 100% de amplitud. Luego se realiza el primer plaqueo de selección y rastreo en células QT35 con X-gal y cubierta de agarosa. Se diluye el lisado 1/500, 1/1000, y 1/5000 en GMEMc/2% SFB y se infecta una placa de 6 pocillos con cada dilución por duplicado. Se coloca 1ml por pocillo y se incuba una hora a 37°C. Se retira el inóculo y se agrega 2ml por pocillo de GMEMc/2% SFB/1% de agarosa de bajo punto de fusión (BPF). La agarosa de BPF se funde y se mantiene en un baño de agua a 45°C. Se deja enfriar a temperatura ambiente y se incuba en estufa durante 1 hora. Luego se hace la segunda cubierta de agarosa conteniendo X-gal, agregando a cada pocillo 2ml de GMEMc/2% SFB/1% de agarosa de BPF/17 µl de X-gal 40 mg/ml. Se incuba 1 a 2 días en estufa, las placas virales azules (virus LacZ^+) se pican con pipeta pasteur y se disuelven en 1ml de GMEMc/2% SFB. Las células se lisan como se indicó previamente, y se realiza el segundo plaqueo en placas de 6 pocillos con células BrdUBHK, seleccionándose las placas virales LacZ^+ y TK⁻. Se sigue el mismo procedimiento infectando con 1 ml de una dilución del lisado 1/5 en GMEMc/2% SFB por pocillo y sin duplicado y se agrega 20 µl de 5-bromo-deoxiuridina (BrdU) 2.5 mg/ml por pocillo en la primera cubierta de agarosa. Se pican las placas virales azules y se realiza un

tercer y último plaqueo de selección en células QT35 (placas de 6 pocillos). La infección es igual que en el segundo plaqueo pero no se agrega BrdU. Se pican las placas virales azules en 1 ml de medio.

De esta manera se seleccionan los virus MVA recombinantes, asegurándose la pureza y evitándose la contaminación con el virus salvaje. Luego del tercer plaqueo se verifica la presencia del gen de interés mediante PCR a partir de ADN viral extraído de la infección de células QT35 (frasco de cultivo T25). También se confirma la expresión de la proteína recombinante mediante *Western Blot* de extractos proteicos preparados luego de 24 hs de infección con 10 ufp/célula (placas de 6 pocillos).

9. Producción y titulación de virus recombinantes

Se lisan las células del tercer plaqueo como se indica anteriormente y se infecta un frasco T25 con células QT35 con 0.5 ml del lisado/1ml de GMEMc/2% SFB. Se deja 1 hora en estufa, se quita el inóculo y se agrega medio, se deja 2-3 días en estufa. Cuando se observa un buen efecto citopático las células son rastrilladas, centrifugadas y el precipitado se resuspende en 1ml de medio. Las células son lisadas y se titula la concentración viral.

Las titulaciones virales se llevan a cabo en placas de 6 pocillos con células QT35. Se hacen diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} del lisado en GMEMc/2% SFB, por duplicado. Se retira el medio de cultivo, se pone 0.8 ml de dilución por pocillo y se incuba 1 hora en estufa. Se retira el inóculo y se agrega 2.5 ml por pocillo de GMEMc/2% SFB/10% CMC (16g de carboximetilcelulosa en 500 ml de PBS) precalentado a 37°C. Se incuba 2 días en estufa a 37°C. Luego de este período se lava la monocapa de células con PBS 1X, y se fija por 10-15 minutos con 0.5% glutaraldehído en PBS (v/v) (1ml por pocillo). Se lava dos veces con PBS y se cubre con 0.01% deoxicolato de sodio/0.02% NP40 (Nonidet P-40)/5mM ferricianuro/ferrocianuro de potasio/1mg/ml X-gal en PBS (1ml por pocillo). Se incuba a 37°C hasta desarrollo de color (de 10 minutos a 2 días), se lava con PBS y se cuentan las placas virales azules bajo lupa. Se hace un promedio de los duplicados y se calcula el título viral teniendo en cuenta la dilución y el volumen del inóculo ($\text{ufp/ml} = (\text{N}^\circ \text{ de placas azules} \times \text{dilución}) / 0.8\text{ml}$).

Luego se infecta un frasco T75 con 0.05 ufp/ml (5×10^5 ufp por frasco), se utiliza un volumen de inóculo de 4.5 ml para la infección; después de 1 h a 37°C se agrega 10.5 ml de medio y se incuba 2-3 días en estufa. Cuando se observa un buen efecto citopático se repite el procedimiento previamente citado y se titula la concentración viral del mismo modo pero utilizando diluciones de 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} .

Se continúa con la infección de un frasco T175 con 0.05 ufp/ml (2.5×10^6 ufp por frasco). Se usa un volumen de inóculo de 10.5 ml para la infección y luego de 1 hora en estufa se agrega 19.5 ml de medio. Se procede de la misma forma que para los otros frascos, se titula y se prosigue infectando 3 frascos T175 de la misma manera. El precipitado de células de cada frasco se resuspende en 1ml de medio y se juntan los tres mililitros para la titulación.

10. Purificación viral a gran escala mediante gradientes de sacarosa

Se infectan de 10 a 20 frascos T175 con 0.05-0.1 ufp/célula (2.5×10^6 ufp por frasco) y se incuba de 2 a 3 días en estufa. Cuando se observa un buen efecto citopático se rastrillan los

frascos y se resuspende el precipitado de células en 14 ml de Tris-HCl 10mM pH 9.0 frío. Las muestras se mantienen siempre en hielo. Las células se homogeneizan con 200 golpes de émbolo con un homogeneizador de vidrio Dounce conectado a un taladro eléctrico a velocidad mínima. Previamente se trata el homogeneizador con etanol 70% y se seca en la campana. Se chequea la lisis celular por microscopio. Luego se centrifuga 5 minutos a 300 g a 4°C para bajar los núcleos. Se separa el sobrenadante suavemente con pipeta. El precipitado se resuspende en 3 ml de Tris-HCl 10mM pH 9.0 frío, se centrifuga en las mismas condiciones y se junta el sobrenadante con el anterior. Se sonica el lisado a máxima potencia durante tres minutos, tres veces.

El lisado sonicado se coloca suavemente sobre un colchón de 17 ml de sacarosa 36% en Tris-HCl 10 mM pH 9.0, en tubos de centrifuga Beckman SW-27 estériles. Se centrifuga 80 minutos a 32900 g a 4°C. Se resuspende el precipitado viral en 1 ml de Tris-HCl 1mM pH 9.0 y se sonica durante 1 minuto para romper los agregados virales. El día anterior se preparan dos tubos de centrifuga con un gradiente continuo de sacarosa de 24-40% en Tris-HCl 1 mM pH 9.0. Se coloca lentamente 6.5 ml de la solución 24%, 28%, 32%, 36%, y 40%; se deja toda la noche en la heladera. Se coloca el ml de solución viral sobre el gradiente de sacarosa y se centrifuga 50' a 26000 g, a 4°C. Se observa una capa viral lechosa en el tercio inferior del tubo. Se aspira la sacarosa superior y se descarta, con cuidado se aspira la capa viral (10 ml aproximadamente). Se aspira la sacarosa remanente del tubo y se resuspende el precipitado viral en 1ml de Tris-HCl 1mM pH 9.0. Se sonica y se repiten los pasos anteriores colocando el ml de virus sobre el gradiente y centrifugando. Se junta la capa viral con la anterior, se agrega 2 volúmenes de Tris-HCl 1mM pH 9.0 y se centrifuga 60' a 32900 g, a 4°C. Se descarta el sobrenadante por inversión. Se resuspende el precipitado viral en 1ml de Tris-HCl 1mM pH 9.0, se sonica y divide en alícuotas de 250 µl. Finalmente la solución viral se titula como se explicó anteriormente, utilizando diluciones 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} .

11. RT-PCR y PCR

Para las reacciones de retrotranscripción (RT) se utiliza la transcriptasa inversa SuperScript II RNase H- (Invitrogen). Se mezcla 500 ng de cebador oligodT, o 250 ng de cebadores al azar, o 2 pmoles de cebador específico con 4.6 µg de ARN total, 10 mM de dNTPs y agua miliQ hasta completar 12 µl. La mezcla se incuba a 65° C durante 5' y se coloca en hielo. Luego se agrega 4 µl del amortiguador First-Strand 5X (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 2 µl de DTT 0.1 M y 1 µl del inhibidor de ribonucleasa RNaseOUT (40 U/µl, Invitrogen). Se mezcla e incuba a 42° C durante 2', se agrega 200 U de la transcriptasa inversa y se incuba a 42° C durante 50'. Si se utiliza cebadores al azar se incuba a 25° C durante 10'. Se inactiva la reacción mediante calentamiento a 70° C por 15'.

Mediante una modificación del método SMARTTM (Clontech) (figura 5), se sintetiza ADNc doble hebra específico, enriquecido en extremos 3' del gen *EgTrp* de *E. granulosus*. Se hace una primera mezcla con 1 µg de ARN total, 10 pmoles de cebador CDS (cebador con cola poliT y secuencia complementaria al cebador SMARTIII), 10 pmoles de cebador LAVTf (en exón 5 directo de tropomiosina) y agua hasta 4 µl. Se incuba a 70° C durante 2

minutos. En paralelo se prepara una segunda mezcla con 2 µl del amortiguado First-Stand 5X, 1 µl de DTT 20 mM, 1 µl de dNTPs 10 mM, 200 U de transcriptasa inversa y 1 µl del inhibidor de ribonucleasa RNaseOUT (40 U/µl). Se agrega la segunda mezcla a la primera y se incuba en termociclador 37° a 42° C, 35' a 50° C y 70' a 42° C. Se calienta 7' a 70° C y se congela.

También se hace esta técnica con un cebador del exón 8 reverso y con el cebador SMARTII (se une a los extremos 5' de los ARNm mediante 3 guaninas). Así se obtiene ADNc enriquecido en extremos 5' de *EgTrp* de *E. granulosus*.

Cebador CDS: 5' - AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACT₍₃₀₎N₁N - 3'

Cebador SMART II: 5' - AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG - 3'

Cebador SMART III: 5' - AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT - 3'

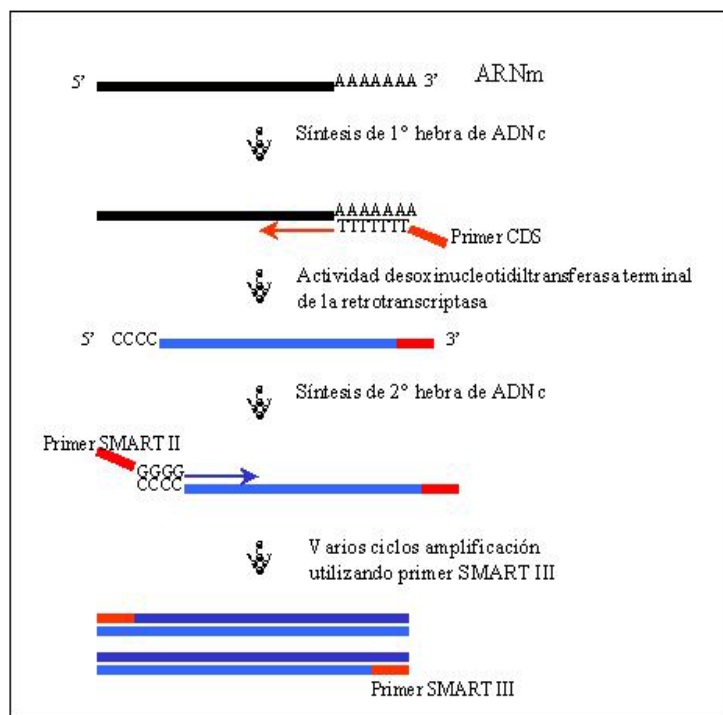


Figura 5. Síntesis de ADNc mediante el método SMART

- 1) Síntesis de la primer hebra de ADNc mediante retrotranscriptasa.
- 2) La retrotranscriptasa presenta actividad desoxinucleotidiltransferasa terminal, que bajo las condiciones de reacción añade preferentemente citidinas.
- 3) Síntesis de la segunda hebra de ADNc utilizando una polimerasa termoestable con actividad exonucleotítica 3'-5'.
- 4) Amplificación del ADNc doble cadena utilizando el cebador SMART III, de secuencia idéntica a la secuencia 5' de los cebadores CDS y SMART II.

Se utiliza 1 µl o 1 µl de una dilución 1/5 del ADNc generado para las reacciones de PCR.

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se realizan utilizando un termociclador Perkin-Elmer, en un volumen de 25 µl usando 10 pmoles de cada cebador, dNTPs 0.8 mM, amortiguador Amersham o Invitrogen 10 X (100 mM Tris-HCl pH 9.0, 500 mM KCl, 1 % Tritón X-100), 1.5 mM MgCl₂, 1.25 U de Taq ADN polimerasa (Amersham o Invitrogen) y agua miliQ.

Para amplificar fragmentos largos se emplea la ADN polimerasa AccuTaq LA (Sigma). En este caso se utiliza amortiguador AccuTaq 10X (500 mM Tris-HCl pH 9.3, 150 mM de sulfato de amonio, 25 mM de MgCl₂, 1 % Tween 20), 2% de DMSO, 10 pmoles de cada cebador, dNTPs 0.8 mM, 1.25 U de AccuTaq ADN polimerasa y agua miliQ hasta 25 µl. La temperatura de polimerización es de 68° C.

La cantidad y tipo de molde se especifica en cada caso.

En todas las reacciones se realiza 35 ciclos de amplificación, que consisten en las siguientes etapas: 94° C por 45'', 54-58° C por 45'' según la temperatura de hibridización de los cebadores, y 72° C por 1' según la longitud del fragmento a amplificar. Previo a esta serie de ciclos hay una etapa inicial de desnaturalización a 94° C por 5' y posterior a la misma se hace una etapa final de extensión a 72° C por 10'.

En todos los casos se realiza un control negativo de la reacción de PCR donde no se agrega molde de ADN.

En reiteradas oportunidades se siembran varios carriles del gel de electroforesis con la misma reacción de amplificación, para obtener suficiente producto para secuenciar.

Se controla mediante PCR que el ADNc utilizado no contenga contaminación de ADN genómico (ADNg) mediante amplificación de EgFABP1 (proteína transportadora de ácidos grasos 1 de *E. granulosus*) usando como molde ADNc. Si existiera contaminación se amplificaría una banda de 470 pb que contiene al intrón de este gen, sino es así solamente se observa una banda de 400 pb correspondiente a la secuencia codificante de EgFABP1.

Cebadores

Cebadores para la tropomiosina:

Df5 nt directo (exón 1 directo): 5' - CGC GGA TCC ATG GAT TCC ATC AAA AAG - 3'
Tm= 76°C

Df5 ct reverso (exón 8 reverso): 5' - CCC AAG CTT TCA GAA GGA AGT GAG - 3'
Tm= 72°C

KEKArevDf5 (exón 2 reverso): 5' - CTT TGG CCT TCT CCT TGA G - 3' Tm= 58°C

QTEVDf5rev (exón 2 reverso): 5' - CGG TGT CTA CTT CAG TCT G - 3' Tm= 58°C

NDWDf5 (exón 2 directo): 5' - GAT GAA TGA CTG GCT CTC - 3' Tm= 54°C

ETEKrev (exón 2 reverso): 5' - CGC ACG CTT CTC GGT TTC – 3' Tm= 58°C

ESLQDf5 (exón 2 directo): 5' - GAG TCT CTC CAG GAA GCG –3' Tm= 58°C

EQSSrev (exón 3 reverso): 5' - GAC GGC CAC TAG ACT GTT C – 3' Tm= 60°C

AMTRf (exón 3 directo): 5' - GCT ATG ACC CGT CGC ATT C – 3' Tm= 60°C

90Rev-Df5 (exón 4 reverso): 5' - TAG TTG GGC CAT TCG TTC ATC – 3' Tm= 62°C

ETRSf (exón 4 directo): 5' - GAG ACC AGG TCT ATT TCT GAC G – 3' Tm= 66°C

201Rev-Df5 (exón 5 reverso): 5' - GAC TCC GCT CGC TCC AAG TCG – 3' Tm= 70°C

LAVTf (exón 5 directo): 5' - CTT GGC AGT GAC CGA GGT C – 3' Tm= 62°C

QESLrev (exón 6A reverso): 5' - CGC GCT GAA GAG ACT CTT G – 3' Tm= 60°C

EVSEf (exón 6A directo): 5' - CGA AGT CTC CGA GCA AGA G – 3' Tm= 60°C

RQVSrev (exón 7 reverso): 5' - TGG AGC TTG GAC ACT TGG C – 3' Tm= 60°C

QRAADf5 (exón 7 directo): 5' - CAG CGT GCT GCC GAA – 3' Tm= 50°C

CGADf5sec (intrón 7-8 directo): 5' - GTG GTG CCG CTA GGC – 3' Tm= 52°C

Df5int6-7A (intrón 5-6 directo): 5' - CTT GGA GGA TCG GTT G – 3' Tm= 50°C

Df5ex7Brev (exón 6B reverso): 5' - GGC ATT GTT ACT TCT TG –3' Tm= 48°C

Cebadores para secuenciar el plásmido pQE11:

pQ5': 5'- CGG ATA ACA ATT TCA CAC AG – 3' Tm= 56°C

pQ3': 5'- GTT CTG AGG TCA TTA CTG G – 3' Tm= 56°C

Cebadores para el clonado de EgFABP2 y EgTrp en pTECH₂:

Fabp2sense (FABP2 directo): 5' - CGC **GGA TCC** ATG GAG CCA TTC ATC GG - 3'
Tm= 80°C

Fabp2anti2 (FABP2 reverso): 5' - CCC **AAG CTT** CTT ACA CCT CCC TC – 3'
Tm= 75°C

SenseDf5 (Trp directo): 5' -CGC **GGA TCC** GAA ACA TCT ACT AAG CTT GAC G -3'
Tm= 80°C

AntisenDf5(Trp reverso):5´-CCC **AAG CTT** TCA GAA GGA AGT GAG CTC CGC G-3´
Tm= 83°C

Cebadores para secuenciar pTECH₂:

SeqF (directo): 5´ - GTG GTT GAT GGC AAT GAG 3´ - Tm= 54°C

SeqR (reverso): 5´ - ATA CCA AAC GAC GAG CGT G 3´ - Tm= 58°C

Cebadores para clonar EgFABP1, EgFABP2 y EgTrp en pSC11:

Fabp2sense (FABP2 directo): 5´ - CGC **GGA TCC** ATG GAG CCA TTC ATC GG - 3´
Tm= 80°C

Df2anti3 (FABP2 reverso): 5´ - C CCG **GAA TTC** TCA CTT ACA CCT CCC TC - 3´
Tm= 79°C

Df5sense2 (Trp directo):
5´ - GG GAA TTC **CAT ATG** ATG GAA ACA TCT ACT AAG CTT - 3´ Tm= 77°C

AntisenDf5(Trp reverso):5´-CCC **AAG CTT** TCA GAA GGA AGT GAG CTC CGC G-3´
Tm= 83°C

Df1sense2 (FABP1 directo):
5´ - CGG **GAA TTC** ATG GAG GCA TTC CTT GGT ACC TGG - 3´ Tm= 83°C

Df1anti3 5´ - C **CAT ATG** TCA TTA CGC CAC CTT TGA GTA G - 3´ Tm= 77°C

Cebador p7.5 (directo) para secuenciar pSC11:
5´ - GCA CGG TAA GGA AGT AGA TCA TAA AGA ACA GTG AC - 3´ Tm= 80°C

Cuando corresponde se señala con negrita los sitios de restricción y se subraya el codón de inicio y el codón de terminación.

12. Secuenciado y análisis de secuencia

Todas las secuencias de nucleótidos son obtenidas por secuenciación automática a partir de plásmido o producto de PCR purificado, y cebadores específicos para cada caso. Las secuenciaciones son realizadas en el servicio de secuenciación CTAG de Facultad de Ciencias de Montevideo-Uruguay (ABI-Prism 377, Applied Biosystem).

Las secuencias nucleotídicas se visualizan mediante el programa Chromas versión 1.43 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>), y se corrigen manualmente cuando es necesario. Los alineamientos preliminares en busca de homologías en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), se realizaron mediante el programa Blast en sus múltiples

versiones (Altschul y cols., 1997: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) utilizando los parámetros por defecto. Las secuencias de ADN y las traducciones conceptuales son analizadas en el programa GeneRunner ver. 3.05 (Hastings Software Inc.). Mediante el mismo se busca motivos conservados en el ADN (secuencias consenso de poliadenilación y relativas a la presencia de intrones, sitios de restricción, etc). Se analizan los sitios de corte y empalme putativos con alta probabilidad (Reese y cols., http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html). Los alineamientos posteriores, ya sean nucleotídicos o de aminoácidos, se realizan con el programa ClustalX (Thompson y cols., 1994) utilizando la matriz de similitud Gonnet Pam250 y se revisaron y/o corrigieron en forma manual para maximizar regiones contiguas de máxima similitud de secuencia. Los alineamientos generados son abiertos en el programa GeneDoc (Nicholas y Nicholas, 1997) para generar las figuras correspondientes. La estructura secundaria se predice mediante la herramienta Gor4 (Garnier y cols., 1996).

13. Hibridización sobre amplificaciones de ADN

Primeramente se realiza una electroforesis en gel de agarosa 2% de productos de PCR. Se saca una foto del gel bajo luz UV y se recorta el marcador de tamaño. El gel es agitado lentamente durante 20' en solución de desnaturalización (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl). Luego se lava rápidamente en agua desionizada y se neutraliza durante 20' con solución de neutralización (0.5 M Tris-HCl pH 7.5, 1.5 M NaCl). El gel y la membrana de nylon Hybond-N+ del mismo tamaño del gel son incubados en SSC 10X durante 5'. Luego se realiza la transferencia en seco durante toda la noche. Se marcan los pocillos en la membrana y la misma se fija durante 2 hs a 80°C. La membrana se hibrida durante 2 horas a 42°C en solución de hibridización (50% formamida, 0.8 M NaCl, 50 mM amortiguador fosfato pH 7.0, 5 mM EDTA, 0.1 % SDS, 10 X Denhart, 0.5 ml de ADN de esperma de Salmón 10 mg/ml, 2.5 g de sulfato de dextrano, agua hasta 50 ml). La sonda de ADN se marca por PCR, se amplifica la secuencia codificante de *EgTrp* clonada en el plásmido pGEM-T-Easy usando los cebadores Df5 nt directo y Df5 ct directo y 58°C como temperatura de hibridización de los cebadores. La reacción se lleva a cabo en 50 µl totales usando 0.01 mM de dATP, dGTP, dTTP, y 25 µCi del isótopo ³²P-dCTP (Amersham) con 3000 Ci/mmol de actividad específica. Se realizan 25 ciclos de amplificación. El producto de PCR es purificado mediante gel filtración con Sephadex G-50. Se desnaturaliza la sonda por calor y se agrega a la solución de hibridización utilizada para prehibridar; la hibridización transcurre durante toda la noche a 42° C. Se realizan seis lavados consecutivos de 15' a 65° C: 2 con SSC 2X + SDS 0.1%, 1 con SSC 1X + SDS 0.1%, 1 con SSC 0.5X + SDS 0.1%, y 2 con SSC 0.2 X + SDS 0.1%. La membrana es expuesta con placas de autoradiografía Kodak BioMax MS (Kodak), durante 24 hs a - 70° C; y luego es revelada usando soluciones comerciales CENIT.

14. Purificación de ADN

Purificación de ADN de plásmidos

Los plásmidos se purificaron por los métodos clásicos de preparación mínima alcalina o de ebullición de acuerdo a Sambrook y cols., 1989, o por el kit de purificación de Qiagen (QIAprep Spin Miniprep Kit).

Purificación de ADN genómico

Para la purificación de ADNg de protoesclóides se agrega 900 µl de solución TEN8 (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM EDTA pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.5% SDS, 0.1mg/ml proteinasa K) cada 100 µl de material. Se homogeneiza en homogeneizador de vidrio con 30 a 50 golpes de émbolo y se incuba a 50° C durante 1h y 15'. Se agrega 200 µg/ml de ARNasa y se incuba 30' a 55°C. Posteriormente se realiza una extracción con fenol: cloroformo:alcohol isoamílico (25: 24: 1) y dos extracciones con cloroformo: alcohol isoamílico (24: 1). La fase acuosa se precipita con 2 volúmenes de etanol absoluto y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 5.2. El precipitado de ADN se lava con etanol 70 % y se resuspende en agua miliQ mediante calentamiento a 68° C durante 10'. Por último, el ADNg es dosificado a 260nm, se mide la relación Abs260/280 y se visualiza mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8 % teñido con bromuro de etidio.

Purificación de ADN viral

Se lleva a cabo la purificación de ADN viral a partir de cultivos celulares infectados con los MVA recombinantes, utilizando el kit High Pure Viral Nucleic Acid Kit de Roche. Se utiliza para la purificación 50 µl de células resuspendidas en 1 ml de medio, producto de la infección en frascos T25. Luego se realiza PCR para confirmar la presencia del gen heterólogo en el genoma del virus recombinante. Se utiliza como controles negativos extracciones a partir de células no infectadas e infectadas con MVA-pSC11.

Purificación de fragmentos de ADN

Los fragmentos de ADN productos de PCR o digestiones se purifican luego de someterlos a electroforesis en geles de agarosa, mediante el kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit de Amersham Biosciences.

15. Purificación de ARN

El ARN total de protoesclóides se extrae utilizando el reactivo Tri Reagent de Sigma. Se agrega este reactivo de forma que el volumen del material fresco no exceda el 10 % del volumen del Tri Reagent. La mezcla se homogeneiza con 50 golpes en un homogeneizador con émbolo de teflón. Luego se incuba la muestra a temperatura ambiente y se agrega 0.2 ml de cloroformo por cada mililitro de muestra. Se centrifuga a 12000 g durante 15'a 4° C y se transfiere la fase acuosa a otro tubo donde se agrega 0.5 ml de isopropanol cada 1ml de reactivo utilizado. Se deja precipitando el ARN toda la noche a 4° C, se centrifuga a 12000 g durante 10'a 4° C. El precipitado se lava con etanol 75 %, se seca y se resuspende en agua miliQ fresca en recipiente esteril. Se calienta 10' a 60° C para ayudar a la disolución. El ARN es dosificado mediante espectrofotometría a 260 nm, se mide la relación de absorbancia 260/280 y se observa su integridad mediante electroforesis en agarosa 1%.

16. Producción y purificación de proteínas recombinantes

La proteína EgFABP1 se produce y purifica a partir de las bacterias recombinantes BL21-pET5aEgFABP1, de acuerdo a Alvite y cols., 2001.

La proteína recombinante EgFABP2 es una proteína insoluble por lo tanto su purificación sufre ciertas modificaciones con respecto a la metodología de purificación de su homóloga EgFABP1. Luego de la inducción de las bacterias BL21-pET5aEgFABP2 con IPTG 0.5 mM, durante 2h 30' a 37° C; las células se centrifugan a 3000 g durante 20' y el precipitado celular se resuspende en el amortiguador de extracción (Tris-HCl 50mM pH8.0, EDTA 1 mM, DTT 1mM). Las células son lisadas mediante 3 ciclos de congelado y descongelado y 6 ciclos de sonicación de 20'' a 1.5 A. Se centrifuga durante 30' a 27200 g, a 4° C y el precipitado se resuspende en amortiguador de extracción con Urea 8 M. Se agita 30' a 4° C y se centrifuga a 13300 g a 4° C durante 30'. El sobrenadante es dializado con por lo menos 100 volúmenes de Tris-HCl 50mM pH8.0 durante 1 o 2 días a 4° C. La muestra se concentra por ultrafiltración en una celda de ultrafiltración (Corning) con membranas Millipore de límite de filtración de 10 kDa. Se realiza una gel filtración en Sephacryl S-100 HR (Sigma) (150 ml) en un FPLC (Pharmacia), con amortiguador Tris-HCl 50mM pH 8.0 como eluyente, con un flujo de 1 ml/min y colecta de 2 minutos por tubo. Luego se realiza un intercambio iónico con Source 15Q (Amersham Bioscience), en un FPLC (Pharmacia), utilizando un gradiente continuo entre los amortiguadores Tris-HCl 50mM pH 8.0, 10 % de etanol; y Tris-HCl 50mM pH 8.0, 10 % de etanol, 2 M NaCl. Luego de electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15 % teñido con Azul de Coomassie, se identifican y colectan las fracciones donde la proteína está pura, posteriormente se dializa con PBS 1X y se dosifica mediante el método del BCA (ácido bicinconínico).

Para la producción y purificación de EgTrp a partir de *E. coli* M15(pREP4)-pQE11EgTrp se siguió el protocolo utilizado por Esteves, 1996.

De esta manera se produjeron 5.2 mg de EgFABP2, de EgTrp y de EgFABP1, que fueron enviados a Lyon (Francia) para la inoculación de perros en Marruecos y Tunez y determinar la respuesta inmune generada.

17. Sueros

Se utiliza para reconocer a EgFABP1 y EgFABP2 un suero producido en conejo contra GST-EgFABP1, en nuestro laboratorio de la Sección Bioquímica de la Facultad de Ciencias de Montevideo (Portillo, 1998). Este suero reconoce ambas proteínas utilizando una dilución 1/1000 en *Western Blot*.

El suero anti-EgTrp es preparado en Bélgica por la empresa Eurogenetec a partir de 1.5 mg de proteína recombinante pura. Se inocularon 2 conejos con 0.75 mg de proteína en dos dosis, los mismos fueron sangrados al mes, a los dos meses y a los tres meses de la inoculación. Todas las muestras de suero presentaron un fuerte reconocimiento de la proteína recombinante mediante *Western Blot*, usando una dilución 1/1000.

18. Ensayos de estabilidad del plásmido *in vitro* e *in vivo*

Ensayos de estabilidad *in vitro*

Se hacen precultivos en LB sin ampicilina de las cepas atenuadas vacunales de *Salmonella* recombinantes: Se795aroA-pTECH2/EgFABP2, Se795aroA-pTECH2/EgTrp, C5aroD-pTECH2/EgFABP2, C5aroD-pTECH2/EgTrp, BRD726-pTECH2/EgFABP2, BRD726-pTECH2/EgTrp, C5htrA-pTECH2/EgFABP2, C5htrA-pTECH2/EgTrp, SL3261-pTECH2/EgFABP2, SL3261-pTECH2/EgTrp, LVR01aroC-pTECH2/EgFABP2, LVR01aroC-pTECH2/EgTrp. Se plaquea por duplicado 50 µl de una dilución 10^{-6} del precultivo en placas de LB-agar con y sin ampicilina. Las placas son incubadas en estufa a 37°C y al otro día se cuenta el número de colonias que crecieron en cada placa. Se promedian los duplicados y se calcula el porcentaje de bacterias que retienen el plásmido para cada cepa, según el siguiente cálculo: $\% = \frac{\text{col. LB-agar ampi}}{\text{col. LB-agar}} \times 100$

En los casos en donde este porcentaje es menor al 80%, se realizan 6 pasajes de la cepa en LB líquido con ampicilina y se repite el ensayo de estabilidad de la misma manera con el correspondiente cálculo del porcentaje.

Ensayos de estabilidad *in vivo*

Para estos ensayos se seleccionan las cepas de *Salmonella* recombinantes que presentan una alta estabilidad *in vitro*: Se795aroA-pTECH2/EgFABP2, Se795aroA-pTECH2/EgTrp, SL3261-pTECH2/EgFABP2, SL3261-pTECH2/EgTrp, C5aroD-pTECH2/EgFABP2, C5aroD-pTECH2/EgTrp, BRD726-pTECH2/EgTrp. Cada cepa es inoculada en 3 o 4 ratones por vía intravenosa, con 0.2 ml de una solución bacteriana stock en PBS 1X, de 5×10^5 ufc/ml. Previamente se realiza un precultivo donde se controla las horas de crecimiento y se determina el número de ufc/ml mediante plaqueo de 50 µl de una dilución 10^{-6} por duplicado. El inóculo se prepara a partir de un precultivo crecido durante las horas ya establecidas y es cuantificado mediante el plaqueo en placas de LB-agar-ampi de 50 µl de una dilución 1/1000 por duplicado. Luego de 10 días los ratones son sacrificados por dislocación cervical y se extirpan el hígado y el bazo. Cada órgano es homogeneizado en bolsas estériles con 10 ml de agua estéril y se realizan diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000. Se plaquea incorporado por duplicado 0.5 ml de la muestra sin diluir y de las 3 diluciones, en LB-agar con y sin ampicilina. Se cuentan las colonias y se calcula el porcentaje de estabilidad *in vivo*.

19. Protocolos de inmunización

Se hiperinmunizan 2 grupos de 3 ratones con las proteínas recombinantes EgFABP2 y EgTrp. Cada ratón se inyecta de forma subcutánea con 200 µl de una mezcla 1:1 de la proteína con adyuvante de Freund's completo, conteniendo 100 µg de proteína. A las 2 semanas se les inocula vía intravenosa un refuerzo con 10 µg de proteína. Dos semanas más tarde se extrae la sangre de forma intracardiaca, la misma se incuba 1h a 37° C y toda la

noche a 4° C, para la separación del suero que será utilizado como control positivo del ELISA.

Para el estudio de la respuesta inmune contra los antígenos de *E. granulosus* expresados por las *Salmonellas* recombinantes, se utilizaron 6 grupos de ratones, con 3 o 4 ratones por grupo y dos vías de inoculación:

- Grupo A) Se795aroA-pTECH2/EgFABP2 vía oral
- B) Se795aroA-pTECH2/EgTrp vía oral
- C) Se795aroA-pTECH2 vía oral
- D) Se795aroA-pTECH2/EgFABP2 vía intravenoso
- E) Se795aroA-pTECH2/EgTrp vía intravenoso
- F) Se795aroA-pTECH2 vía intravenoso

Para la preparación del inóculo se inoculan 2 ml de un precultivo fresco en 200 ml de LB con ampicilina. El cultivo es crecido durante toda la noche a 37°C, y suponiendo que se obtienen 1×10^9 ufc/ml, se diluye 5 µl en 5 ml de PBS, para inocular 200 µl (2×10^5 ufc) por vía intravenosa, por ratón. El resto del cultivo es centrifugado y el precipitado celular se resuspende en 400 µl de PBS. Se inocula 200 µl por vía oral, por ratón, conteniendo 5×10^{10} ufc aproximadamente. Se recuenta el inóculo mediante el plaqueo incorporado de 100 µl de la dilución 10^{-8} y 100 µl de la dilución 10^{-9} por duplicado con LB-agar con ampicilina.

A los 14 días los grupos con inoculación oral reciben una segunda dosis en las mismas condiciones que la primera. La inoculación oral es intragástrica y se realiza mediante una jeringa sin punta mientras que para la inoculación intravenosa se inyecta la vena lateral de la cola.

Los ratones se sangran del plexo ocular con capilar en el día 0, 13, 26, 37 y 49 post-inoculación. Los sueros se utilizan para el estudio de la respuesta humoral anti-tetC, anti-EgFABP2 y anti-EgTrp mediante ELISA.

Se realiza una segunda experiencia de inmunización con 4 grupos conteniendo 10 ratones cada uno y utilizando solamente la vía de inoculación oral:

- Grupo A) LVR01-pTECH2/EgTrp
- B) LVR01-pTECH2
- C) Se795aroA-pTECH2/EgTrp
- D) Se795aroA-pTECH2

Se prepara el inóculo a partir de un cultivo de 550 ml de la forma ya descrita, inoculándose 200 µl (5×10^{10} - 1×10^{11} ufc) por ratón, por vía intragástrica. Se realiza el recuento del inóculo en las condiciones ya citadas. A los 15 días se les aplica una segunda dosis igual a la primera. Los ratones son sangrados del plexo ocular a los 22, 29, y 44 días post-inoculación. Se separan los sueros y se guardan a -20° C. En el día 0 y 43 post-inoculación se toman 4 muestras de las heces de cada ratón en 1 ml de PBST-BSA 1%, 1mM PMSF y se mantienen toda la noche a 4° C. Las muestras son vortexeadas, centrifugadas 5' a 15093xg y el sobrenadante se guarda a -20° C para ser usados en ensayos de ELISA.

20. Ensayos de ELISA

Determinación de IgG específicas en sueros de ratones

Se monitorea la respuesta humoral de IgG anti-TetC, anti-EgFABP2 y anti-EgTrp, mediante ensayos de ELISA. Se pone a punto la técnica sensibilizando las placas con distintas cantidades de las proteínas EgFABP2 y EgTrp, y probando los amortiguadores carbonato 0.1M pH 9.6, acetato 0.1 M pH 4.5, y PBS 1X pH 7.2, se utilizan los sueros anti-GSTegFABP1 y anti-EgTrp y los sueros hiperinmunizados.

Las placas de 96 pocillos se sensibilizan durante toda la noche a 4° C o 2 hs a 37° C, con 0.5 µg de la proteína recombinante EgFABP2, o EgTrp, diluida en amortiguador carbonato 0.1 M pH 9.6 por pocillo. La sensibilización con la proteína recombinante TetC (extremo C-terminal de la toxina del tétanos) se lleva a cabo durante toda la noche a temperatura ambiente, utilizándose 0.1 µg de TetC diluida en amortiguador carbonato 0.1 M pH 9.6 por pocillo.

Luego se bloquea con 100 µl por pocillo de PBST-1%BSA (PBS 1X, 0.05% Tween 20, 1% seroalbúmina bovina) durante 1 h a 37° C.

Se agregan los sueros diluidos 1/100 en PBST-0.1% BSA. Los sueros de animales hiperinmunizados son utilizados como control positivo en una dilución 1/100; se utilizan sueros no reactivos como control negativo en la misma dilución, y como blanco se usa PBST-0.1% BSA. Las placas se incuban a 37° C durante 90 minutos.

Para la puesta a punto, se utiliza anti-IgG de conejo producido en cabra conjugado a peroxidasa diluido 1/1000 en PBST-0.1% BSA, ó anti-IgG (anti- IgG-h+1conjugado a HRP, Bethyl) de ratón preparado en cabra en la misma dilución, según el caso.

Para el estudio de la respuesta humoral de ratones se utiliza el anticuerpo anti-IgG de ratón producido en cabra conjugado a peroxidasa diluido 1/1000 en PBST-0.1% BSA.

Se incuba 90' a 37° C; y se revela con OPD 0.4 mg/ml (o-fenilendiamina) en ácido cítrico 0.025 M y fosfato de sodio 0.05 M, durante 15' a 37° C. La reacción se detiene con ácido sulfúrico 3M y las placas son leídas a 490 nm en un lector de ELISA utilizando el programa "Revelation". Entre cada paso se hacen 3 lavados de 3' con PBST y todas las incubaciones se realizan en cámara húmeda.

Determinación de IgA específica y total en heces de ratones

La determinación de anticuerpos IgA específicos en la materia fecal de ratones se realiza siguiendo el mismo protocolo de ELISA, pero agregando los sobrenadantes de las muestras fecales diluidos 1/5 en PBST-BSA 1%. Se incuba a 4° C durante toda la noche con agitación y se agrega anticuerpo anti-IgA (específico para cadena α) de ratón conjugado a biotina (Pharmingen) diluido 1/1000 en PBST-BSA 1%.

Se incuba 1h 30' a 37° C y se agrega streptavidina conjugada a peroxidasa diluida 1/1000 en PBST-BSA 1%. Se incuba 45' a 37°C y se revela con OPD.

La determinación de anticuerpos IgA total en la materia fecal de ratones se lleva a cabo sensibilizando las placas con 0.1 µg de anticuerpo anti-IgA de ratón (Pharmingen), durante

toda la noche a 4° C. Luego se bloquea con 100 µl por pocillo de PBST-1% BSA, 30' a temperatura ambiente. Se agregan las muestras diluidas 1/5 y se utilizan estándares de IgA de ratón desde 1000 ng/ml hasta 3.9 ng/ml. Se incuba 1 h a temperatura ambiente y se agrega anticuerpo anti-IgA (específico para cadena α) de ratón conjugado a biotina diluido 1/1000. Se incuba 1h a temperatura ambiente y se agrega streptavidina conjugada a peroxidasa diluida 1/1000. Se incuba 30' a temperatura ambiente y se revela con OPD. Luego se normaliza la IgA específica con respecto a la IgA total de cada muestra ($IgA_{norm} = IgA_{esp}/IgA_{total} \times 1000$).

Determinación de IgG anti-LPS en sueros de ratones

Se realiza un ELISA para detectar IgG anti LPS de *S. typhimurium* sensibilizando la placa con 5 µg/ml de LPS de *S. typhimurium* en amortiguador de Reggiardo con 0.1% de deoxicolato. Se incuba toda la noche a 37° C y no es necesario bloquear. Se siembran los sueros diluidos 1/100 en PBST-BSA 1% y se incuban 2 hs a 37° C. Luego se agrega anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Sigma) diluido 1/10000 en PBST-BSA 1%. Se incuba 90' a 37° C y se revela con OPD.

Para determinar IgG anti-LPS de *S. enteritidis* se sensibiliza la placa con 5 µg/ml de LPS de *S. enteritidis* en amortiguador carbonato-bicarbonato 0.05M pH 9.6 y se incuba 90' a 37° C. No es necesario bloquear agregándose los sueros diluidos 1/100 en PBST-BSA 1%. Se continúa el ensayo según el protocolo descrito anteriormente para el ELISA de LPS de *S. Typhimurium*.

21. Análisis estadístico

La respuesta de anticuerpos de los distintos grupos de ratones del primer ensayo de inmunización (3 o 4 ratones por grupo) fue analizada mediante el test estadístico de Student. Se consideran diferencias significativas entre dos grupos cuando la $p < 0.05$. En el segundo ensayo de inmunización donde el número de ratones por grupo es mayor (10 ratones), se utiliza el test no paramétrico de Mann-Whitney U. De igual manera, se considera diferencias significativas entre dos grupos cuando la $p < 0.05$ o cuando $p < 0.01$.

22. Inmunolocalización de proteínas

Inmunohistoquímica

El material se fija en paraformaldehído 4 % en PBST, durante 4 horas a toda la noche a 4° C y con agitación. Se realiza una deshidratación en concentraciones crecientes de etanol y los organismos se incluyen en parafina. Los cambios se realizan en placas de petri de vidrio pequeñas en una estufa a 56° C. El material se incuba 2 veces en Xilol 100% durante 20'. Luego se incuba en una mezcla Xilol 50%-Parafina 50% a 56° C durante 20', y se hacen dos pasajes por parafina de 20' a 56° C. Por último se monta el bloque en placas metálicas y pinzas de Leukhart. Los bloques preparados pueden ser guardados a 4° C. Los bloques de parafina son cortados en secciones de 6-10 µm de espesor. Los cortes seriados se depositan

en una gota de agua sobre los portaobjetos mantenidos en una placa a 45° C, para estirarlos y adherirlos. Se guardan a 4° C protegidos de la humedad con gel de sílice.

Previamente, los portaobjetos son lavados y tratados con TESPA, para incrementar la adhesión de los cortes.

Los cortes son desparafinados mediante dos pasajes en Xilol de 15' cada uno. Luego son rehidratados con una serie alcohólica decreciente:

Etanol 100% 2 veces, 5' cada vez

Etanol 70% 2 veces, 5' cada vez

Etanol 50% 2 veces, 5' cada vez

Se realiza un lavado con PBS de 15 minutos, y se permeabiliza con pepsina 0.4% en HCl 0.1N (pH 5.0) a 37° C durante 15'. Se realiza otro lavado con PBS de 15' y se bloquea con PBST-BSA 0.25% durante 1 h a temperatura ambiente. Se lava brevemente y se incuba con una dilución 1/1000 del suero anti-EgTrp (producido en conejo) en PBST-BSA 0.25%, durante toda la noche a 4° C. Se hace un control negativo donde no se agrega el suero. Se hacen 4 lavados de 15' con PBS y se incuba con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina diluido 1/500 en PBST (PBS 1X, 0.3% Tritón), durante 90' a temperatura ambiente. Se hacen 4 lavados de 15' con PBS y se lava 2 veces con amortiguador de revelado (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 25 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 0.1% Tritón) durante 10'. Finalmente los portaobjetos son incubados con solución de revelado: 1ml amortiguador de revelado, 4.5 µl de NBT (75 mg de *nitroblue tetrazolium salt* por ml de dimetilformamida), 3.5 µl de BCIP (50 mg de *5-bromo-4-cloro-indolyl phosphate* por ml de dimetilformamida); hasta que aparezca señal. La reacción se para con PBS y los portaobjetos se montan con glicerol 50% en PBS para observación al microscopio. Todas las incubaciones son realizadas en cámara húmeda.

Inmunolocalización *in toto*

Los protoesclólices son fijados en PFA al 4% (p/v) en PBS 1X durante 1h a temperatura ambiente y conservados en metanol 100% a -20° C hasta su uso. Se hidratan a través de una serie de lavados en metanol 75%, 50%, 25% y en PBS. Se hace un lavado con PBST y se incuba con proteinasa K (50 µg/ml) o pepsina (2%) en PBS durante 2 hs 30' a 37° C. Posteriormente se realizan 3 lavados de 5', con 2 mg/ml de glicina en PBS para inactivar la enzima. El material es fijado con PFA 4% en PBS, durante 2 hs a 4°C. Se realizan 3 lavados de 5' con PBST y se bloquea durante 1 h con PBST-BSA 0.25%. Luego se incuba con el suero anti-EgTrp (producido en conejo) diluido 1/1000 en PBST-BSA 0.25%, durante toda la noche a 4°C. Se hacen 5 lavados de 15' con PBST y se incuba con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina diluido 1/500 en PBST, durante 2 hs a temperatura ambiente. Se hacen 5 lavados de 10' con PBST y se lava 2 veces con amortiguador de revelado durante 5'. Por último, los portaobjetos son incubados con solución de revelado hasta la aparición de la señal. La reacción se detiene con PBS y el material se monta en portaobjetos con glicerol 50% en PBS para observación al microscopio.

23. Hibridización *in situ*

Se sigue el mismo protocolo de fijación, inclusión y obtención de cortes utilizado para inmunohistoquímica pero se utiliza para hacer todas las soluciones agua libre de ARNasas y los portaobjetos son tratados más rigurosamente. Primero se lava los portaobjetos con agua, y se los deja en etanol ácido (70% etanol, 1% HCl) toda la noche. Luego se enjuagan con abundante agua corriente y agua destilada, y se incuban un mínimo de dos horas a 200° C para eliminar las ARNasas. Se lavan 3' con acetona, y se sumergen durante 5' en una solución de TESPA al 2% en acetona. Se enjuagan con agua miliQ libre de ARNasas, se secan al aire durante la noche y se guardan a temperatura ambiente.

Es necesario hacer un tratamiento previo de los cortes para que la sonda pueda acceder al ARN de la preparación. Para esto los cortes son desparafinados mediante dos incubaciones de 10' en xilol 100%, y son rehidratados en una serie alcohólica de 100% a 30%, finalizando con dos lavados cortos en PBS 1X. Luego se hidrolizan con HCl 0.2N, durante 10' a temperatura ambiente y se lava 3 veces con PBS 1X. Se desproteíniza con 1 µg/ml de proteinasa K en PBST (PBS, 0.1% Tween), 30' a 37°C; en este punto el ARN queda desprotegido y todas las soluciones utilizadas hasta la próxima fijación son preparadas con agua DEPC. Se prosigue lavando 3 veces con PBS a temperatura ambiente y la enzima es inactivada incubando en PBS frío durante 5'. Se realiza la postfijación con PFA 4% en PBS, durante 20' a temperatura ambiente. Se hacen 4 lavados de 5' con PBS y se deshidrata en una serie de alcoholes de 30 a 90% y dos pasajes por 100% (2' por pasaje). Los corte se secan al aire quedando listos para hibridar.

Para preparar la sonda de ARN antisentido, primero se digiere el plásmido pGEM-EgTrp con BamH1, se verifica la digestión mediante electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio y se purifica el plásmido digerido mediante una extracción con fenol: cloroformo (1:1). Se realiza una transcripción *in vitro* en 30 µl totales, se utiliza 1 µg del ADN purificado, amortiguador para la transcripción 1X (Roche), 2 µl de la mezcla de nucleótidos con rUTPs marcados con digoxigenina ([ATP][CTP][GTP]=10mM, [UTP]=6.5mM, [DIG-UTP]=3.5mM), 1 µl de inhibidor de ribonucleasas RNasin (Promega, 40 U/µl), y 2 µl de SP6 ARN polimerasa dependiente de ADN (20 U/µl, Roche). Se incuba 2 hs a 37° C y se agrega ADNasa libre de ARNasas (20 U/µg de ADN molde), incubándose 15' a 37° C. Se lleva el volumen a 100µl con agua DEPC y se agrega 8 µl de EDTA 0.2 M. El ARN es precipitado con 10 µl de LiCl 4M y 250 µl de etanol absoluto. Se mantiene a -20° C durante toda la noche y se centrifuga a alta velocidad durante 20' a 4°C. Se retira el etanol y se lava con 300 µl de etanol 70%, se vortexea para romper el precipitado. Se centrifuga durante 10' y se lava nuevamente con 50 µl de etanol absoluto. Se centrifuga brevemente, se remueve el etanol y se deja secar. El precipitado se disuelve en agua DEPC a 1µg/µl (80 µl aproximadamente).

Se lleva a cabo la visualización de la ribosonda marcada mediante electroforesis libre de ARNasas en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio y transferencia en seco del gel a membrana de nylon, para posterior control del marcado con anticuerpo anti-digoxigenina conjugada a fosfatasa alcalina.

Una vez obtenida la sonda se procede con la hibridación, utilizándose como control positivo una sonda, correspondiente a la región del homeobox del gen *hox5* de *E. granulosus*, que presenta una expresión ubicua en protoescólices (Lalanne, 2003). Primero se diluye la sonda en solución de hibridación (solución de sales 1X, 50% (v/v) de formamida, 10% (p/v) de sulfato de dextrano, 1mg/ml de ARNt de levaduras (Sigma), 1X Denhart) de 0.5 a 1 ng/μl y se desnaturaliza 2´ a 80° C. La sonda se aplica sobre los preparados y se cubren con un cubreobjeto para evitar la evaporación. Se incuba en estufa a 50-60° C en cámara humificada con 50% de formamida y solución de sales 1X. Se hibrida entre 12 y 16 hs, luego los portaobjetos son sumergidos en 2X SSC precalentado y son incubados a 50-60° C hasta que se desprendan los cubreobjetos. Luego se incuban en una solución de lavado (1X SSC, 50% formamida, 0.1% Tween 20), 20´ a 50-60° C. Por último, se lavan en una solución de lavado (1X SSC, 50% formamida) durante 20´ a 50-60° C.

Solución de sales 10X: 114g NaCl, 14.04g Tris-HCl, 1.34 g Tris Base, 7.8g NaH₂PO₄·2H₂O, 7.1g Na₂HPO₄, 100ml de EDTA 0.5 M, se completa a 1 l con agua destilada.

La etapa final comprende la incubación con anticuerpo y revelado. Los portaobjetos se lavan 2 veces en MAB 1X (100 mM ácido maleico, 150 mM NaCl, pH 7.5), 30´ cada vez, y se incuban durante por lo menos 1 h con solución de bloqueo (2% reactivo de bloqueo de Boehringer en MAB) en cámara húmeda a temperatura ambiente. Se quita la solución de bloqueo y se agrega el anticuerpo anti-digoxigenina (Roche) diluido 1/2000 en solución de bloqueo. Se incuba toda la noche a temperatura ambiente en cámara húmeda. Luego se hacen 5 lavados de 15´ con MAB– 0.1% Tween y se lava 2 veces con amortiguador de revelado. Se aplica el reactivo BM púrpura de Boehringer o NBT-BCIP y se incuba en cámara húmeda hasta que aparezca la señal. La reacción se detiene con PBS-Tween y se incuban 10´ con etanol en el caso del reactivo BM púrpura, posteriormente se fija en PFA 4% durante 20´, se lava y se monta con glicerol 80% en PBS.

24. Electroforesis

Acidos Nucleicos

Los ácidos nucleicos son analizados mediante electroforesis en geles de agarosa preparados con amortiguador TAE 1X, conteniendo bromuro de etidio (0.5 μg/ml de agarosa). Los geles se someten a electroforesis a 3mA/cm², en la misma solución amortiguadora utilizada para preparar el gel. Las concentraciones de agarosa (p/v) se indican en cada caso. Se usa como marcadores de tamaño los comercialmente conocidos como “λHind” o “1 Kb Plus DNA ladder” (Invitrogen) o “100 pb DNA ladder”, determinándose los pesos moleculares graficamente. Las bandas se visualizan mediante exposición con luz ultravioleta y son fotografiados con la cámara digital Kodak EDAS 290.

Proteínas

Se analizan extractos proteicos obtenidos de protoescólices, bacterias o células en geles de poliacrilamida desnaturizantes y discontinuos (Laemmli, 1970). Los mismos son teñidos

con Azul de Coomassie (7% ácido acético, 30% etanol, 0.25% Azul de Coomassie) y destañados con una solución decolorante (7% de ácido acético, 30% de etanol). La relación acrilamida-bisacrilamida siempre es 30:0.8 y la concentración de poliacrilamida se indica en cada caso. Se usaron mini-cubas OWL Scientific, y un voltaje de 80V en el gel de concentración y 120 V en el gel de separación. Se usaron los marcadores de peso molecular “Prestained Protein Marker Broad Range” (New England Biolabs), o “Prestained Protein Molecular Weight Standard High Range” (Gibco), o “Precision Plus Protein Standards All Blue” (BioRad), determinándose los pesos moleculares de las proteínas gráficamente.

Se emplean los siguientes amortiguadores:

Amortiguador de muestra 4X: Tris 0.250 M pH 6.8, SDS 8%, glicerol 40%, β -mercaptoetanol 20%, 0.4% azul de bromofenol.

Amortiguador de corrida: 6g Tris, 28.8 g glicina, 10 ml SDS 10%, agua hasta completar 1000 ml (pH 8.6)

Amortiguador del gel de separación: Tris 1.5M pH 8.8

Amortiguador del gel de concentración: Tris 0.02M pH 6.8

Para preparar los extractos conteniendo proteínas de protoescólices, se agrega un volumen de amortiguador Tris 50 mM pH 8.5, 0.15 M NaCl, complementado con inhibidores de proteasas. Cada 500 μ l del amortiguador se agrega 5 μ l de los inhibidores de proteasas leupeptina, pepstatin, aprotinina, EDTA- Na_2 , 10 μ l de PMSF 0.8% y 5 μ l de Tritón X100. Se homogeneiza con homogeneizador de tubos eppendorf y se centrifuga 5' a 8000g, separándose el sobrenadante.

También se obtienen extractos proteicos a partir de infecciones con los MVAs recombinantes, en placas de 6 pocillos con células QT35. Se infecta con 10ufp/célula, y se incuba de 8-24 hs a 37°C. Se rastrilla la monocapa, se centrifuga 5' a 1800g, a 4°C, se lava el precipitado con PBS y se vuelven a centrifugar en las mismas condiciones. El precipitado se resuspende en 100 μ l de amortiguador RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 105 mM NaCl, 1% NP-40, 1% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 2 mM EDTA) con 10 μ l de ADNasa 1mg/ml, se vortexea y se centrifuga a alta velocidad 10' a 4°C. Se separa el sobrenadante y se conserva a -80°C. Se siembra 10 μ l de las relaciones 1:1 y 9:1 de amortiguador de carga (diluido en PBS): lisado. Se realiza *Western Blot* con sueros específicos, utilizándose como controles negativos extractos a partir de células no infectadas e infectadas con MVA-pSC11.

Para confirmar la expresión de las proteínas heterólogas de las *Salmonellas* recombinantes se hacen *Western Blot* con los sueros específicos. Para obtener los extractos proteicos se inocula 3ml de LB con 60 μ l de un precultivo crecido durante toda la noche. Las bacterias crecen durante 2 hs 30' hasta una D.O. de 0.5-0.6, centrifugando luego 1 ml de medio a alta velocidad durante 1'. El precipitado se resuspende en 80 μ l de PBS y se utiliza 15 μ l para sembrar en el gel.

En todos los casos, se agrega la cantidad necesaria de amortiguador de muestra para obtener una concentración final 1X, y la muestra se hierve durante 5' antes de ser sembradas.

25. Western Blot

La transferencia para estos estudios se hicieron sobre filtros de nitrocelulosa o PVDF (Hybond-P de Amersham), a partir de extractos proteicos y proteínas puras sometidos a electroforesis en poliacrilamida. Se utiliza el sistema semi seco de LKB, se transfiere a 0.8 mA/cm² de membrana durante 1 hora y el amortiguador de transferencia consiste en Tris 0.025M, Gly 0.15M, SDS 0.037%, 20% etanol. Se controla la calidad de la transferencia tiñiendo los filtros con rojo Ponceau en solución acuosa al 2%; el colorante es eliminado con agua. Luego los filtros son bloqueados con 10 % (p/v) de leche descremada (Conaprole) en TBST 1X, durante 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Se incuban los filtros con los sueros adecuados según el caso. Para revelar se emplea la reacción de la fosfatasa alcalina (AP), usando el anticuerpo secundario conjugado a AP en la dilución indicada por el fabricante y como sustrato NBT y BCIP en tampón AP (33µl de NBT y 16.5µl de BCIP cada 10ml de tampón). Se para la reacción con agua destilada. Todos los anticuerpos se diluyen en TBST y en cada caso se indica la dilución del suero específico.

El trabajo realizado para obtener las cepas de *Salmonella* recombinantes y los consiguientes estudios de expresión y de estabilidad plasmídica, fueron realizados en el Departamento de Medicina Veterinaria Clínica (Cambridge University, U.K.), bajo la supervisión del Prof. Duncan Maskell y Prof. Carlos C.E. Hormaeche.

Los ensayos de inmunización en ratones fueron realizados en el laboratorio de vacunas recombinantes del Instituto de Higiene (Facultad de Medicina, UdelaR), bajo la supervisión del Dr. Alejandro Chabalgoity.

El trabajo realizado para la obtención de los virus vaccinia Ankara modificados recombinantes fue realizado en el Departamento de Medicina Veterinaria Clínica (Cambridge University, U.K.), bajo la orientación de la Dra. Barbara Blacklaws.

Resultados

1. Tropomiosina de *Echinococcus granulosus*

1. 1. Obtención de ADNc completo

En un trabajo previo, Esteves y colaboradores clonaron un fragmento de ADNc que se expresa en protoescolices (PEs), mediante el rastreo de una librería de ADNc de PEs utilizando sueros producidos contra ellos y contra la capa germinal (Esteves y cols., 2003). El fragmento clonado contiene un marco abierto de lectura de 177 aminoácidos (AA), y presenta alta identidad con las α -tropomiosinas de varias especies (Esteves y cols., 2003). Dicho fragmento, correspondiente a la tropomiosina de *E. granulosus* (EgTrp), presenta 99.2% de identidad nucleotídica con la tropomiosina de *Echinococcus multilocularis*. Por comparación con la secuencia completa de la tropomiosina de *E. multilocularis* se estima que el clon aislado carece de un fragmento hacia el extremo 5', de probablemente 107 aminoácidos (AA).

Se diseña un cebador directo (Df5 nt directo) a partir de la secuencia nucleotídica de la tropomiosina de *E. multilocularis* debido a su alta identidad nucleotídica con el fragmento clonado, para poder aislar el ADNc completo de la tropomiosina de *E. granulosus*. Mediante RT-PCR, usando este cebador directo (Df5 nt directo), un cebador reverso específico (Df5 ct reverso) y ARN de PEs, se obtiene un fragmento de alrededor de 850 pb (figura 6).

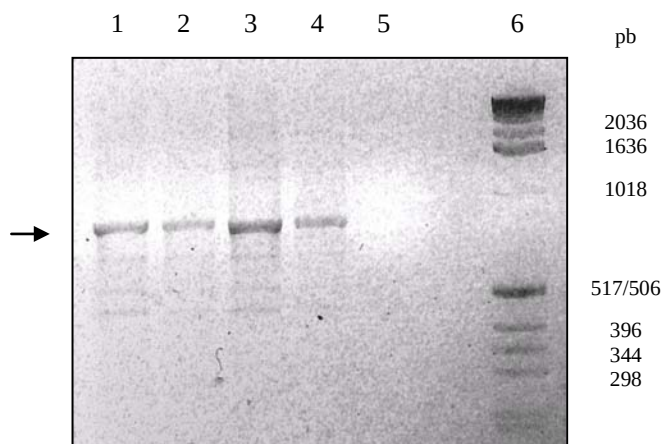


Figura 6. Obtención de ADNc de *EgTrp* completo. Electroforesis en agarosa 2% teñida con bromuro de etidio (Bet).

1-4) producto de PCR a partir de ADNc de PEs usando los cebadores Df5 nt directo y Df5 ct reverso; 5) control negativo de la PCR; 6) marcador de peso molecular de ADN X (Roche). La flecha indica el fragmento amplificado de 850 pb.

El fragmento de ADN es clonado en el plásmido pGEM-T-Easy y es secuenciado con los cebadores específicos del plásmido, T7 y SP6 (figura 7).

M	D	S	I	K	K	I	M	M	A	M	K	L	E	K	E	N
ATG	GAT	TCC	ATC	AAA	AAG	ATT	ATG	ATG	GCA	ATG	AAA	TTG	GAG	AAA	GAA	AAT
A	L	E	K	A	I	N	L	E	N	Q	L	K	E	K	A	K
GCA	TTG	GAA	AAG	GCC	ATA	AAT	CTC	GAA	AAT	CAA	CTC	AAG	GAG	AAG	GCC	AAA
D	F	E	K	K	E	E	E	M	N	D	W	L	S	K	V	K
GAT	TTT	GAG	AAG	AAA	GAA	GAA	GAG	ATG	AAT	GAC	TGG	CTC	TCT	AAA	GTG	AAG
N	I	Q	T	E	V	D	T	V	Q	E	S	L	Q	E	A	I
AAC	ATT	CAG	ACT	GAA	GTA	GAC	ACC	GTA	CAA	GAG	TCT	CTC	CAG	GAA	GCG	ATT
S	K	L	E	E	T	E	K	R	A	T	N	A	E	A	E	V
AGC	AAA	CTC	GAA	GAA	ACC	GAG	AAG	CGT	GCG	ACA	AAC	GCC	GAA	GCC	GAA	GTT
A	A	M	T	R	R	I	R	L	L	E	E	D	F	E	Q	S
GCT	GCT	ATG	ACC	CGT	CGC	ATT	CGG	CTT	TTG	GAG	GAA	GAT	TTT	GAA	CAG	TCT
S	G	R	L	T	E	T	S	T	K	L	D	D	A	S	K	A
AGT	GGC	CGT	CTT	ACT	GAA	ACA	TCT	ACT	AAG	CTT	GAC	GAT	GCT	AGC	AAA	GCT
A	E	E	S	E	R	N	R	K	T	L	E	T	R	S	I	S
GCT	GAG	GAG	AGC	GAA	AGG	AAT	CGA	AAA	ACC	CTT	GAG	ACC	AGG	TCT	ATT	TCT
D	D	E	R	M	A	Q	L	E	E	Q	V	K	E	A	K	Y
GAC	GAT	GAA	CGA	ATG	GCC	CAA	CTA	GAA	GAA	CAG	GTA	AAG	GAG	GCG	AAG	TAC
I	A	E	D	A	E	R	K	Y	D	E	A	A	R	R	L	A
ATC	GCT	GAA	GAT	GCC	GAA	CGG	AAA	TAC	GAT	GAA	GCT	GCT	CGC	CGC	TTG	GCA
V	T	E	V	D	L	E	R	A	E	S	R	L	E	T	S	E
GTG	ACC	GAG	GTC	GAC	TTG	GAG	CGA	GCG	GAG	TCT	CGT	TTG	GAA	ACC	TCG	GAG
S	K	I	V	E	L	E	E	E	L	R	I	V	G	N	N	M
AGC	AAA	ATC	GTT	GAA	CTT	GAG	GAA	GAA	CTG	CGC	ATT	GTT	GGT	AAC	AAC	ATG
K	S	L	E	V	S	E	Q	E	S	L	Q	R	E	E	S	Y
AAA	TCT	CTC	GAA	GTC	TCC	GAG	CAA	GAG	TCT	CTT	CAG	CGC	GAA	GAA	AGT	TAC
E	E	T	I	R	D	L	T	E	R	L	K	T	A	E	Q	R
GAA	GAA	ACC	ATT	CGA	GAT	TTG	ACA	GAG	CGC	TTG	AAG	ACG	GCA	GAG	CAG	CGT
A	A	E	A	E	R	Q	V	S	K	L	Q	N	E	V	D	R
GCT	GCC	GAA	GCT	GAA	CGC	CAA	GTG	TCC	AAG	CTC	CAA	AAT	GAA	GTT	GAC	CGC
L	E	D	E	L	L	S	E	K	E	R	Y	R	A	I	S	G
CTT	GAA	GAT	GAG	CTA	CTA	TCC	GAG	AAG	GAA	CGT	TAC	CGA	GCC	ATC	AGC	GGA
		E	L	D	T	T	F	A	E	L	T	S	F	&		
		GAA	CTG	GAT	ACT	ACC	TTC	GCG	GAG	CTC	ACT	TCC	TTC	TGA		

Figura 7. Secuencia codificante de *EgTrp*. La secuencia nucleotídica se representa en negro y se separa en tripletes; comienza con el ATG inicial y hay 51 bases por línea. Se indican en rojo los aminoácidos codificados por cada triplete. Se señala con color bordeau y azul las bases que limitan los exones según se determina en la sección 1.4. Se señala con negritas los nucleótidos que corresponden a la secuencia de tropomiosina de *E. multiloculares*, correspondientes a los seis primeros aminoácidos de la secuencia.

1. 2. Análisis de secuencia

El análisis de la secuencia (855 pb) mediante traducción conceptual, obtenido a través del programa BLASTX, reveló que EgTrp presenta un 99% de similitud con la tropomiosina de *E. multilocularis* (TPM), 87% de similitud con la tropomiosina de *Schistosoma japonicum* (SjcTM), 86% con la tropomiosina de *S. mansoni* (TMI), 73% con la tropomiosina de *Caenorhabditis elegans* (CeTMI), 73% con la tropomiosina de *Onchocerca volvulus* (Ov-tmy-1) y 73% con la tropomiosina de *Drosophila melanogaster* (Tm1 isoforma J) (figura 8). La comparación con las α -tropomiosinas de vertebrados arroja porcentajes de similitud un poco inferiores. Por ejemplo, presenta un 70% de similitud con las α -tropomiosinas de: *Gallus gallus*, *Canis familiaris*, y *Xenopus laevis*; mientras que con *Mus musculus*, *Bos taurus*, y *Homo sapiens* la similitud es de 67%.

Recuérdese que los primeros seis aminoácidos de EgTrp corresponden a la tropomiosina de *E. multilocularis* (TPM).

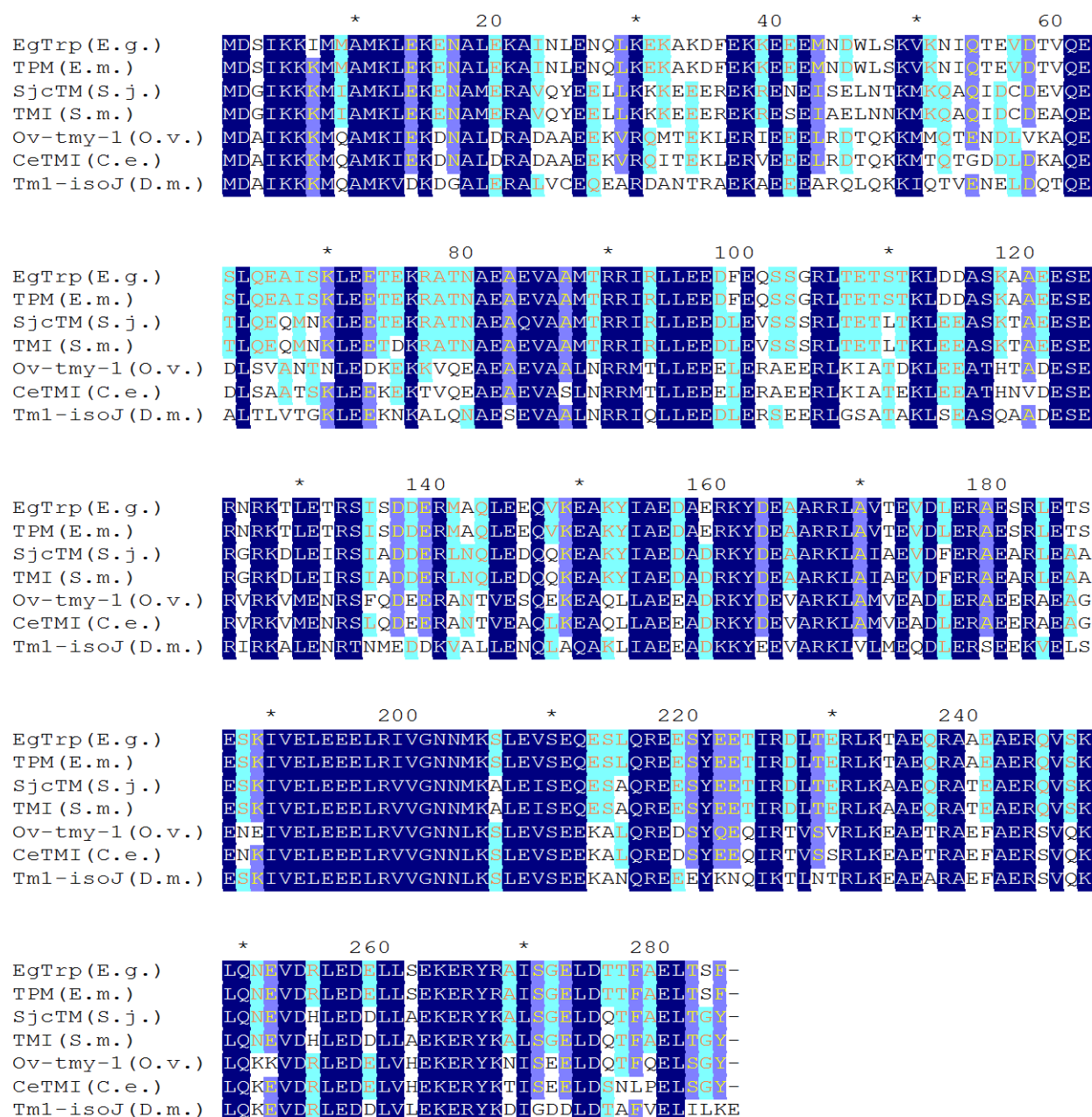


Figura 8. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la tropomiosina de *E. granulosus* con algunas tropomiosinas de invertebrados. El color azul oscuro representa el 100 % de similitud aminoacídica, el color azul claro representa del 80 al 100% de similitud, y el color celeste indica del 60 al 80% de similitud.

A continuación se indica el organismo al cual pertenece cada proteína y el número de acceso a la secuencia de cada proteína.

E.g.: *Echinococcus granulosus*, E.m.: *Echinococcus multilocularis* (CAC85552), S.j.: *Schistosoma japonicum* (Q26519), S.m.: *Schistosoma mansoni* (P42637), O.v.: *Onchocerca volvulus* (AAC28900), C.e.: *Caenorhabditis elegans* (BAA07540), D.m.: *Drosophila melanogaster* (NM_169636).

	g	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f
E		M	D	S	I	K	K	I	M	M	A	M	K	L
Q		K	E	N	A	L	K	D	A	I	N	L	E	N
E		L	K	E	K	A	K	K	F	E	K	K	E	E
E		M	N	D	W	L	S	K	V	K	N	I	Q	T
K		V	D	T	V	Q	E	S	L	Q	E	A	I	S
E		L	E	E	T	E	K	R	A	T	N	A	E	A
D		V	A	A	M	T	R	R	I	R	L	L	E	E
K		F	E	Q	S	S	G	R	L	T	E	T	S	T
N		L	D	D	A	S	K	A	A	E	E	S	D	R
R		R	K	T	L	E	T	R	S	I	S	D	D	E
I		M	A	Q	L	E	E	Q	V	K	E	A	A	Y
R		A	E	D	A	E	R	K	Y	D	E	A	A	R
R		L	A	V	T	E	V	D	L	E	R	A	E	S
E		L	E	T	S	E	S	K	I	V	E	L	E	E
S		L	R	I	V	G	N	N	M	K	S	L	E	V
T		E	Q	E	S	L	Q	R	E	E	S	Y	E	E
R		I	R	D	L	T	E	Q	L	K	S	A	E	Q
E		A	A	E	A	E	R	E	V	S	L	L	Q	N
R		V	D	R	I	S	D	E	L	L	T	E	K	E
E		L	T	S	F		G	E	L	D	T	T	F	A

Figura 10. Secuencia aminoacídica de EgTrp mostrando el patrón de heptapéptidos, Los AA se ordenan en heptapéptidos (a-b-c-d-e-f-g)n, de acuerdo a Stone y cols. (1975). Los recuadros en rojo (a y d) contienen mayoritariamente residuos hidrofóbicos.

1. 3. Isoformas del gen *EgTrp*

Se examina la existencia de isoformas del gen *EgTrp*, producto del procesamiento alternativo del transcrito primario. Se realiza RT-PCR utilizando cebadores de cada posible exón en diferentes combinaciones, tratando así de rastrear posibles productos del procesamiento alternativo del transcrito primario (figura 11). Los exones se nombran de manera condicional a los resultados de la sección siguiente. En la figura 11 se esquematiza el arreglo de cebadores usados sobre la secuencia codificante de *EgTrp*. En la mayoría de los casos se usa ADN copia (ADNc) enriquecido en extremos 5' y 3' de *EgTrp*. Posteriormente, los productos de PCR generados son purificados y secuenciados.

Cuando decimos que un producto de amplificación es inespecífica nos referimos a que el producto de PCR no pudo ser reamplificado o que la secuencia obtenida codifica para una proteína desconocida según el programa Blast.

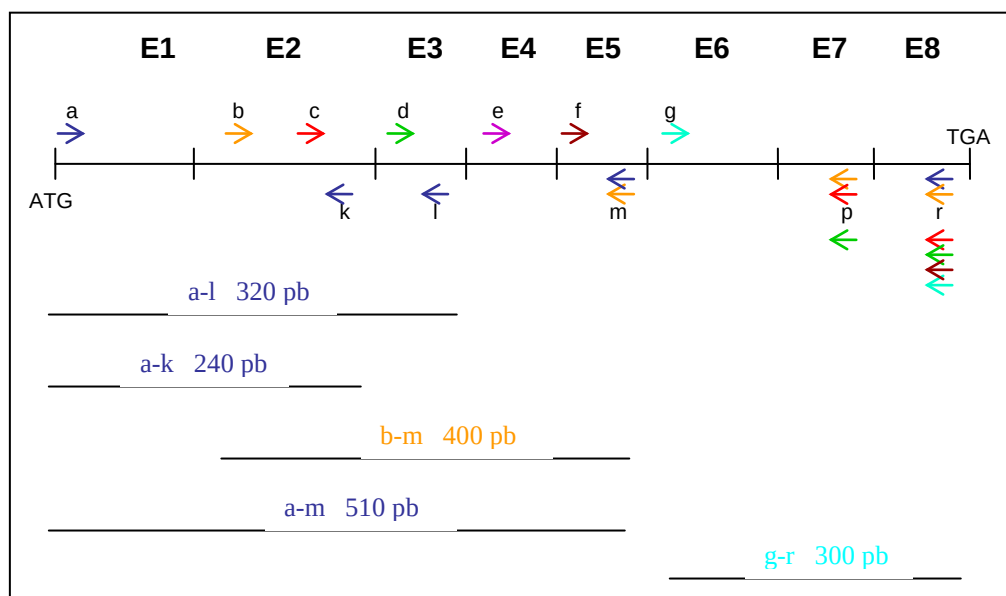


Figura 11. Esquema de la secuencia codificante del gen *EgTrp* con los cebadores utilizados para el rastreo de las posibles isoformas de este gen. Se indican los exones numerados con negritas y los cebadores con flechas de colores, los cebadores directo y reverso de un mismo color se usan en la misma reacción de PCR. Nombre de cebadores: a - Df5nt directo, b - NDWDf5, c - ESLQDf5, d - AMTRf, e - ETRSf, f - LAVTf, g - EVSEf, k - ETEKrev, l - EQSSrev, m - 201Rev-Df5, p - RQVSrev, r - Df5ct reverso.

Se indican los productos de PCR que se esperan obtener en algunas reacciones, al amplificarse la secuencia codificante de *EgTrp* clonada anteriormente.

En la figura 12 se observa los productos de PCR producidos cuando se amplifica el ADNc utilizando los cebadores Df5 nt directo (a) y EQSSrev (l), y Df5 nt directo (a) y ETEKrev (k), se utiliza 56°C como temperatura de hibridización de los cebadores. En el primer caso se obtiene una única banda de ADN de 320 pb aproximadamente y en la segunda reacción se observa una sola banda de 240 pb.

La secuencia de estos fragmentos indica la región codificante del gen *EgTrp* desde el exón 1 al 3, y desde el exón 1 al 2 respectivamente. Esto nos hace suponer que no existen isoformas, producto del procesamiento alternativo, a este nivel.

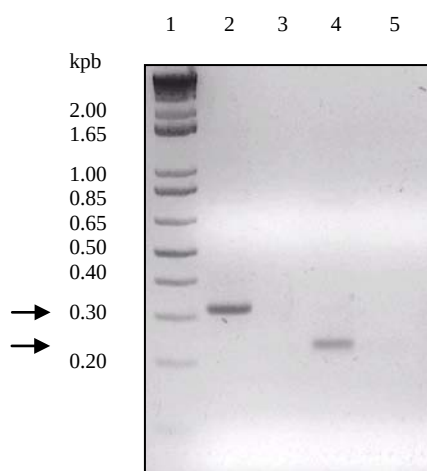


Figura 12. Análisis exón 1-3 y 1-2.
Electroforesis en agarosa 2% teñida con Bet.

1) marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA ladder; 2) producto de PCR de ADNc usando los cebadores Df5 nt directo (a) y EQSSrev (l); 3) control negativo de la PCR 2; 4) producto de PCR de ADNc utilizando los cebadores Df5 nt directo (a) y ETEKrev (k); 5) control negativo de la reacción 4. Las flechas indican los productos de PCR secuenciados.

Luego se amplifica ADNc generado con cebadores al azar (CA) y ADNc enriquecido en tropomiosinas, utilizando los cebadores NDWDf5 (b) y 201Rev (m) (exón 2 al 5), y Df5 nt directo (a) y 201Rev (m) (exón 1 al 5) (figura 13). En todas las reacciones se utiliza 55°C como temperatura de hibridización. Cuando se amplifica la región entre el exón 2 y el 5 usando ADNc generado con CA, se observan 3 bandas de ADN. La mayor de 520 pb aproximadamente, es débil y desaparece cuando se utiliza ADNc enriquecido indicando que es una amplificación inespecífica. La banda intermedia de 400 pb aprox. es muy fuerte y la secuencia del ADN correspondiente develó la secuencia codificante del gen desde el exón 2 al 5 (exón 2, 3, 4 y 5). La secuencia de la banda inferior más tenue de 290 pb aprox. corresponde al exón 2, 3 y 5. Los productos obtenidos de las PCRs del exón 1 al 5 con

ADNc generados con CA y enriquecido presentan un perfil similar. Se observa una banda intensa de 510 pb aprox. cuya secuencia corresponde al exón 1, 2, 3, 4 y 5. Se visualizan varias bandas de mayor tamaño probablemente de amplificaciones inespecíficas.

También se observa una banda discreta menor de aprox. 400 pb. Su secuencia develó la presencia del exón 1, 2, 3, y 5. Estos resultados coinciden con los anteriores.

De esta forma encontramos una nueva isoforma que no posee el exón 4 a la que llamamos isoforma C (exones 1, 2, 3 y 5). La isoforma previamente clonada, que contiene los exones 1, 2, 3, 4 y 5, la llamamos ahora isoforma A.

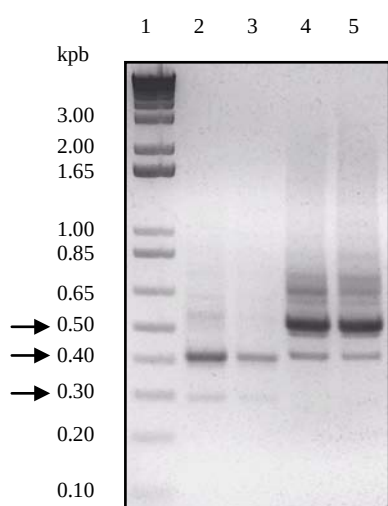


Figura 13. Análisis exón 2-5 y 1-5.

Electroforesis en agarosa 2% teñida con Bet.

1) marcador de peso *1 kb DNA ladder*; 2) producto de PCR de ADNc (CA) usando los cebadores NDWDf5 (b) y 201Rev (m); 3) idem a 2 usando ADNc enriquecido; 4) producto de PCR de ADNc (CA) utilizando los cebadores Df5 nt directo (a) y 201Rev (m); 5) idem a 4 usando ADNc enriquecido.

Los controles negativos no se muestran en el gel. Las flechas indican los productos de PCR secuenciados.

La figura 14 muestra el producto de PCR obtenido de amplificar ADNc desde el exón 6 al 8, con los cebadores EVSEf (g) y Df5 ct reverso (r) y utilizando una temperatura de hibridización de 56°C. Se observan dos bandas en el gel de electroforesis, una mayor de 700 pb aprox. y una menor de 300 pb aprox. La secuencia del fragmento de ADN superior devela la secuencia de parte del exón 6 (exón 6A) seguida de una región no contenida en la isoforma clonada en primer lugar (isoforma A), a la que llamamos exón 6B (396 nt) y del resto del exón 6, al que llamamos exón 6C. A continuación este fragmento contiene la secuencia del exón 7 y del 8. Por lo tanto, la secuencia de este producto de PCR corresponde al exón 6A, 6B, 6C, 7 y 8. Mientras que la secuencia del fragmento de ADN

inferior corresponde a los exones 6A, 6C, 7 y 8, correspondiéndose con la isoforma original A.

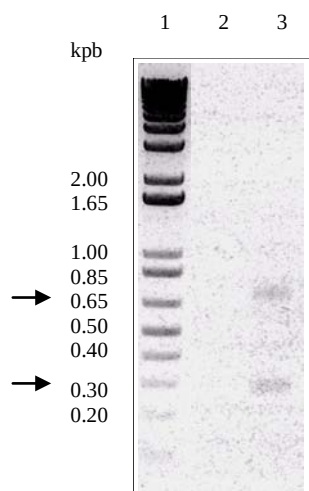


Figura 14. Análisis exón 6-8.

Electroforesis en agarosa 2% teñida con Bet.

1) marcador de peso molecular *1 kb Plus DNA ladder*; 2) control negativo; 3) producto de PCR de ADNc usando los cebadores EVSEf (g) y Df5 ct reverso (r). Las flechas indican los productos de PCR secuenciados.

El descubrimiento de un nuevo exón, el exón 6B, nos hace pensar en la existencia de una nueva isoforma (isoforma B), para dilucidar su secuencia completa continuamos realizando PCRs con la batería de cebadores. En base a la secuencia del exón 6B se diseña un nuevo cebador reverso Df5 ex7Brev (o).

De esta manera se analizan los productos de PCR obtenidos de la amplificación de ADNc desde el exón 4 al 6B (figura 15 A). Se utilizan los cebadores ETRSf (e) y Df5 ex7Brev (o) y la temperatura de hibridización es de 52°C. En este caso se visualizan dos bandas de ADN, una de 300 pb (4-6B-1) y otra de 380 pb aprox. (4-6B-2). Las mismas se recortan, purifican y reamplifican por PCR en las mismas condiciones pero se utiliza 51°C como temperatura de hibridización de los cebadores (figura 15 B). El producto de la reamplificación del material colectado de 4-6B-2 es secuenciado correspondiendo a 4-6B-1 de 300pb, consideramos entonces que el producto 4-6B-2 es el resultado de una amplificación inespecífica. La banda 4-6B-1 reamplifica y se secuencia obteniéndose la secuencia del exón 4, 5, 6A y 6B. Por lo tanto utilizando este par de cebadores, finalmente se obtiene un único producto de PCR, que incluye al exón 4, 5, 6A y 6B.

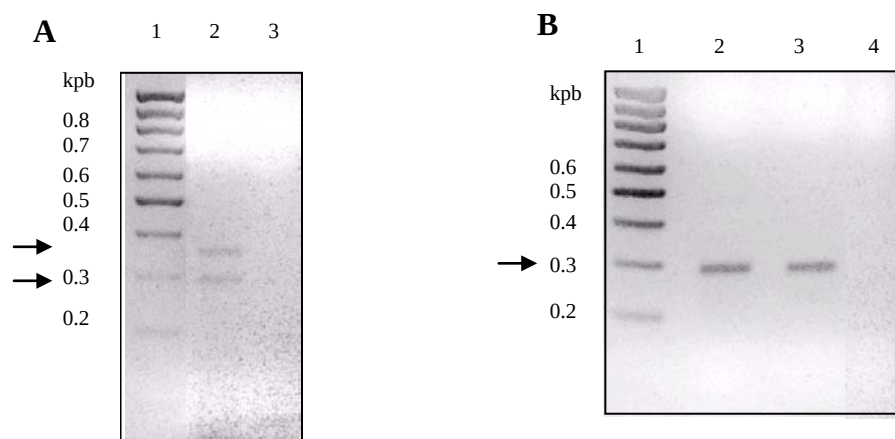


Figura 15. Análisis exón 4-6B.
Electroforesis en agarosa 2% teñidas con Bet.

A muestra el producto de PCR de ADNc utilizando los cebadores ETRSf (e) y Df5 ex7Brev (o) (carril 2), y su blanco (carril 3).

B corresponde al producto de reamplificación de las bandas de A (4-6B-1 y 4-6B-2).
2) reamplificación de 4-6B-1; 3) reamplificación de 4-6B-2, 4) control negativo.

En A y en B (carril 1) se usa el marcador de peso molecular *100 pb DNA ladder* (AppliChem). Las flechas indican los productos de PCR obtenidos.

Para completar la secuencia hacia 5' de la isoforma B se amplifica ADNc desde el exón 1 al 6B, utilizando los cebadores Df5 nt directo (a) y Df5ex7Brev (o) y 51°C como temperatura de hibridización. En la electroforesis se observa una banda nítida de aprox. 750 pb y algunas bandas tenues que consideramos amplificaciones inespecíficas (figura 16). La secuencia de este fragmento corresponde al exón 1, 2, 3, 4, 5, 6A, y 6B.

Cuando amplificamos desde el exón 1 al 6B no se amplifica la isoforma que presenta el salto del exón 4, ésta en cambio aparece en la figura 13 al amplificar desde el exón 1 o 2 hasta el exón 5, esto nos sugiere que cuando está el exón 6B presente también está presente el exón 4.

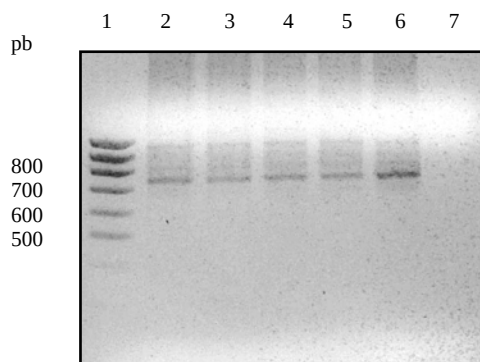


Figura 16. Análisis exón 1-6B.
Electroforesis en agarosa 1.7% teñida con Bet.

1) marcador de peso molecular *100 pb DNA ladder* (AppliChem); 2-6) producto de PCR de ADNc usando los cebadores Df5 nt directo (a) y Df5ex7Brev (o); 7) control negativo. La flecha indica el producto de PCR secuenciado.

Finalmente se realiza otra serie de reacciones de PCR con diversas combinaciones de cebadores, esperando identificar el ADNc completo de más de una isoforma de *EgTrp*.

Se amplifica ADNc utilizando los cebadores Df5 nt directo (a) con Df5 ct reverso (r) (exón 1 al 8), Df5 nt directo (a) con RQVSrev (p) (exón 1 al 7), NDWDf5 (b) con Df5 ct reverso (r) (exón 2 al 8), ESLQDf5 (c) con Df5 ct reverso (r) (exón 2 al 8), NDWDf5 (b) con RQVSrev (p) (exón 2 al 7), ESLQDf5 (c) con RQVSrev (p) (exón 2 al 7), AMTRf (d) con RQVSrev (p) (exón 3 al 7), AMTRf (d) con Df5 ct reverso (r) (exón 3 al 8); y LAVTf (f) con Df5 ct reverso (r) (exón 5 al 8). Se probaron distintas condiciones de PCR, como temperaturas de hibridización diferentes y distintas concentraciones de molde, esperando obtener más de una banda de ADN. Sin embargo, en todos los casos se obtiene una sola banda, correspondiente a la isoforma de tropomiosina mayoritaria clonada en primer lugar (isoforma A).

Encontramos entonces tres isoformas, a las que llamamos A, B y C. La isoforma A suponemos que es la más abundante ya que es la que se amplifica mayoritariamente en todos los casos. La misma está integrada por los exones 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6C, 7 y 8; y corresponde a la secuencia codificante clonada anteriormente.

La isoforma B está formada por los exones 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7 y 8. Del análisis de la secuencia de esta isoforma surge la presencia de un codón de terminación TGA en el exón 6B a 51 nt de su inicio, de modo que el resto del exón 6B (342 nt), el exón 6C, 7 y 8 formarían parte de la región no traducida 3' (3'UTR).

Por último, la isoforma C contiene al exón 1, 2, 3, 5, 6A, 6C, 7 y 8.

1. 4. Estructura génica de *EgTrp*

En forma paralela a la búsqueda de isoformas se determina el patrón exón-intrón del gen *EgTrp*, mediante PCR a partir de ADN genómico (ADNg), con distintas combinaciones de cebadores directos y reversos de cada exón. La figura 17 muestra los cebadores utilizados en esta serie de reacciones y la ubicación de los mismos en los exones correspondientes, según determináramos en la serie de ensayos ya comentados (sección 1.3.). Se interpreta como exón toda región génica coincidente con la secuencia de ADNc de las isoformas de *EgTrp* y como intrón las zonas interpuestas no coincidentes.

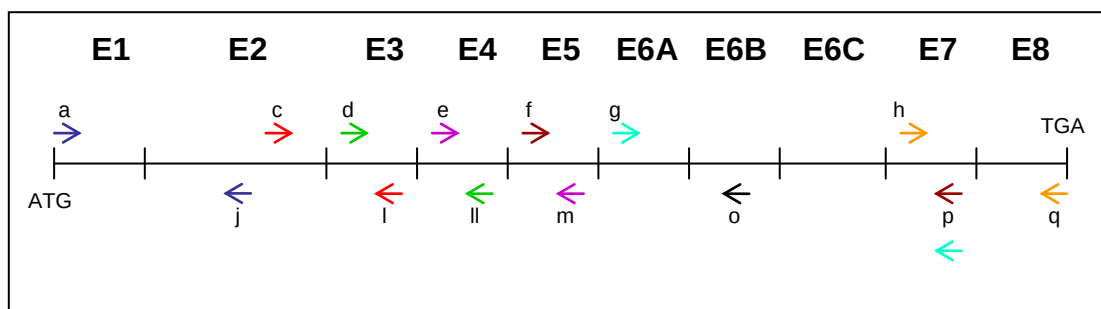


Figura 17. Determinación del patrón exón-intrón de *EgTrp*.

Esquema mostrando los cebadores utilizados para la determinación del patrón exón-intrón y la ubicación final de los exones determinados. Los cebadores se representan como flechas, las del mismo color se usan en la misma PCR, la flecha negra se utiliza sólo para secuenciación. Nombre de cebadores: a - Df5nt directo, b - NDWDf5, c - ESLQDf5, d - AMTRf, e - ETRSf, f - LAVTf, g - EVSEf, h - QRAADf5, j - QTEVDf5rev, l - EQSSrev, ll - 90Rev-Df5, m - 201Rev-Df5, o - Df5ex7Brev, p - RQVSrev, q - Df5ct reverso.

Los productos de PCR menores a 900 pb son purificados del gel y sus dos hebras son secuenciadas directamente. Aquellos con masas moleculares mayores, en algunos casos son clonados en el vector pGEM-T-Easy para ser secuenciados utilizando un cebador interno de un intrón o exón y lograr secuenciarlo en su totalidad. En la mayoría de los casos se obtienen productos de PCR únicos o con pocas bandas de ADN amplificadas inespecíficamente.

En todos los casos se utiliza entre 26 ng y 50 ng de ADNg de protoescólices como molde, y el tiempo de extensión de los ciclos varía entre 1 y 2 minutos. El intrón contenido entre los

exones 1 y 2, llamado de aquí en más intrón I, se amplifica usando los cebadores Df5 nt directo (a) y QTEVDf5rev (j), y una temperatura de hibridización de 57°C. Se obtiene un único producto de PCR de 900pb aproximadamente (figura 18).

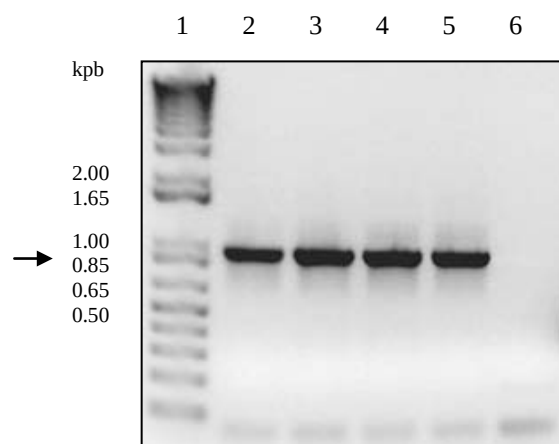


Figura 18. Determinación del intrón I.
Electroforesis en agarosa 1.2%, tinción con Bet.

1) marcador de peso molecular *1 kb Plus DNA ladder* (Invitrogen), 2-5) productos de PCR de ADN_g usando los cebadores a y j; 6) control negativo. La flecha indica el producto de PCR secuenciado.

El intrón contenido entre el exón 2 y 3 (intrón II) es amplificado utilizando 58°C como temperatura de hibridización y los cebadores ESLQDf5 (c) y EQSSrev (l). El producto de PCR es un único fragmento de ADN de alrededor de 900pb (figura 19).

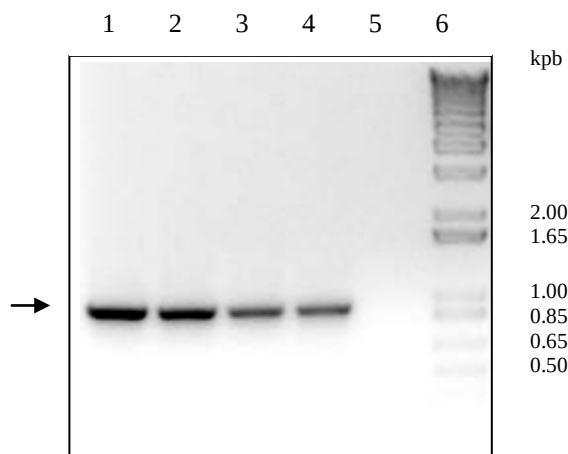


Figura 19. Determinación del intrón II.
Electroforesis en agarosa 1%, teñida con Bet.

1-4) productos de PCR de ADN_g desde el exón 2 al 3, usando los cebadores c y l; 6) marcador de peso molecular *1kb Plus DNA ladder* (Invitrogen); 5) control negativo. La flecha indica el producto de PCR secuenciado.

La figura 20 muestra los productos de PCR correspondientes al intrón III (500pb), contenido entre el exón 3 y el 4, cuando se utilizan los cebadores AMTRf (d) y 90Rev-Df5

(II); y al intrón IV (380 pb), contenido entre el exón 4 y el 5, usándose los cebadores ETRSf (e) y 201Rev-Df5 (m). Cuando se utiliza el cebador EVSEf (g) y RQVSrev (p) se obtienen 2 fragmentos de ADN, uno de 1200pb y otro más débil de 600 pb aproximadamente. La banda más grande corresponde al exón6(exón6A-exón6B-exón6C)-intrónVI-exón 7. La banda menor se purifica, reamplifica y secuencia, resultando ser una amplificación inespecífica. Por lo tanto, entre el exón 6A y 6B, y entre el exón 6B y 6C no existirían intrones; mientras que entre los exones 6C y 7 está presente el intrón VI. En estas tres reacciones de PCR la temperatura de hibridización es de 56°C.

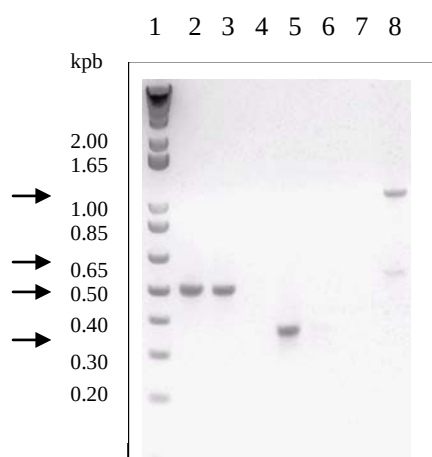


Figura 20. Determinación de los intrones III, IV, y VI. Electroforesis en agarosa 2%, teñida con Bet.

1) marcador de peso molecular *1 kb Plus DNA ladder*; 2 y 3) productos de PCR de ADN_g usando los cebadores d y II; 4) control negativo de la PCR 2 y 3; 5) producto de PCR de ADN_g utilizando los cebadores e y m; 6) control negativo de la PCR 5; 7) control negativo de la PCR 8; 8) producto de PCR de ADN_g usando los cebadores g y p. Las flechas indican la posición de los productos de PCR obtenidos

En la figura 21 se observa un único fragmento de ADN de 2000pb, producto de la PCR con los cebadores LAVTf (f) y RQVSrev (p) y con una temperatura de hibridización de 55°C. Este fragmento corresponde al exón5-intrónV-exón6(E6A-E6B-E6C)-intrónVI-exón7, y para secuenciarlo totalmente fueron necesarios los cebadores Df5int6-7A (intrón V directo) y Df5ex7Brev (o).

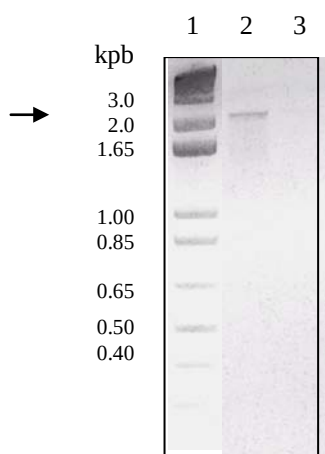


Figura 21. Determinación de intrón V y VI.

Electroforesis en agarosa 2%, teñida con Bet.

1) marcador de peso molecular *1 kb Plus DNA ladder*; 2) producto de PCR de ADN_g desde exón 5 al exón 7 usando los cebadores f y p; 3) control negativo. La flecha indica el producto de PCR secuenciado.

El intrón VII flanqueado por el exón 7 y el 8, es amplificado utilizando los cebadores QRAADf5 (h) y Df5 ct reverso (r), empleando 57°C como temperatura de hibridización de los cebadores. Se obtiene un único producto de 1300 pb aproximadamente (figura 22). Luego de ser clonado en el vector pGEM-T-Easy es secuenciado con los cebadores del plásmido y con CGADf5sec (intrón VII directo).

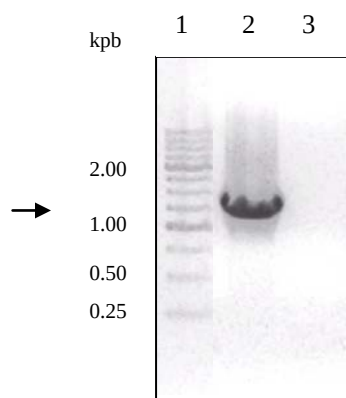


Figura 22. Determinación del intrón VII.

Electroforesis en agarosa 0.8%, teñida con Bet.

1) marcador de peso molecular *Marker XVI 250pb* (Roche); 2) producto de PCR de ADN_g desde exón 7 hasta exón 8, usando los cebadores h y r; 3) control negativo. La flecha indica el producto de PCR secuenciado.

Se analizan las secuencias obtenidas lográndose solapamientos perfectos entre ellas, y se construye el patrón exón-intrón del gen *EgTrp* de *Echinococcus granulosus* de 5674 pb. En la figura 23 se muestra un esquema de esta estructura.

De acuerdo a este análisis, este gen contiene 10 exones: E1 de por lo menos 62 pb, E2 de 178 pb, E3 de 134 pb, E4 de 118 pb, E5 de 71 pb, E6A de 76 pb, E6B de 396 pb, E6C de 63 pb, E7 de 70 pb y E8 de por lo menos 83 pb; y siete intrones: I de 777 pb, II de 800 pb, III de 339 pb, IV de 224 pb, V de 591 pb, VI de 528 pb, VII de 1169 pb. Se encuentra un codón de iniciación ATG (primer codón de E1) y dos de terminación (TGA), uno de ellos dentro del exón 6B a 51 pb de su inicio (17 AA) y el otro en el exón 8. Los exones 6A, 6B y 6C son consecutivos, no encontrándose secuencias intrónicas entre ellos. El segundo codón de terminación es el último codón del exón 8.

Dado que no hemos secuenciado río arriba del codón de iniciación ni río abajo del último codón de terminación, no podemos definir exactamente el tamaño del exón 1 y del exón 8. La secuencia determinada del gen, de 5674 pb, se muestra en la figura 24.

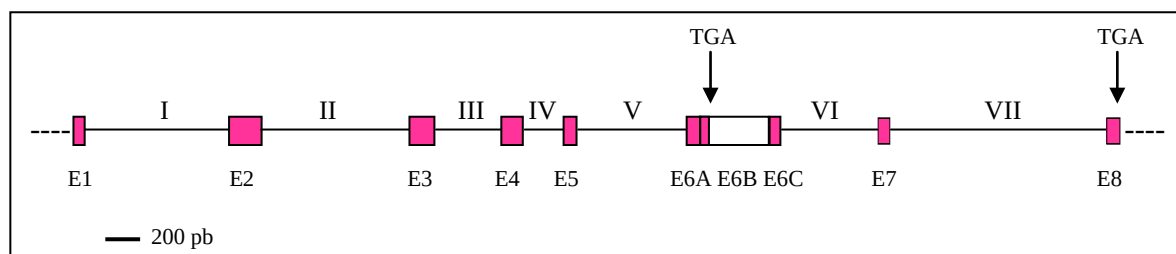


Figura 23. Esquema de la estructura génica de *EgTrp*. Los rectángulos corresponden a exones y las líneas llenas indican intrones. El rectángulo no coloreado representa secuencia exónica no traducida. La línea punteada indica secuencia desconocida. Se señalan los dos codones de terminación presentes en el marco de lectura codificante.

Se realiza el análisis de los sitios con alta probabilidad de corresponder a sitios de corte y empalme. Todos los intrones que hemos determinado contienen los sitios dador GT y aceptor AG característicos de este tipo de procesamiento (figura 24). Además, en la mayoría de los casos los sitios dadores, que corresponden al extremo 5' del intrón, se encuentran en un contexto consenso según la predicción de sitios de procesamiento utilizando el análisis del genoma de *Drosophila melanogaster* (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html). La única excepción se observa en el sitio

dador del intrón IV ubicado en la base 2404 respecto al A del ATG (posición +1 en figura 24).

Las regiones aceptoras ubicadas en los extremos 3' de los intrones presentan regiones típicas de polipirimidinas de distinta extensión, río arriba del sitio AG. En particular en el intrón II y el intrón VII, los sitios aceptores se encuentran dentro de una secuencia consenso (ver figura 24).

Finalmente, también se encuentran las secuencias conservadas asociadas con el salto de exones en el procesamiento alternativo del transcrito primario (Miriami y cols., 2003). Estas secuencias consisten en motivos ricos en C ubicados río arriba del extremo 3' del intrón precedente al exón que salta, y en secuencias ricas en G ubicadas río abajo del extremo 5' del intrón posterior. Estos motivos consisten en 20 pb aproximadamente, y los motivos ricos en C en general no se solapan con los tractos de polipirimidinas. En la figura 24 se muestran estos dos tipos de motivos existiendo diferencias de 2 a 4 bases con las secuencias consenso registradas. Miriami y colaboradores sugieren que estos dos motivos podrían interaccionar formando pares de bases mediante complementaridad, esto podría conducir a un mecanismo que involucre una estructura secundaria para regular el salto de exones (Miriami y cols., 2003).



 ----- ATG GAT TCC ATC AAA AAG ATT ATG ATG GCA

30 ATG AAA TTG GAG AAA GAA AAT GCA TTG GAA AA gtaagtcattttattgcagttagt
 153 ttgattgaacttctatgcgctccagtagacgctgagggcgaaaatattaccttcttaacactagcg
 287 aatttcagtgagagactacgaccgccttagtcttcaaaagagaatatatcatccaatttcagaaaga
 421 atcgtagcaacatctgagccttgcagtttaggaaggtatctttacaatgaaccggttaagctttcg
 555 atagagtgggtctccacacgcctaacaatgattgtgtgaaataggttttgactgctttaaaaagca
 689 caaaatgactatTTTTTgtggtatgaaatccaataagcattgcgtattaggttttacttaagcata
 823 ttataaattgggtggctaaattacaacgcttgtggtggttattacggcaacgatctaagctcaagat
 926 ttaaattattccatcaagaaatcgaaattcaccaagaaattacatgactaaaaattccgaattacttc
 1032 accgcttatcaaattgagcgaataagcttaaaagcttgcgtgatgtagagatcagatacattttattg
 1166 taaatctacaacattaggaagaaatagtataccaatacataagtggccttatgaagtgataggaat
 1300 gcacgaattaaagggcatatattcagcaggtggttttgcgacatttaaaggcatccataaggaatcta
 1434 gtggattcagtcgcgcgatattcttaattgggtgcaatggatagatgatgatgttgatgcggcaca
 1568 cttttttgaag G GCC ATA AAT CTC GAA AAT CAA CTC AAG GAG AAG GCC AAA
 1702 GAT TTT GAG AAG AAA GAA GAA GAG ATG AAT GAC TGG CTC TCT AAA GTG AAG
 1828 AAC ATT GAG ACT GAA GTA GAC ACC GTA CAA GAG TCT CTC CAG GAA GCG ATT
 1930 AGC AAA CTC GAA GAA ACC GAG AAG CGT GCG ACA AAC gtgagttgattgtgcttag
 2059 aataaccgtgtagaggcacctagagagctcacttgcgactaccacgttacttattgctatggaataa
 2193 gtcactctattttcgtaaaatatgttttagtccacatcaaaatggctctattttaaataatcagagttt
 2316 ggtattaagacggtttgcgtcagtaaaattttagaacttggattgtacttttctaaatgttgaacac
 2422 tcattccaataacaatgaaaaatcggaattacttttaataagttctaaagtgaatattggtatggt
 2556 agtgggtgcacatgagacgtgaatgcacggtagttgtcaaaaagattccgcgccccaaactcaaacacg
 2672 ggctttggattaatgttcaaaatctatgtaaacctggaaagaatacagtatgccttaattataat
 2797 gcttagtaaaaacgacatttgggtggcgatggcctctttgttttaagtcaacaatctagttactgtgcaa
 2931 aacaatctctggtaatggatttgccttctggtattgatacgggtcaaaagcaagatatctgcgatgat
 3065 tcagaagaaagaacatttggaaaggagattgcactcaaaatggacgcgattgatagcgagcgccgc
 3199 aaaaaggaggccgtaattttagcatagtagttgtctgatggattgttttttactacaaaatgcttaa
 3320 cacttgtgtcatttcccatgacgatttggagtcgagtccttttttaagttagtttagtagggtctgc
 3419 ccaaaattcggattatagtgtttaacttctgtcttctccgtag GCC GAA GCC GAA GTT
 GCT GCT ATG ACC CGT CGC ATT CGG CTT TTG GAG GAA GAT TTT GAA CAG TCT
 AGT GGC CGT CTT ACT GAA ACA TCT ACT AAG CTT GAC GAT GCT AGC AAA GCT
 GCT GAG GAG AGC GAA gtattgcctgtgctattgagtgcttcatattgtaatctgctgcatat
 ttgcatgctttgttatgtcatctgcatgtatttagtgacgctggcggttaataatcaacaaggcg
 ctgatgagatgaaaattactgagttagaacgctctatttaggctgcatccttggctactcaggaatc
 tgtgtggaaatatgaggaggtattttgtggctttaaagccatttgcattctctctgtgtgtcactgtca
 ttaagctgtggtctgtctatagcgtgaaagaatatagcagtttaattcaaaataatagtgttacctaa
 tccaataactgatcgcccggtgcag AGG AAT CGA AAA ACC CTT GAG ACC AGG TCT ATT
 TCT GAC GAT GAA CGA ATG GCC CAA CTA GAA GAA CAG GTA AAG GAG GCG AAG
 TAC ATC GCT GAA GAT GCC GAA CGG AAA TAC GAT GAA gtcaagtagacttattttt
 gctcatttctggaaatcaatctgctaggattgggtgtcttaaatgtgcggtttcttgattttataagt
 cctccgactcatgttagtaaatatattttacgcctgtcttaattatttttgcaattccaggggact
 agaccacattagattctgttgcgggttctcctaattctgtggaccacattattgaaatattatgtcg
 tcag GCT GCT CGC CGC TTG GCA GTG ACC GAG GTC GAC TTG GAG CGA GCG
 GAG TCT CGT TTG GAA ACC TCG GAG AG gtaacctcgaaggcaacgcaaccacttgacg
 gtctttttaccggtctcctgcacgcgcatttgtttttctctattatcggttcagcaggttgacgaat
 cttaatagcatgcctgtcatctttctccttactctttggcattgaagacaatgaagaggattattgc
 tgctcagcaaaacttttagctaccgcagaggagaaggcacaacaattgaggtgtgagttgccaaaaat
 tgtagcagagacgaatttcagaccgggttttgatgcattagtttacttttcacggttgacgctggcc
 aaaactgcccgtagtagccattatacttaagaattgtctatcgctcgagggtatggagaatttaaagg
 aatttgcctgcccacatttgggtacttccggttttagctgcgcaaaaacttggaggatcggttgg
 ctgctgtcgtgcgcaaaattgaaagccaaagaattgcacacgataaggtgatgcgctgtgttcttt
 tttgctttatgtctgccttgaatgcatggataccaaatcgtccccgaccttagtttacacaaaact
 caagcagcagtaatgacttttag C AAA ATC GTT GAA CTT GAG GAA GAA CTG CGC
 3320 ATT GTT GGT AAC AAC ATG AAA TCT CTC GAA GTC TCC GAG CAA GAG GTA ATA
 GTT CAA TTA GTG ACT AGC GAT ACA AGA AGT AAC AAT GCC TAT ACA TGA
 3419 TTTCAAGCTTTAGGACGTGGCGAAATTTCTTATGAACATAGAATAAGGATTTGCATACATTATTGGG

1. 5. Hibridización sobre amplificaciones de ADNg

Se realiza un experimento de hibridización a partir de productos de PCR de ADNg, para determinar si las isoformas reportadas provienen de un gen único de tropomiosina en *Echinococcus granulosus*. Debido a la escasez de material parasitario (PE) no se realiza el experimento clásico de *Southern Blot* en donde se analiza ADNg digerido con enzimas de restricción, ya que se utiliza como molde de hibridización productos de PCR de la región 5' del gen *EgTrp*.

De esta manera se amplifica ADNg desde el exón 1 al 4 usando los cebadores Df5 nt directo (a) y 90Rev-Df5(l); y desde el exón 1 al 5 usando los cebadores Df5 nt directo (a) y 201Rev-Df5 (m). Esta última región fue seleccionada dado que genera formas en las que el intrón 4 salta. De no mediar un procesamiento alternativo debería detectarse 2 genes diferentes para la codificación de estas 2 formas, estas regiones se diferenciarían en 118 pb (tamaño del exón 4) por lo menos. Cuando se amplifica desde el exón 1 al 4 se espera un único producto de PCR ya sea que exista uno o más genes que codifican para la tropomiosina, ya que sólo se amplificaría el gen que contenga al exón 4.

Se utiliza como control positivo del ensayo de hibridización, el producto de PCR de ADNc desde el exón 1 al 8. En todas las reacciones se usa 57°C como temperatura de hibridización de los cebadores. La sonda utilizada marcada con ³²P, corresponde a la secuencia codificante de *EgTrp* desde el exón 1 al 8 (850 pb aprox.), clonada en el plásmido pGEM.

La figura 25B muestra el resultado de este experimento a partir del gel de la figura 25A. En el carril 3 se observa una banda de ADN mayoritaria de 850 pb aprox. y algunas otras bandas más débiles principalmente de mayor tamaño que pueden corresponder a otras isoformas de tropomiosina. Esto indica que la sonda se marca correctamente y que identifica a la tropomiosina.

En el carril 4 y 5 se marca 1 sola banda de ADN, si bien los tamaños no se discriminan bien debido a la distancia migrada por el alto porcentaje de agarosa del gel, podemos afirmar que la banda del carril 5 es de mayor tamaño que la del 4. Aunque amplifican otras bandas menores en estas 2 PCRs, éstas parecen ser inespecíficas ya que no se marcan con la sonda radioactiva. Posteriormente se corre el producto de PCR del carril

5 en un gel de agarosa al 1%, corroborando la existencia de una sola banda a la altura del fragmento de ADN marcado radioactivamente en este experimento (no se muestra). Estos resultados nos sugieren que existe un único gen de tropomiosina en *Echinococcus granulosus*.

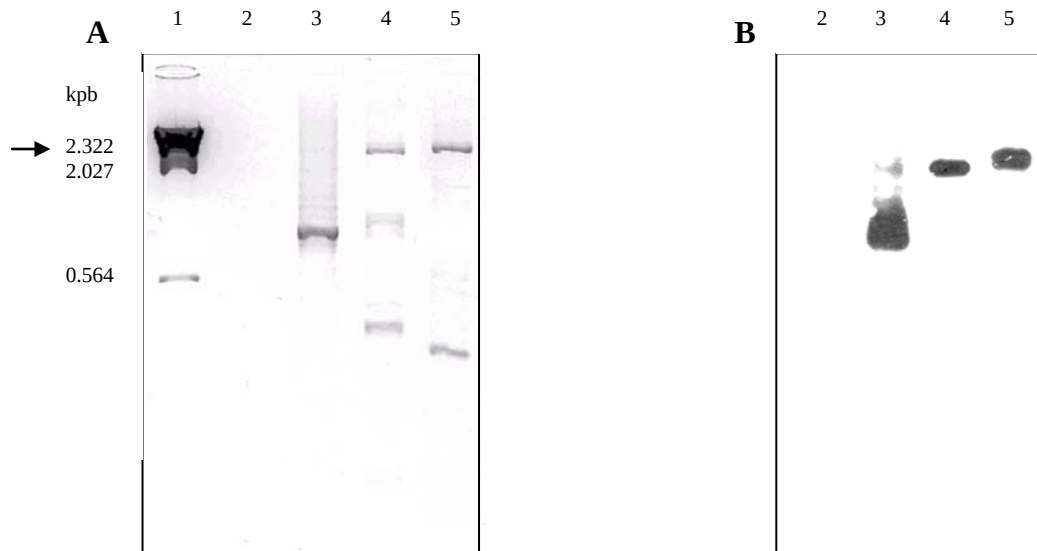


Figura 25. Hibridización sobre amplificaciones de ADNg. A) Electroforesis en agarosa 2 %, teñida con Bet; B) autoradiografía del gel (figura A) transferido y hibridizado con la región codificante de *EgTrp* desde el exón 1 al 8 marcada con ^{32}P .

1) marcador de peso molecular λHind (Amersham); 2) control negativo de PCR de carril 3; 3) producto de PCR de ADNc desde el exón 1 al 8; 4) producto de PCR de ADNg desde el exón 1 al 4; 5) producto de PCR de ADNg desde el exón 1 al 5.

Finalmente, en la figura 26 se muestra un esquema de la estructura génica de *EgTrp* y las isoformas que surgen de este gen, mediante el procesamiento alternativo del transcrito primario.

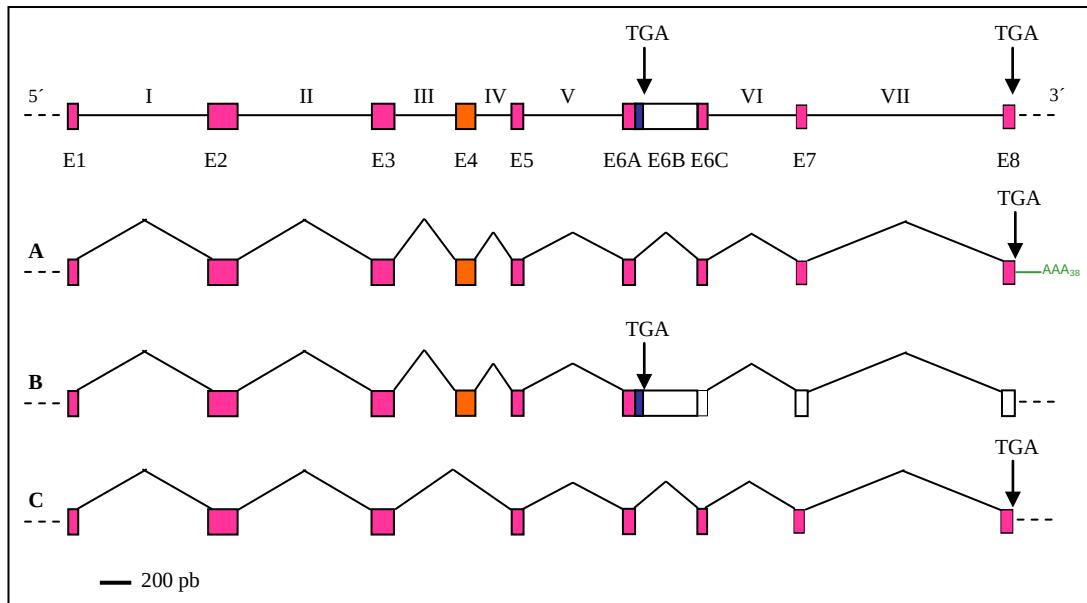


Figura 26. Esquema del gen *EgTrp* y sus isoformas. Debajo del mapa del gen se muestra el mapa de los transcritos de ARNm (A, B, C). Los rectángulos corresponden a exones y las líneas llenas indican intrones. Los rectángulos blancos representan secuencia exónica no traducida. Los rectángulos de color naranja y azul indican a los exones que sufren saltos alternativos. La línea verde corresponde a secuencia 3' no traducida incluyendo la cola poliA. La línea punteada indica secuencia desconocida. Se señalan los codones de terminación.

1. 6. Estudios de expresión

1. 6. 1. *Western Blot* y análisis de la masa molecular

Abordamos el análisis de la expresión de las posibles isoformas a nivel proteico mediante *Western Blot* (WB) a partir del extracto proteico total de protoescólices, utilizando un suero generado contra tropomiosina recombinante de *E. granulosus*. Esta proteína recombinante, a la que le faltan 107 AA del extremo N-terminal, presenta una fusión N-terminal de 6 histidinas. En la figura 27 se muestra un WB a partir de una electroforesis desnaturalizante en poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%.

En el carril 1 se observa una banda correspondiente al control positivo del reconocimiento de la proteína recombinante por el suero, dicha banda presenta una masa molecular aparente de 27500 Da aproximadamente. El suero reconoce en el extracto total de proteínas tres bandas que podrían representar a tres isoformas de la proteína, una de ellas mayoritaria, siendo sus masas moleculares aparentes de 41500 Da, 37500 Da y 31000 Da. La proteína recombinante utilizada para generar el suero en conejo, cuando es sometida a SDS-PAGE presenta una masa mayor a la masa molecular teórica según su secuencia de AA de 22500 Da, por este motivo la proteína purificada fue sometida a espectrometría de masa MALDI-TOF en la Unidad de Bioquímica Analítica del IIBCE, obteniéndose una masa molecular real de 22500 Da. Esto comprueba que su migración en el SDS-PAGE no corresponde exactamente con su masa molecular real.

Las masas moleculares teóricas calculadas a partir de las secuencias de ADN de las posibles isoformas encontradas son: 32975 Da para la isoforma mayoritaria A de 284 AA, 26500 Da para la isoforma B de 230 AA, y 28147 Da para la isoforma C de 244 AA. Si bien estas masas no coinciden con las obtenidas a partir del WB sugerimos que la isoforma A correspondería a la banda de 37500 Da ya que es la más abundante y presenta aproximadamente la misma diferencia de tamaño que existe entre la masa molecular teórica y aparente de la proteína recombinante (5000 Da). La banda inferior de 31000 Da podría corresponder a la isoforma B de masa teórica igual a 26500 Da ya que la diferencia entre estos tamaños es de 4500 Da.

Las diferencias de masa molecular entre la masa aparente de las bandas del *Western Blot* (calculada mediante comparación con el marcador de tamaño preteñido) y la masa

teórica que surge de la secuencia aminoacídica puede deberse a los marcadores preteñidos, ya que estos sirven para la determinación de las masa moleculares aproximadas. La unión de cromóforos a las proteínas del marcador de tamaño afecta la masa molecular aparente en una SDS-PAGE, aunque luego cada marcador es calibrado contra proteínas estándares no teñidas y se reporta la masa molecular aparente (información del fabricante Gibco).

La banda superior (41500 Da) podría corresponder a una isoforma no identificada aún. No se observa una banda de masa molecular aparente aproximada de 33000 Da, que podría corresponderse con la isoforma C.

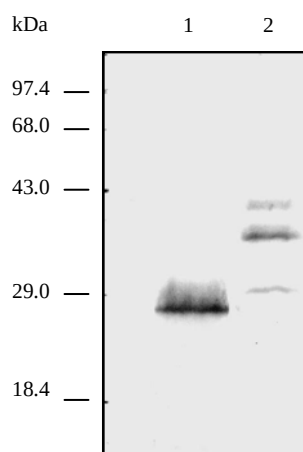


Figura 27. Western Blot a partir de SDS-PAGE 12% y usando Ac α -EgTrp recombinante diluido 1/1000. Se revela mediante un conjugado a fosfatasa alcalina.

1) 2.5 μ g EgTrp recombinante; 2) 50 μ g de extracto proteico total de PE.

Se utiliza como marcador de masa molecular *Prestained Protein Molecular Weight Standard, High Range* (Gibco).

1. 6. 2. Localización de la expresión de *EgTrp*

Imunohistoquímicas

Realizamos estudios de localización de la expresión de la proteína mediante inmunohistoquímicas e inmunolocalización *in toto* empleando un suero elaborado en conejo a partir de la proteína recombinante expresada en el vector pQE11. Dicha proteína, truncada en el extremo 5', se expresa como una fusión N-terminal a 6 histidinas, y corresponde a la isoforma A. El mismo suero fue utilizado en el experimento anterior de *Western Blot*.

Ensayos de inmunohistoquímica similares ya habían sido realizados por Esteves y cols. (2003), pero en esta oportunidad se utilizó otro suero, por lo tanto este ensayo nos confirmó el patrón de expresión ya observado y nos sirvió para testear el suero nuevo.

En la figura 28 se muestra el análisis inmunohistoquímico sobre secciones de protoescolices (PE), usando el suero diluido 1/1000 y revelado con un conjugado a fosfatasa alcalina. En todos los casos se observan PE maduros cuyo tamaño oscila entre 100 y 200 μm de diámetro. Las microfotografías D y E corresponden a controles sin suero. Sería necesaria la realización de controles con suero de conejo pre-inmune. Tanto en A, como en B y C se aprecia la localización de la señal a nivel de las ventosas de PE, pero también se observa una señal más tenue y ubicua.

No se detecta señal en la capa germinativa (CG) ni en la laminar (CL) (figura 28 C). Este resultado apoya los estudios previos ya mencionados, según los cuales *EgTrp* es un gen de expresión diferencial, expresándose en PEs y no en la capa germinativa (Esteves y cols., 2003).

En los controles sin suero se aprecia claramente la ausencia de señal, verificándose así que el anticuerpo secundario anti-IgG total de conejo usado en las condiciones de este ensayo, no reconoce ninguna proteína de PEs y que no se observa señal de fosfatasa alcalina endógena del parásito.

Inmunolocalización *in toto*.

Con el fin de complementar la información de la localización de la expresión de las tropomiosinas de *E. granulosus*, se ubica espacialmente la expresión en protoescolices enteros mediante ensayos de inmunolocalizaciones *in toto*. Se utiliza el suero anti-EgTrp diluido 1/1000 y el revelado se lleva a cabo con un conjugado a la fosfatasa alcalina. La figura 29 muestra nuestros resultados. Los PE de las micrografías A, B, y C, se encuentran evaginados, mientras que en la D y la E se muestran PE invaginados. En A, B, y C se observa una fuerte señal en la región apical correspondiente al rostelo y las ventosas (escolex), y en la región caudal donde se encuentra la zona peduncular. El cuerpo o soma basal al escolex presenta una señal más débil.

En D y E se visualiza la señal en la región caudal con esbozos del pedúnculo. Los PEs se unen a la capa germinativa mediante el pedúnculo y luego éste desaparece.

Por otro lado no se observa señal a nivel de las ventosas (región apical). En E se aprecia tinción más tenue a nivel del tegumento apical en la zona del opérculo. Sin embargo en D no se detecta ninguna señal apical.

Hibridización *in situ*

Finalmente nos interesó determinar el patrón de expresión génica a nivel del ARNm. Con este fin realizamos experimentos de hibridización *in situ* sobre cortes de protoescólices que se muestran en la figura 30. Utilizamos como sonda ARNm antisentido de la isoforma A completa del gen *EgTrp*, marcado con digoxigenina (DIG-UTP). El revelado ocurre con un conjugado a fosfatasa alcalina. En las micrografías A (aumento 100X), B (aumento 100X) y C (aumento 40X), se aprecia señal a nivel de las ventosas y una señal más débil, y generalizada en el resto del PE. También se observa que la capa laminar no presentan señal, sin embargo la capa germinativa presenta pequeños puntos que podrían corresponder a primordios de protoescólex.

La micrografía D (aumento 100X) representa al control positivo de la técnica donde se utiliza la ribosonda del gen *EgHox5* marcada con digoxigenina, este es un gen con *homeobox* tipo *Hox* de *E. granulosus* (Lalanne, 2003). Se aprecia la expresión ubicua de *EgHox5* en los PE, este es un patrón de expresión de ARNm diferente al observado para *EgTrp*.

2. Expresión de antígenos recombinantes de *E. granulosus* en cepas vacunales de *Salmonella* y en el virus vaccinia (MVA)

2. 1. Expresión de EgTrp y EgFABP2 en cepas atenuadas de *Salmonella*

2. 1. 1. Clonado de EgTrp y EgFABP2 en el plásmido pTECH2

Con el objetivo de expresar las secuencias codificantes de los genes *EgTrp* (secuencia truncada) y *EgFABP2* en cepas atenuadas vacunales de *Salmonella*, se procedió a clonar estos genes en el vector de expresión pTECH2. En este sistema de expresión, la proteína recombinante se expresa como una fusión C-terminal al fragmento TetC de la toxina del tétanos.

Si bien este trabajo se ha centrado en el gen *EgTrp*, en esta etapa incorporamos al gen *EgFABP2* debido a su relevancia como candidato vacunal. El gen *EgFABP2* fue aislado a partir del rastreo de una librería genómica de *E. granulosus* utilizando como sonda la secuencia codificante de *EgFABP1* (Esteves y cols., 2003a). EgFABP1 es una proteína de unión a ácidos grasos de *E. granulosus* que presenta una alta identidad con EgFABP2. La secuencia codificante de *EgFABP2* de 410 pb está completa y fue clonada en el plásmido pET-5a para la producción de la proteína recombinante.

En primer término, se amplifica la secuencia codificante *EgFABP2* desde el codón de inicio hasta el codón de terminación, mediante PCR tomando como molde el clon pET-*EgFABP2* y utilizando iniciadores específicos conteniendo los sitios de clonado BamHI y HindIII. La misma estrategia se utilizó para amplificar al gen *EgTrp* utilizando pQE11-*EgTrp* como molde e iniciadores específicos conteniendo los mismos sitios de restricción. Recuérdese que el clon pQE11-*EgTrp* contiene la secuencia codificante de EgTrp truncada, amplificándose desde el aminoácido número 108 hasta el codón stop.

La figura 31 muestra los productos de PCR obtenidos. Se observa una banda de 410 pb correspondiente a *EgFABP2*, y una banda de 550 pb producto de la amplificación de *EgTrp*.

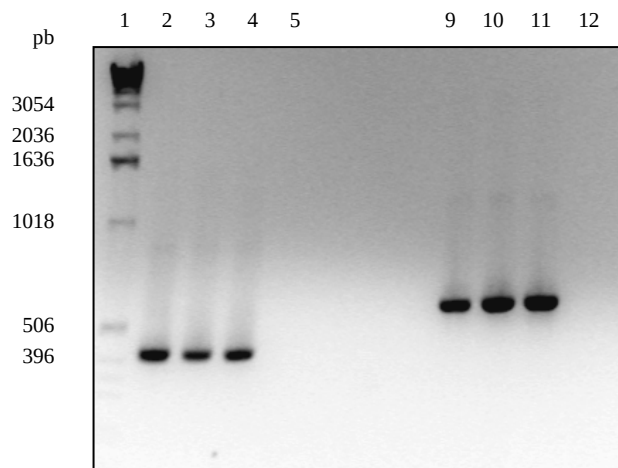


Figura 31. Amplificación de *EgTrp* y *EgFABP2* para clonado en pTECH2. Electroforesis en agarosa 2% teñida con Bet.

Se muestran los productos de PCR usando pET-*EgFABP2* (2-4) y pQE-*EgTrp* (9-11) como molde e iniciadores específicos para cada caso. Controles negativos (5 y 12). Marcador de tamaño 1 kb *DNA ladder* (Gibco) (1). Las flechas indican los productos de PCR obtenidos.

Los fragmentos amplificados son purificados, clonados en el plásmido pTECH2 y transformados en *E. coli*. Posteriormente, se realizan transformaciones químicas de la cepa SL5338 de *Salmonella* con el plásmido recombinante para favorecer la estabilidad y expresión proteica, ya que ésta cepa presenta características intermedias entre *E. coli* y *Salmonella* facilitando la transición gradual entre ambas bacterias. Se seleccionan y confirman 2 clones recombinantes de cada tipo (SL5338-pTECH2/*EgFABP2* y SL5338-pTECH2/*EgTrp*), mediante PCR y secuenciación.

Los clones recombinantes SL5338-pTECH2/*EgTrp* seleccionados presentan una mutación en una base que cambia el aminoácido 34. El codón ATG (M) cambia por AAG (K), de manera que la secuencia aminoacídica original "DERMA" de ahora en adelante será "DERKA". El aminoácido cambiado coincide con el aminoácido número 141 de la secuencia codificante completa (ver figura 7 y 8).

2. 1. 2. Expresión de los antígenos recombinantes en cepas de *Salmonella*

Posteriormente se analiza la expresión de las proteínas recombinantes, mediante *Western Blot* utilizando lisados de las colonias recombinantes seleccionadas y sueros contra TetC y contra GST*EgFABP1*; éste último suero reconoce también a la proteína homóloga *EgFABP2*.

En la figura 32A carril 1, se observa una banda nítida y fuerte de 50 kDa correspondiente a la proteína TetC, mientras que en los carriles 2 y 3 se aprecia una banda superior de 64.5 kDa correspondiente a la proteína de fusión TetC-*EgFABP2* de

acuerdo a su masa molecular, y tres bandas menores pero mayores de 50 kDa que serían productos de degradación por proteasas bacterianas o proteínas de fusión truncadas. Podría ocurrir la síntesis incompleta de la proteína de fusión debida tal vez a la presencia de una región bisagra después del TetC (región descrita en la discusión). En la figura 32B claramente se observa dos bandas, una de 77.5 kDa correspondería a la proteína de fusión TetC-EgTrp, y la banda inferior puede deberse al mismo fenómeno mencionado anteriormente.

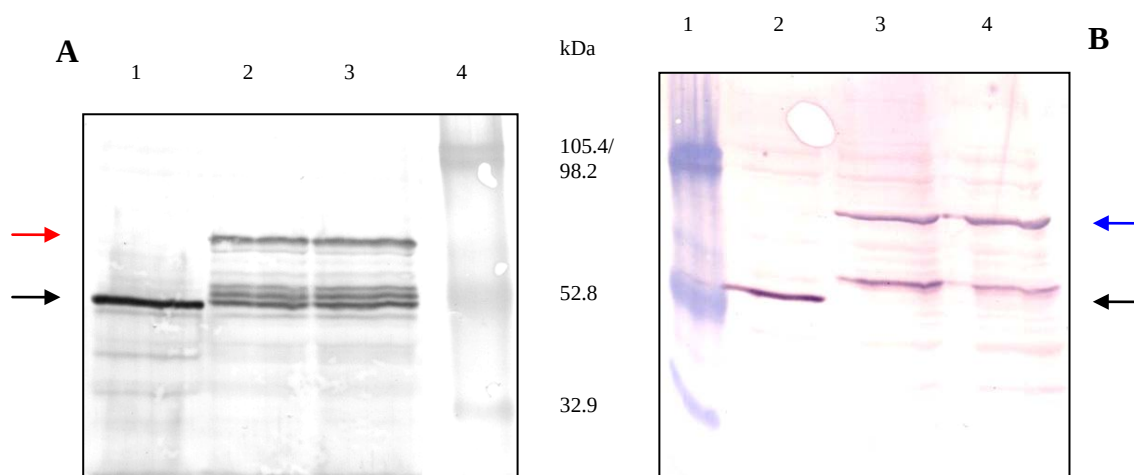


Figura 32. Western Blot de lisados bacterianos de los clones SL5338 recombinantes, a partir de SDS-PAGE en acrilamida 12%, utilizando suero anti-TetC, y revelado con un conjugado a fosfatasa alcalina. La flecha roja indica la proteína de fusión TetC-EgFABP2, la flecha azul representa a la proteína de fusión TetC-EgTrp, y la negra corresponde a la proteína TetC.

A) 1) lisado de SL5338-pTECH2; 2 y 3) lisado de dos colonias seleccionadas de SL5338-pTECH2/EgFABP2; 4) marcador de masa molecular preteñido *BDH Laboratory Supplies Electran*.
B) 1) marcador de masa molecular preteñido *BDH Laboratory Supplies Electran*; 2) lisado de SL5338-pTECH2; 3 y 4) lisado de dos colonias seleccionadas de SL5338-pTECH2/EgTrp.

Luego de transducir varias cepas vacunales de *Salmonella* disponibles (C5aroD, SL3261, Se795aroA, BRD726, C5htrA, LVR01), se realizan ensayos de Western Blot para corroborar la expresión de las proteínas de fusión en las colonias recombinantes. Se obtienen varias cepas recombinantes de *Salmonella* para poder elegir aquellas que logren expresar mejor al antígeno recombinante.

Las figuras 33 A, B y C muestran tres análisis por Western Blot de las cepas recombinantes de *Salmonella* que expresan a TetC-EgFABP2, utilizando los suero anti-TetC y anti-GSTegFABP1. También se observan posibles productos de degradación de la proteína de fusión al igual que en las bacterias SL5338.

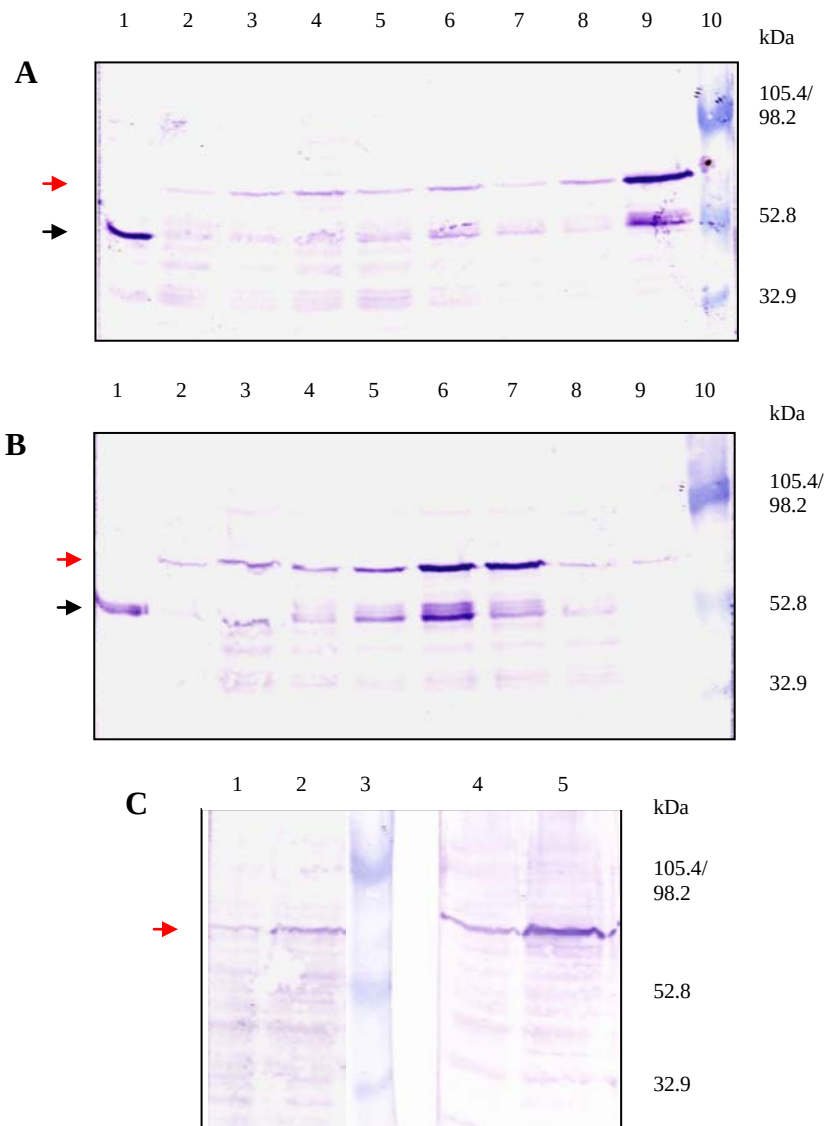


Figura 33. Western Blot de lisados de diferentes cepas de *Salmonella* recombinantes que expresan TetC-EgFABP2, a partir de SDS-PAGE en acrilamida 12%. Se utiliza suero anti-TetC (A, B y carril 1 y 2 de C) y anti-GSTegFABP1 (carril 4 y 5 de C), se revela con un conjugado a fosfatasa alcalina. La flecha roja indica la proteína de fusión TetC-EgFABP2, y la negra corresponde a la proteína TetC. En todos los casos se siembran muestras proteicas provenientes de cantidades equivalentes de cultivo.

A) 1) 163 ng de proteína TetC recombinante; 2) lisado de colonia BRD726-pTECH2/EgFABP2; 3-5) lisados de 3 colonias diferentes de C5aroD-pTECH2/EgFABP2; 6-9) lisados de 4 colonias diferentes de SL3261-pTECH2/EgFABP2; 10) marcador de masa molecular preteñido *BDH Laboratory Supplies Electran*.

B) 1) 163 ng de proteína TetC recombinante; 2-4) lisados de 3 colonias diferentes C5htrA-pTECH2/EgFABP2; 5-7) lisados de 3 colonias diferentes Se795aroA-pTECH2/EgFABP2; 8 y 9) lisados de otras 2 colonias diferentes de BRD726-pTECH2/EgFABP2; 10) marcador de masa molecular preteñido *BDH Laboratory Supplies Electran*.

C) 1 y 2) lisados de 2 colonias diferentes de LVR01-pTECH2/EgFABP2; 3) marcador de masa molecular preteñido *BDH Laboratory Supplies Electran*; 4 y 5) lisados de 2 colonias diferentes de LVR01-pTECH2/EgFABP2.

En todos los casos las bacterias son cultivadas hasta la misma densidad óptica (0.5-0.6) a 600 nm, luego de una dilución 1/50 a partir de un precultivo. Como en este rango las densidades ópticas son proporcionales al número de bacterias del cultivo, en todos los casos se siembran extractos proteicos de un número equivalente de bacterias.

En base a esto podemos comparar la expresión de la proteína de fusión en las diferentes cepas, ya que los niveles de expresión son reflejo aproximado de la señal del *Western Blot*. Todas las cepas analizadas expresan la proteína heteróloga TetC-EgFABP2. La cepa Se795aroA presenta un buen nivel de expresión, mientras que la cepa BRD726 presenta un bajo nivel de expresión. En las cepas restantes: SL3261, C5aroD y C5htrA, LVR01 se aprecia una expresión intermedia. Estas apreciaciones surgen de la observación directa de la intensidad de las bandas de la proteína recombinante en las 3 o 4 colonias de cada cepa analizada. En particular solamente una de cuatro colonias recombinantes SL3261 presenta una señal fuerte, en cambio las tres colonias recombinantes Se795aroA testeadas presentan una fuerte expresión de la proteína recombinante TetC-EgFABP2.

De manera similar en la figura 34 A y B se muestran resultados de ensayos de *Western Blot* utilizando el suero anti-TetC, apreciándose la expresión de la proteína de fusión TetC-EgTrp en diferentes cepas vacunales de *Salmonella*.

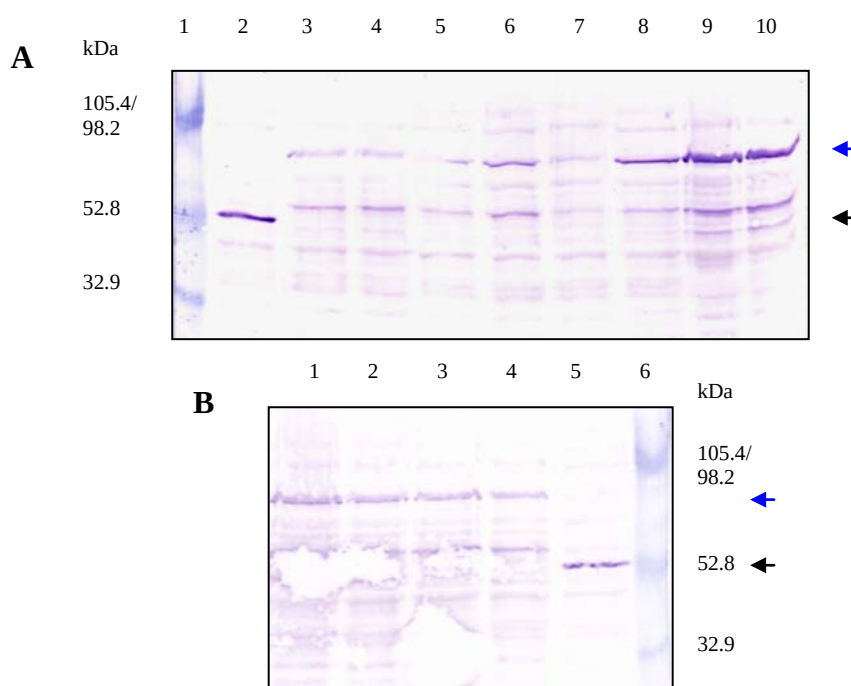


Figura 34. *Western Blot* de lisados de diferentes cepas de *Salmonella* recombinantes que expresan TetC-EgTrp, a partir de SDS-PAGE en acrilamida 12%. Se utiliza suero anti-TetC. El revelado se realiza con

un conjugado a fosfatasa alcalina. La flecha azul indica la proteína de fusión TetC-EgTrp, y la flecha negra corresponde a la proteína TetC.

A) 1) marcador de masa molecular preteñido *BDH Laboratory Supplies Electran*; 2) 100ng de proteína TetC recombinante; 3 y 4) lisados de 2 colonias diferentes SL3261-pTECH2/EgTrp; 5 y 6) lisados de 2 colonias diferentes C5aroD-pTECH2/EgTrp; 7 y 8) lisados de 2 colonias diferentes BRD726-pTECH2/EgTrp; 9 y 10) lisados de 2 colonias diferentes Se795aroA-pTECH2/EgTrp.

B) 1 y 2) lisados de 2 colonias diferentes LVR01-EgTrp; 3 y 4) lisados de 2 colonias diferentes C5htrA-pTECH2/EgTrp; 5) 100 ng de proteína TetC recombinante; 6) marcador de masa molecular preteñido *BDH Laboratory Supplies Electran*.

Las flechas azules señalan a la proteína TetC-EgTrp de 77.5 kDa, y las flechas negras corresponden a la proteína TetC de 50 kDa aproximadamente.

Al observar la señal obtenida de las dos colonias recombinantes analizadas de cada cepa, podemos decir que Se795aroA continúa siendo la cepa de *Salmonella* que presenta una mayor expresión, en este caso de la proteína recombinante TetC-EgTrp. En el resto de las cepas (SL3261, C5aroD, BRD726, C5htrA, LVR01) se observa una menor expresión de TetC-EgTrp. En todos los casos en que se usa el suero anti-TetC se aprecia una banda inferior pero superior a 50 kDa, posible producto de degradación o traducción incompleta.

En particular, se observa una buena expresión de las proteínas recombinantes TetC-EgTrp (figura 34B) y TetC-EgFABP2 (figura 33C) en la cepa vacunal de perro LVR01.

2. 1. 3. Ensayos de estabilidad del plásmido *in vitro*

Luego de haber censado la expresión de los antígenos de *E. granulosus* en las diferentes cepas de *Salmonella* nos interesó determinar la estabilidad de los plásmidos en las mismas. Mediante ensayos *in vitro* determinamos el porcentaje de bacterias que retienen el plásmido luego de ser cultivadas en medio líquido durante toda la noche en ausencia de ampicilina (tabla 1). Recuerde que el plásmido pTECH2 confiere resistencia a ampicilina. En los casos en donde este porcentaje es menor al 80%, se realizan 6 pasajes de la cepa en medio líquido (LB) con ampicilina y se repite el ensayo de estabilidad de la misma manera. La tabla 1 muestra los resultados obtenidos. En la mayoría de las cepas recombinantes se obtuvieron porcentajes de estabilidad menores para las construcciones pTECH2/EgFABP2 que para pTECH2/EgTrp.

Todas las cepas recombinantes que expresan TetC-EgFABP2, con excepción de LVR01, presentaron un porcentaje de estabilidad menor al 80%. Mediante pasajes

sucesivos en medio con antibiótico se logró estabilizar a tres de ellas (Se795aroA, C5aroD, y SL3261); mientras que las cepas recombinantes BRD726, C5htrA, y SL3261 continuaron siendo inestables. La única cepa de *Salmonella* que presenta un bajo porcentaje de estabilidad para ambos plásmidos recombinantes es C5htrA, y estos porcentajes se mantienen luego de los pasajes en cultivo con ampicilina.

Basándonos en estos resultados seleccionamos las cepas recombinantes estables *in vitro*: Se795aroA-pTECH2/EgFABP2, Se795aroA-pTECH2/EgTrp, C5aroD-pTECH2/EgFABP2, C5aroD-pTECH2/EgTrp, SL3261-pTECH2/EgFABP2, SL3261-pTECH2/EgTrp, y BRD726-pTECH2/EgTrp para ser utilizadas en ensayos de estabilidad *in vivo*, en ratones.

De aquí en más se utilizarán nombres abreviados para referirse a las cepas recombinantes: Se795aroA-pTECH2/EgFABP2 (Se-pTF2), Se795aroA-pTECH2/EgTrp (Se-pTTrp), C5aroD-pTECH2/EgFABP2 (C5-pTF2), C5aroD-pTECH2/EgTrp (C5-pTTrp), SL3261-pTECH2/EgFABP2 (SL-pTF2), SL3261-pTECH2/EgTrp (SL-pTTrp), BRD726-pTECH2/EgFABP2 (BR-pTF2), BRD726-pTECH2/EgTrp (BR-pTTrp), C5htrA-pTECH2/EgFABP2 (C5h-pTF2), C5htrA-pTECH2/EgTrp (C5h-pTTrp), LVR01- pTECH2/EgFABP2 (LV-pTF2) y LVR01- pTECH2/EgTrp (LV-pTTrp).

Cepa recombinante	Después de un pasaje en cultivo sin ampicilina	Después de seis pasaje en cultivo conteniendo ampicilina
Se-pTF2	62 %	88 %
Se-pTTrp	96 %	
C5-pTF2	36 %	99 %
C5-pTTrp	100 %	
BR-pTF2	11 %	16 % (NE)
BR-pTTrp	100 %	
C5h-pTF2	21 %	21 % (NE)
C5h-pTTrp	65 %	65 % (NE)
SL-pTF2	11 %	85 %
SL-pTTrp	94 %	
LV-pTF2	100 %	
LV-pTTrp	100 %	

Tabla 1. Ensayos de estabilidad *in vitro*.

Los porcentajes de estabilidad representan el porcentaje de bacterias que retienen el plásmido luego de un cultivo durante toda la noche sin ampicilina. NE: inestable.

2. 1. 4. Ensayos de estabilidad *in vivo*

Una vez seleccionadas las cepas recombinantes que presentan alta estabilidad *in vitro* se realizan experimentos en ratones, para testear la estabilidad de las construcciones *in vivo*. Para ello se inocula por vía intravenosa, grupos de 3 o 4 ratones con 1×10^5 ufc (unidades formadoras de colonia) por ratón. Se forman 7 grupos de ratones y cada uno es inoculado con las siguientes cepas recombinantes: Se-pTF2, Se-pTTrp, C5-pTF2, C5-pTTrp, SL-pTF2, SL-pTTrp y BR-pTTrp. A los diez días se lleva a cabo el conteo de bacterias viables en homogeneizados de hígado y bazo en medio con y sin ampicilina, y se calcula el porcentaje de estabilidad como se mencionó anteriormente. En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos. Se calcula las unidades formadoras de colonias por órgano mediante crecimiento en placas con medio sin ampicilina de diluciones del homogeneizado.

Cepa recombinante	Órgano	% de estabilidad	ufc/órgano
Se-pTF2	bazo	57 %	1×10^4
	hígado	60 %	2.4×10^3
Se-pTTrp	bazo	97 %	2.6×10^4
	hígado	100 %	3.2×10^3
C5-pTTrp	bazo	94 %	1.6×10^3
	hígado	100 %	1.3×10^3
SL-pTF2	bazo	0.5 %	1.0×10^5
	hígado	1.5 %	3.0×10^4
SL-pTTrp	bazo	100 %	2.4×10^4
	hígado	100 %	1.1×10^4
BR-pTTrp	bazo	100 %	1.1×10^3
	hígado	100 %	1.0×10^2

Tabla 2. Ensayos de estabilidad *in vivo*.

Los porcentajes de estabilidad representan el porcentaje de bacterias que retienen el plásmido recombinante. ufc: unidades formadoras de colonias

No se muestran los resultados del grupo C5-pTF2 ya que el inóculo fue muy pequeño, menor a 10^4 bacterias.

Estos resultados corroboran la tendencia observada en los ensayos de estabilidad *in vitro*, ya que se aprecian porcentajes de estabilidad menores para las construcciones que expresan la proteína TetC-EgFABP2 respecto a las que expresan a la proteína TetC-EgTrp.

En particular la cepa SL-pTF2 presenta un porcentaje de estabilidad muy bajo en ambos órganos, observándose un alto número de ufc por órgano. La pérdida del plásmido de la cepa recombinante favorecería el crecimiento de la bacteria.

Las construcciones que resultaron ser estables *in vivo* son: Se-pTTrp, C5-pTTrp, SL-pTTrp, BR-pTTrp.

A partir de este estudio y el anterior se seleccionan a las cepas Se-pTTrp y Se-pTF2 para realizar ensayos de inmunización primarios en ratones. Se795aroA es la cepa de *Salmonella* que presenta el mayor porcentaje de estabilidad del plásmido pTECH2EgFABP2 *in vivo* (60% aproximadamente) y un porcentaje alto *in vitro* (88%). Por otro lado, esta cepa había mostrado un alto nivel de expresión de la proteína recombinante, apoyando así la elección de esta cepa para continuar con los estudios.

2. 2. Expresión de EgTrp, EgFABP1 y EgFABP2 en el virus vaccinia Ankara (MVA)

2. 2. 1. Clonado de EgFABP1, EgFABP2 y EgTrp en el vector de transfección pSC11.

Con el fin de obtener otro sistema de expresión de antígenos de *E. granulosus* para la vacunación oral de perros, se construyeron recombinantes del virus vaccinia Ankara modificado (MVA).

Primeramente se clona los productos de PCR de la secuencia codificante de EgTrp (secuencia truncada), de EgFABP1 y de EgFABP2 en el vector pSC11. Los productos amplificados presentan un codón de inicio y un codón de terminación al principio y al final de la secuencias codificantes respectivamente. Luego que los productos de PCR son tratados para generar extremos romos, éstos son clonados en el vector pSC11 digerido y también tratado para asegurar la ligación de extremos romos. Posteriormente a la transformación de *E. coli* DH5 α se rastrean las colonias recombinantes mediante digestiones enzimáticas y PCR, como lo muestra la figura 35.

En la figura 35 A se muestran los productos de la digestión de los plásmidos de diferentes colonias con BamHI. El plásmido pSC11 presenta tres sitios de corte con BamHI que generan 3 fragmentos de ADN, de 4493 pb, de 2990 pb y de 400 pb. Cuando un inserto es clonado generará un fragmento de 4493 pb más el tamaño del inserto, y los otros 2 fragmentos no cambiarán de tamaño.

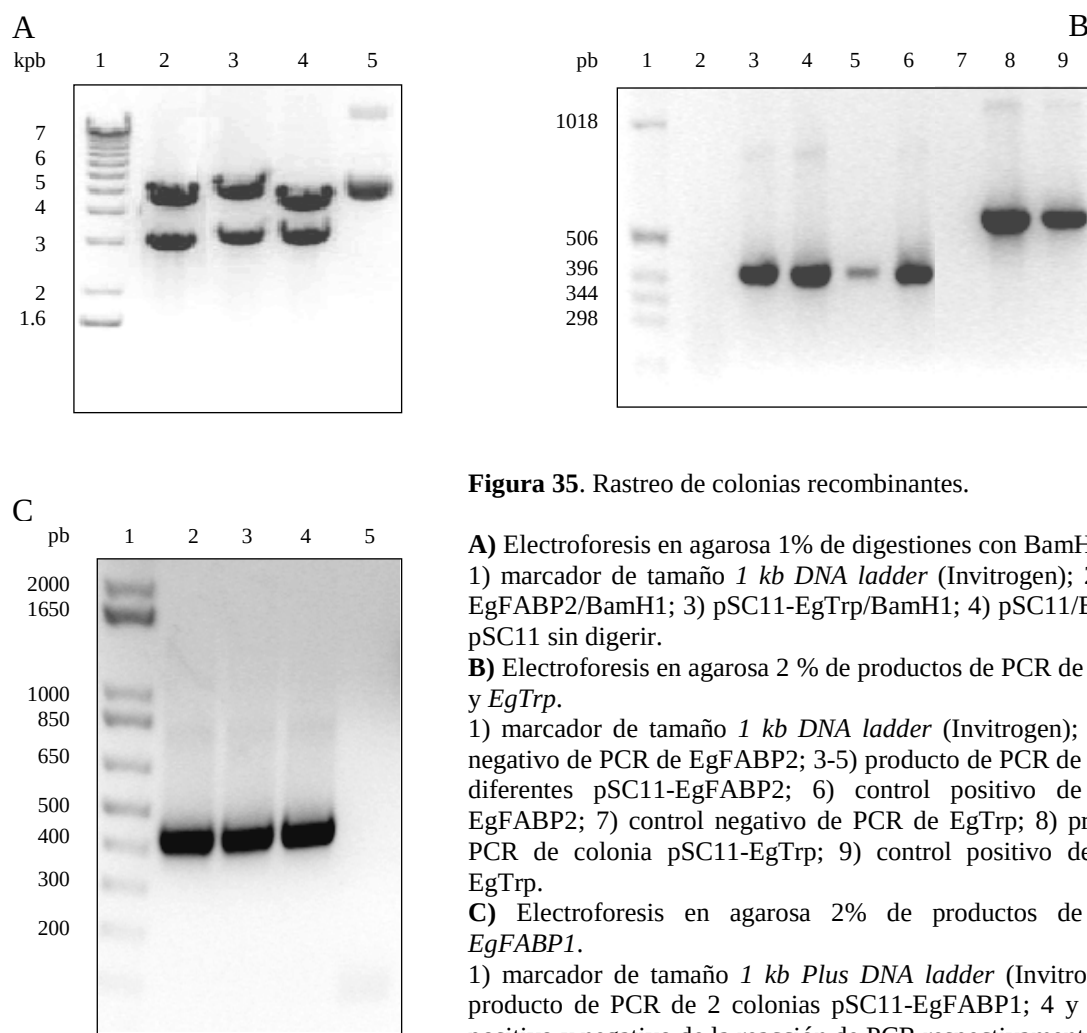


Figura 35. Rastreo de colonias recombinantes.

A) Electroforesis en agarosa 1% de digestiones con BamH1.
1) marcador de tamaño 1 kb DNA ladder (Invitrogen); 2) pSC11-EgFABP2/BamH1; 3) pSC11-EgTrp/BamH1; 4) pSC11/BamH1; 5) pSC11 sin digerir.

B) Electroforesis en agarosa 2 % de productos de PCR de *EgFABP2* y *EgTrp*.
1) marcador de tamaño 1 kb DNA ladder (Invitrogen); 2) control negativo de PCR de *EgFABP2*; 3-5) producto de PCR de 3 colonias diferentes pSC11-EgFABP2; 6) control positivo de PCR de *EgFABP2*; 7) control negativo de PCR de *EgTrp*; 8) producto de PCR de colonia pSC11-EgTrp; 9) control positivo de PCR de *EgTrp*.

C) Electroforesis en agarosa 2% de productos de PCR de *EgFABP1*.
1) marcador de tamaño 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen); 2-3) producto de PCR de 2 colonias pSC11-EgFABP1; 4 y 5) control positivo y negativo de la reacción de PCR respectivamente.

En los pocillos 2 al 4 de la figura 35A no se observa la banda de 400 pb ya que queda por fuera del campo de la foto. Se aprecia claramente en el carril 4 (pSC11 sin inserto) dos bandas, una entre 4000 y 5000 pb y otra de alrededor de 3000 pb, la banda inferior también se obtiene en los carriles 2 y 3, pero la banda superior es de mayor tamaño si *EgFABP2* o *EgTrp* están clonados (carril 2 y 3). Estas diferencias de tamaño se habrían apreciado mejor en un gel de menor porcentaje de agarosa.

En la figura 35 B y C se muestran los productos de PCR obtenidos a partir de la amplificación de los plásmidos obtenidos de las colonias recombinantes. En cada caso se amplifica el fragmento clonado con cebadores específicos, y se realizan los controles

necesarios. EgFABP1 y EgFABP2 poseen 400 pb aproximadamente mientras que EgTrp presenta 550 pb.

Tanto los productos de digestión de los clones recombinantes como los productos de PCR de los mismos presentan los tamaños esperados.

Por último se confirma la secuencia clonada mediante secuenciación automática utilizando el cebador p7.5 del plásmido pSC11. Se mantiene la mutación observada en los clones SL5338-pTECH2/EgTrp ya que se utiliza el plásmido pTECH2/EgTrp como molde para la reacción de PCR de EgTrp (ver sección 2.1.1).

2. 2. 2. Infección celular y transfección

Una vez obtenidos los plásmidos recombinantes procedemos a obtener los virus vaccinia recombinantes. Para ello infectamos células QT35 (línea celular de fibroblastos de codorniz) con virus vaccinia tipo salvaje y posteriormente transfectamos con los plásmidos recombinantes utilizando diferentes métodos como se explica en materiales y métodos. Luego las células son lisadas y se plaquean bajo condiciones de selección y rastreo adecuadas. Se realizan tres plaqueos, el primero en células QT35 y se seleccionan los virus LacZ⁺. Para el segundo plaqueo se utilizan células BrdUBHK (línea celular de fibroblastos de hamster, TK⁻), seleccionándose los virus TK⁻ y LacZ⁺. Por último se vuelve a plaquear en células QT35 y se vuelven a seleccionar los virus LacZ⁺. De esta manera se seleccionan los virus MVA recombinantes, asegurando la pureza y evitando la contaminación con el virus salvaje.

La figura 36 muestra una foto de una de las placas de cultivo de 6 pocillos, donde se observa el tercer plaqueo en células QT35 de los virus recombinantes MVA-pSC11/EgTrp. En la figura 36A se observa claramente las placas de lisis virales azules originadas por los virus recombinantes LacZ⁺. En la figura 16 B y C se aprecia con mayor aumento una placa de lisis azul con un marcado efecto citopático, las células infectadas se redondean y se juntan formando racimos. Si bien este efecto citopático se observa en otras regiones de la monocapa celular, producto de la infección por virus salvaje sólo se seleccionan aquellas placas de lisis de color azul.

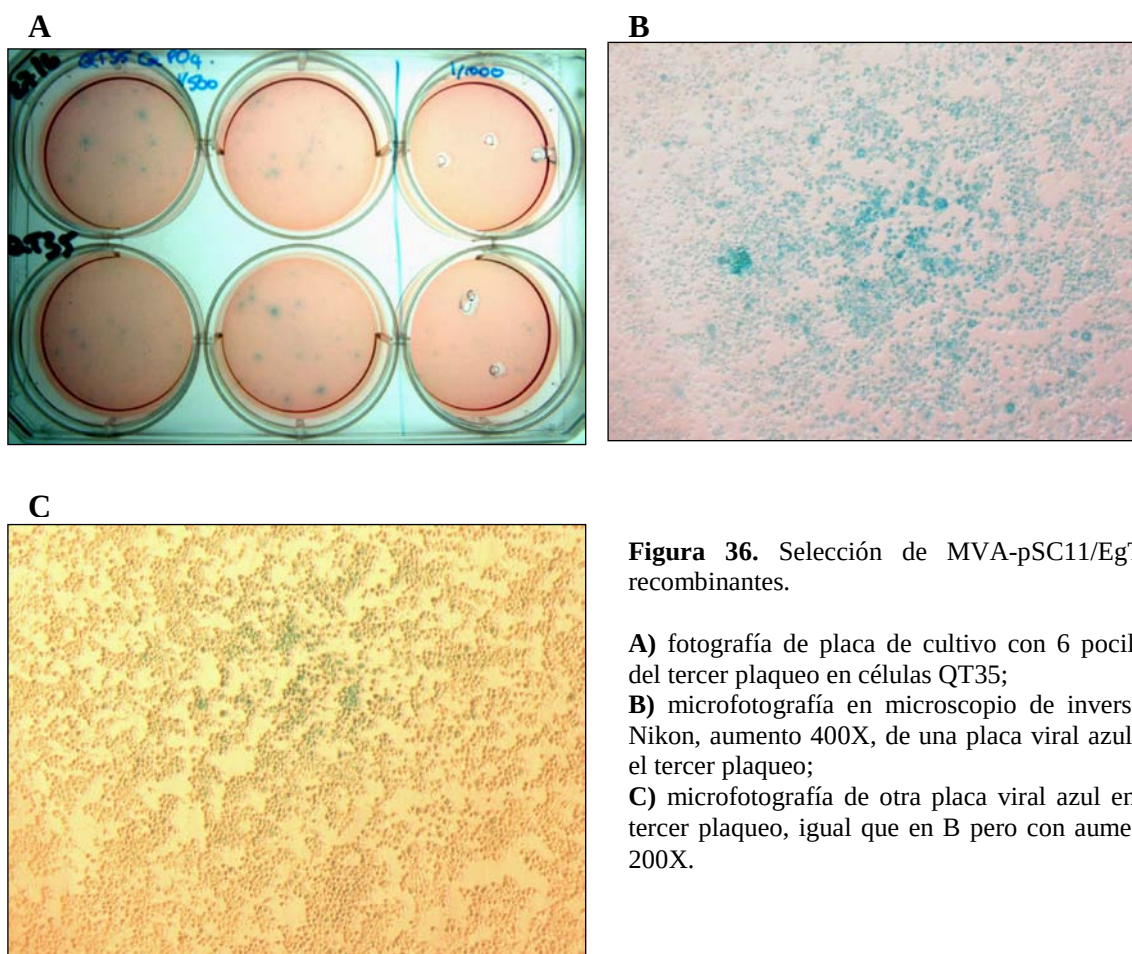


Figura 36. Selección de MVA-pSC11/EgTrp recombinantes.

A) fotografía de placa de cultivo con 6 pocillos del tercer plaqueo en células QT35;
B) microfotografía en microscopio de inversión Nikon, aumento 400X, de una placa viral azul en el tercer plaqueo;
C) microfotografía de otra placa viral azul en el tercer plaqueo, igual que en B pero con aumento 200X.

2. 2. 3 Confirmación de la presencia de la secuencia codificante de interés

Luego del tercer plaqueo se verifica la presencia de la secuencia codificante de interés mediante PCR a partir de ADN viral, utilizando el cebador directo p7.5 y un reverso específico. En cada caso se realizan los controles negativos y positivos necesarios. En la figura 37 se observa los resultados de las reacciones de PCR a partir de ADN viral aislado de infecciones en células QT35 con los virus recombinantes obtenidos del tercer plaqueo. En todos los casos se logra amplificar la secuencia codificante de interés y no se observa amplificación cuando se utiliza ADN extraído de células sin infectar, ni de células infectadas con el virus recombinante MVA-pSC11.

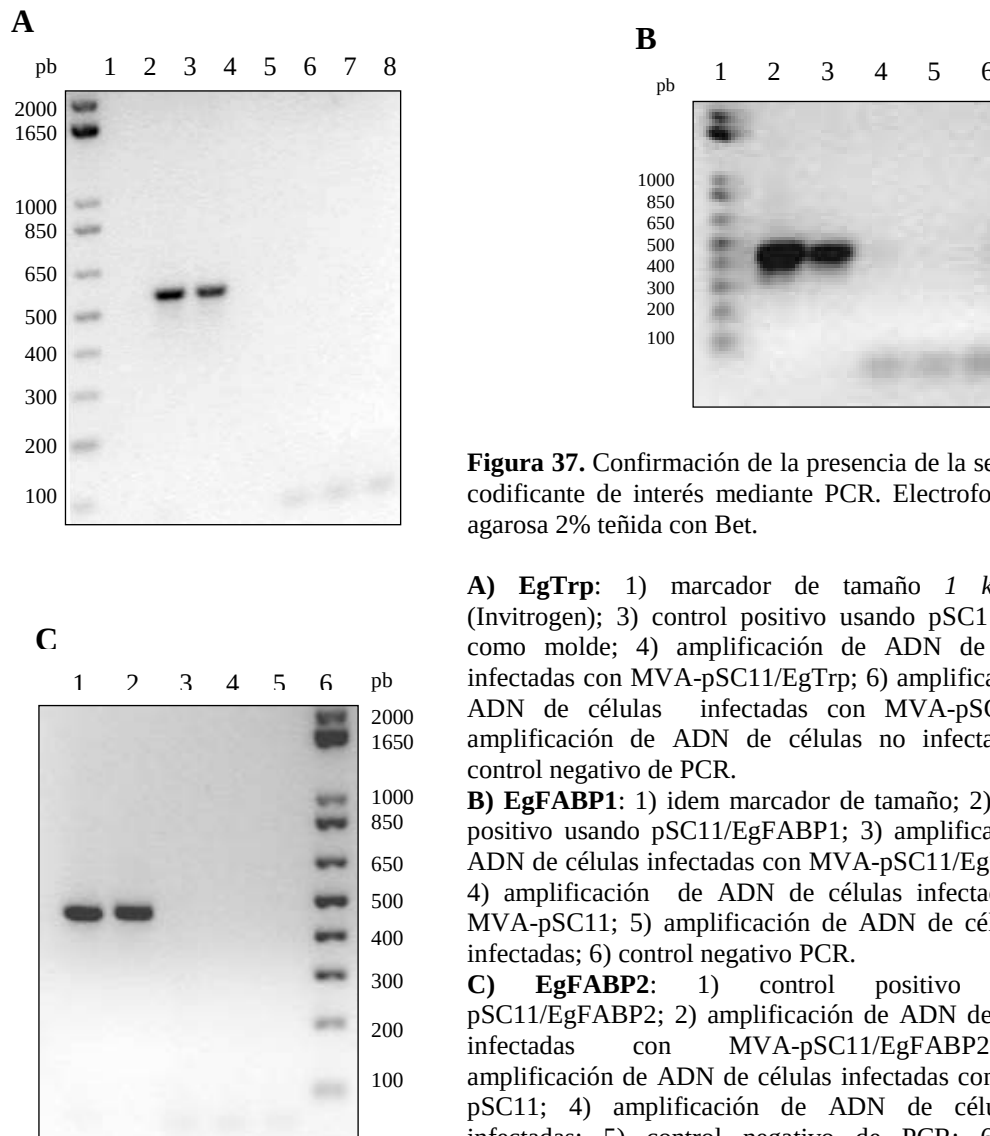


Figura 37. Confirmación de la presencia de la secuencia codificante de interés mediante PCR. Electroforesis en agarosa 2% teñida con Bet.

Por otro lado se verifica la expresión de las proteínas recombinantes mediante ensayos de *Western Blot* utilizando extractos proteicos obtenidos a partir de células QT35 infectadas con el virus recombinantes MVA-pSC11/EgTrp (MVA-pEgTrp) o MVA-pSC11/EgFABP1 (MVA-pEgFABP1) o MVA-pSC11/EgFABP2 (MVA-pEgFABP2). En la figura 38 se muestran estos experimentos.

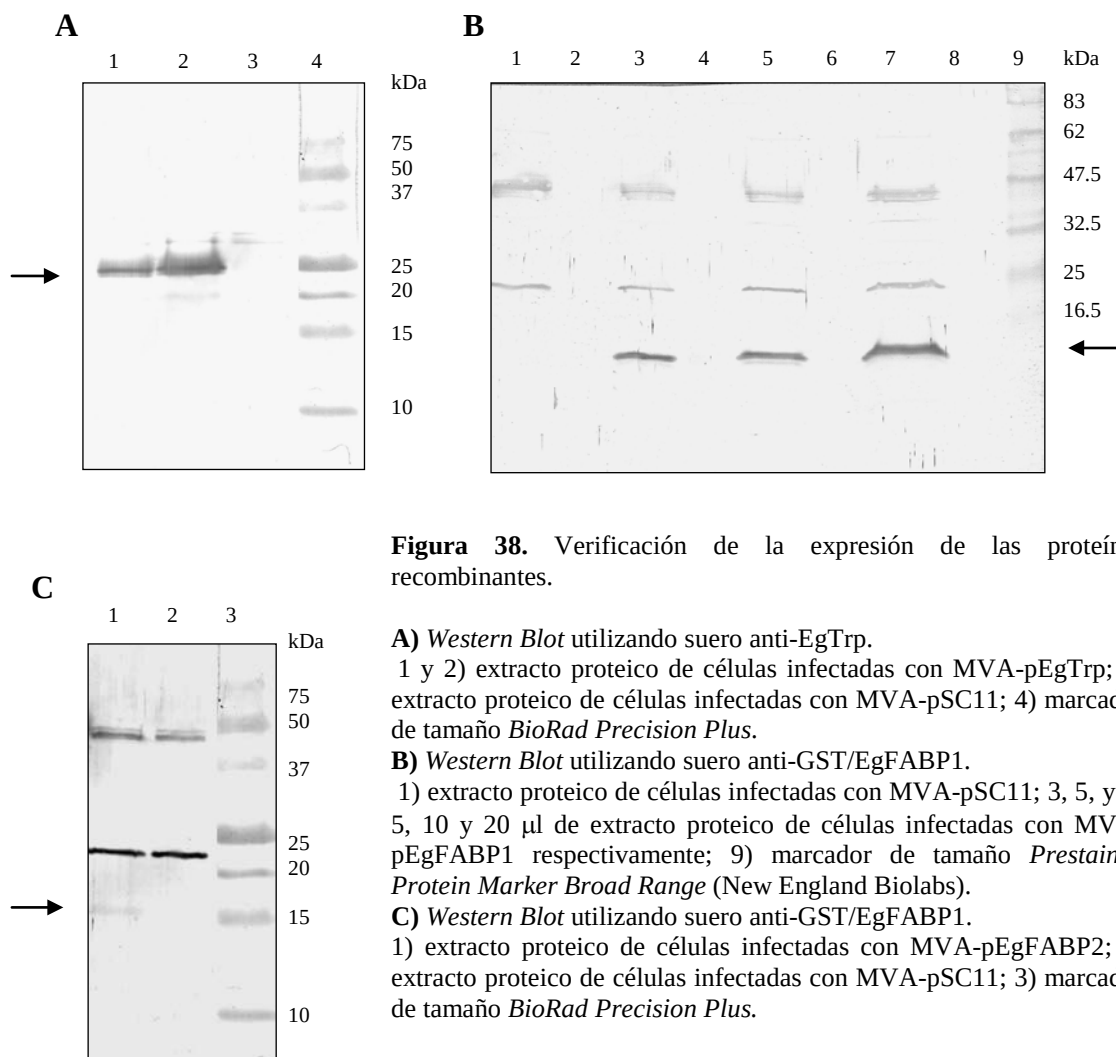


Figura 38. Verificación de la expresión de las proteínas recombinantes.

A) Western Blot utilizando suero anti-EgTrp.

1 y 2) extracto proteico de células infectadas con MVA-pEgTrp; 3) extracto proteico de células infectadas con MVA-pSC11; 4) marcador de tamaño *BioRad Precision Plus*.

B) Western Blot utilizando suero anti-GST/EgFABP1.

1) extracto proteico de células infectadas con MVA-pSC11; 3, 5, y 7) 5, 10 y 20 μ l de extracto proteico de células infectadas con MVA-pEgFABP1 respectivamente; 9) marcador de tamaño *Prestained Protein Marker Broad Range* (New England Biolabs).

C) Western Blot utilizando suero anti-GST/EgFABP1.

1) extracto proteico de células infectadas con MVA-pEgFABP2; 2) extracto proteico de células infectadas con MVA-pSC11; 3) marcador de tamaño *BioRad Precision Plus*.

En todos los casos el revelado se realiza mediante un conjugado a fosfatasa alcalina. Las flechas señalan a las proteínas recombinantes.

Se observa una buena expresión de las proteínas recombinantes EgTrp y EgFABP1 (A y B); sin embargo la proteína EgFABP2 (C) presenta niveles de expresión bajos. Este último resultado coincide con lo previamente observado con respecto a la expresión de la proteína recombinante TetCEgFABP2 en las cepas atenuadas de *Salmonella*.

Cuando se utiliza suero anti-GST/EgFABP1 que presenta reacción cruzada con EgFABP2 (figura 38 B y C), se observan dos bandas de mayor tamaño además de la banda de 15 kDa aproximadamente, las mismas podrían corresponder a reacciones con proteínas inespecíficas o a la proteína GST (glutación S-transferasa) de codorniz (23 kDa aprox.) y su dímero (46 kDa). Estas dos bandas son más intensas en C que en B

debido a que el tiempo de revelado fue mayor en el *Western Blot* C tratando de obtener una mejor señal de la proteína EgFABP2.

2. 2. 4. Producción y purificación a gran escala de las placas virales seleccionadas

Primeramente se amplifica la placa viral seleccionada para obtener preparaciones virales stock de trabajo. Para ello los virus recombinantes producto del tercer plaqueo son crecidos en frascos de cultivo de tamaño creciente hasta obtener tres frascos T175 (stock de trabajo). Después de cada paso la solución viral es titulada.

Posteriormente se realiza una purificación a gran escala mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa.

Se purificaron los virus recombinantes MVA-pEgTrp, MVA-pEgFABP2 y MVA-pSC11. Este último se utilizará como control en los ensayos de inmunización en perros. El virus recombinante MVA-EgFABP1 se produjo hasta el nivel de stock viral *submaster* (crecimiento en frascos T75). La tabla 3 muestra los rendimientos finales obtenidos.

Virus recombinante	Título viral (ufp/ml)	Volumen (ml)
MVA-pSC11	2.4×10^9 ufp/ml	1.50
MVA-pEgTrp	8.4×10^8 ufp/ml	1.25
MVA-pEgFABP2	8.5×10^8 ufp/ml	1.50
MVA-pEgFABP1	8.3×10^7 ufp/ml	1.00

Tabla 3. Rendimiento viral luego de la producción y purificación a gran escala de los virus recombinantes.

De este modo se obtienen preparaciones virales puras en Tris-HCl 1mM pH 9.0, con altos títulos, de manera de poder comenzar ensayos de inmunización por vía oral en perros.

3. Ensayos de inmunización en ratones con cepas recombinantes de *Salmonella*

3. 1. Ensayos primarios de inmunización con las cepas Se795aroA recombinantes

El paso siguiente al clonado de los antígenos EgTrp y EgFABP2 y selección de las construcciones más adecuadas, es la caracterización de sus propiedades inmunogénicas en ratones, paso previo a futuros ensayos de vacunación en perros.

Las cepas Se-pTF2 y Se-pTTrp seleccionadas demostraron ser las construcciones de mayor nivel de expresión y más estables *in vitro* e *in vivo*.

Se realizó un primer ensayo con bajo número de ratones para luego pasar a un ensayo más completo, con las construcciones y la vía de inoculación más adecuadas e incluyendo además la cepa de perro LVR01.

En el primer ensayo se utilizó 6 grupos de ratones (A-F) con 3 o 4 ratones por grupo, y dos vías de inoculación:

- A) Se-pTF2 oral
- B) Se-pTTrp oral
- C) Se-pT oral (Se-pTECH2, control)
- D) Se-pTF2 intravenoso
- E) Se-pTTrp intravenoso
- F) Se-pT intravenoso (Se-pTECH2, control)

Los grupos que fueron inoculados por vía intravenosa recibieron una dosis y los inoculados oralmente recibieron dos dosis (refuerzo a los 14 días). Los ratones fueron sangrados en el día 0, 13, 26, y 37; considerando día 0 al día de la primer inoculación. Se estudió la respuesta de IgG anti-EgFABP2, anti-EgTrp, anti-tetC y anti-LPS en sangre, mediante ELISA. Los datos fueron analizados mediante el test de Student, considerando diferencias significativas entre dos grupos cuando la p es menor a 0.05.

3. 1. 1. Respuesta de IgG anti-LPS

La respuesta de IgG anti-LPS nos informa si la bacteria ingresó al organismo y está siendo vista por el sistema inmune del ratón; también se determina mediante ELISA. En la figura 39 se muestra un gráfico de barras que representa la repuesta de cada grupo en

los diferentes días post-inoculación. Todos los grupos presentan un aumento significativo, de distinta magnitud, de IgG anti-LPS en el día 26 con respecto al día 0 post-inoculación.

Nuestros resultados indicarían que las bacterias recombinantes ingresan al organismo y son reconocidas por el sistema inmune del ratón, generándose respuesta de IgG anti-LPS significativa en el día 26 p.i..

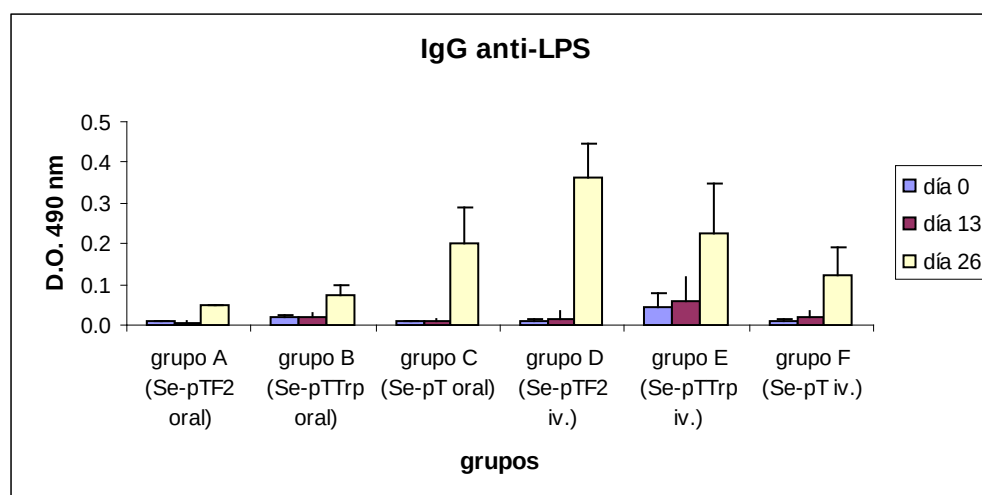


Figura 39. Detección de respuesta de IgG total anti-LPS de *S. enteritidis* mediante ELISA. Cada barra corresponde a la media de un grupo en un día post-inoculación dado. Se grafica la desviación estándar para cada situación. El tratamiento de datos se realiza utilizando el test de Student ($p < 0.05$).

Con respecto a los grupos cuya vía de inoculación es oral, el grupo Se-pT oral (C) en el día 26 presenta una respuesta anti-LPS significativamente mayor que el grupo Se-pTF2 oral (A) en el día 26 p.i.. No existen diferencias significativas entre el grupo Se-pTTrp oral (B) y A, y entre el B y el C en el día 26 p.i..

Por otro lado, ocurre lo contrario con los grupos iv. ya que el grupo Se-pTF2 iv (D) en el día 26 p.i. muestra una respuesta humoral anti-LPS significativamente mayor que el grupo Se-pT iv (F) en el mismo día. No se observan diferencias significativas entre el grupo Se-pTTrp iv (E) y D, y entre el E y el F en ese día. Basándonos en el análisis estadístico, sugerimos que ya sea la vía de inoculación oral o intravenosa, la expresión de TetC-EgTrp no afectaría la cantidad de bacterias vistas por el sistema inmune.

Apreciando la respuesta de los grupos Se-pTF2 iv. (D) y Se-pT iv. (F), se observa que ésta es mayor en el grupo D; en este grupo podría ocurrir una disminución del número

de bacterias recombinantes y un aumento del número de bacterias nativas producto de la inestabilidad del plásmido recombinante pTF2.

Por otro lado, en los grupos de inoculación oral no se observa tal diferencia, en el grupo Se-pTF2 oral (A) menos bacterias ingresarían al sistema comparado con el grupo Se-pT oral (C), pero también se observa una baja expresión de la proteína recombinante (ver figura 40 y 41). En este caso coincide el menor número de bacterias con una menor expresión del antígeno recombinante, y se sugiere que la expresión de la proteína TetC-EgFABP2 podría ser la responsable de la disminución en el número de bacterias, cuando la vía de inoculación es oral.

Al comparar los grupos con distintas vías de inoculación observamos que si bien hay una tendencia a una mayor respuesta de los grupos iv. que los grupos orales, solamente el grupo Se-pTF2 iv (D) presenta un aumento significativo de la respuesta anti-LPS en el día 26 con respecto al grupo Se-pTF2 oral (A) en ese mismo día.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, sugerimos que en el grupo Se-pTF2 iv (D) más bacterias entran al organismo y son vistas por el sistema inmune que en el grupo Se-pTF2 oral (A), pero las mismas producirían menos antígeno recombinante (similar al grupo A, ver figura 40 y 41). Esto nos hace pensar que en el grupo D una gran proporción de bacterias recombinantes perderían el plásmido, aumentando así el número de bacterias nativas, como se menciona anteriormente.

3. 1. 2. Respuesta de IgG anti-TetC

Se estudia además la respuesta de IgG anti-TetC de todos los grupos en el tiempo (figura 40); esto nos informa si el plásmido recombinante se está expresando.

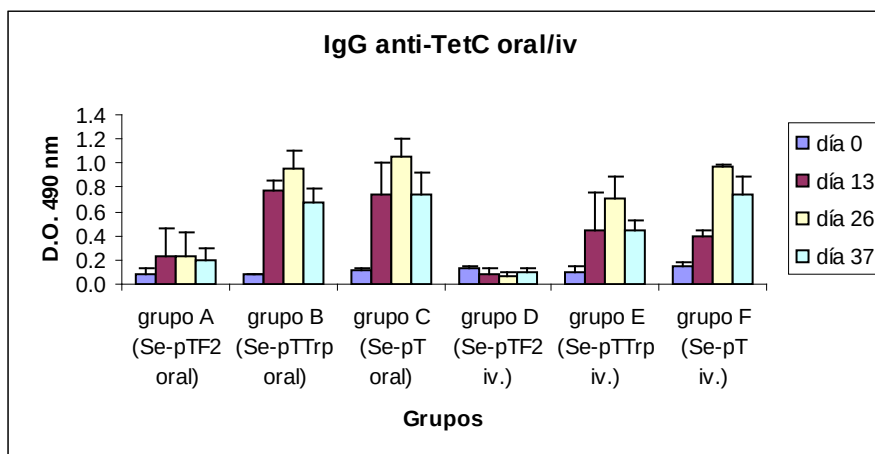


Figura 40. Ensayos de ELISA para detección de respuesta de IgG total anti-TetC. Cada barra corresponde a la media de las respuestas de los ratones de cada grupo, en los días 0, 13, 16 y 37 p.i.. Se representa la desviación estándar para cada caso. Los datos se analizan mediante el test de Student ($p < 0.05$).

Del análisis de los resultados de la figura 40 se desprende que no se genera respuesta anti-TetC significativa cuando se utiliza la cepa Se-pTF2 por ninguna de las dos vías de inoculación (grupos A y D). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los ensayos de estabilidad *in vitro* e *in vivo*, donde las construcciones que expresan TetC-EgFABP2 presentan porcentajes de estabilidad más bajos que las que expresan TetC-EgTrp, reflejo de la probable pérdida del plásmido recombinante y por lo tanto baja expresión de la proteína recombinante.

Los grupos Se-pTTrp oral (B), Se-pT oral (C), Se-pTTrp iv (E), y Se-pT iv (F) presentan un aumento significativo en la respuesta anti-TetC tanto en el día 26 como 37 p.i., siendo el grupo B el único que presenta esta diferencia desde el día 13 post-inoculación. Se observa en estos cuatro grupos una disminución no significativa de la respuesta en el día 37 con respecto a la del día 26 post-inoculación.

Al comparar las respuestas de IgG anti-TetC de los grupos B y C no se obtienen diferencias significativas en ninguno de los días post-inoculación y tampoco se observan diferencias significativas entre los grupos E y F.

La respuesta anti-TetC generada en los grupos que expresan TetCEgTrp (grupos B y E) es similar a la de los grupos que expresan la proteína TetC (grupos C y F respectivamente), esto demostraría que los grupos inoculados con Se-pTTrp (oral e iv.) generaron una muy buena respuesta de IgG anti-TetC y corroboraría que la proteína recombinante TetCEgTrp se expresa correctamente y con niveles similares a los del fragmento TetC en los grupos controles.

Con respecto a la vía de inoculación se aprecia una respuesta humoral significativamente mayor en el grupo Se-pTTrp oral (B) en el día 37 p.i. que en el grupo Se-pTTrp iv (E) en el mismo día, esto confirmaría que la vía de inoculación oral es mejor que la intravenosa.

3. 1. 3. Respuesta de IgG anti-EgFABP2 y anti-EgTrp

Las figuras 41 A y 41 B muestran los resultados de los ensayos de ELISA que detectan IgG anti-EgFABP2 en los grupos cuya vía de inoculación es oral (grupo A) o intravenosa (iv.) (grupo D), y a diferentes días post-inoculación (p.i.). De manera similar, las figuras 42 A y B muestran los niveles de IgG anti-EgTrp en los grupos B (oral) y E (iv). Se determinan los niveles de IgG anti-EgFABP2 y anti-EgTrp en los grupos controles C y F (Se-pT oral y Se-pT iv.) en los días 0 y 26 p.i., en ningún caso se detecta respuesta significativa respecto al día 0 p.i. correspondiente (los gráficos no se muestran).

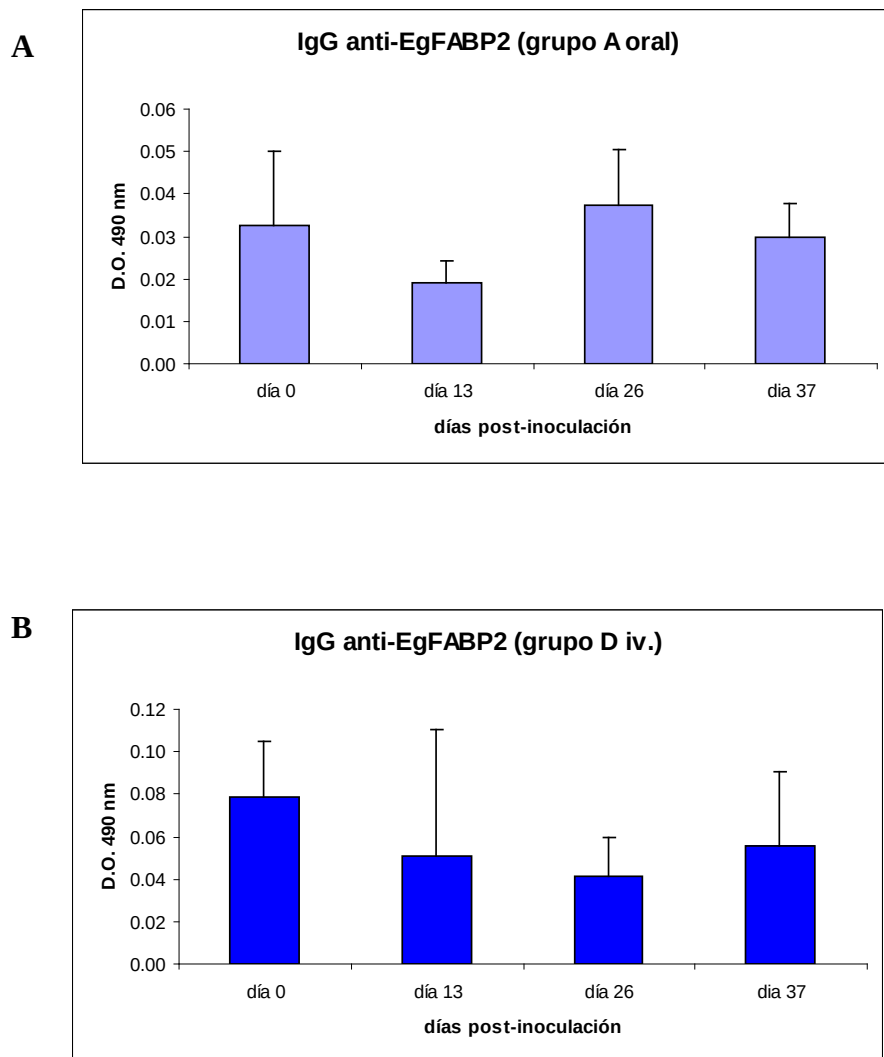


Figura 41. Ensayos de ELISA para detección de respuesta de IgG anti-EgFABP2, en el grupo A vía de inoculación oral (figura A), y en el grupo D vía de inoculación intravenosa (iv.) (figura B). Cada barra corresponde a la media de un grupo en el día 0, 13, 26 y 37 p.i.. Se representa la desviación estándar. Los datos se analizan mediante el test de Student ($p < 0.05$).

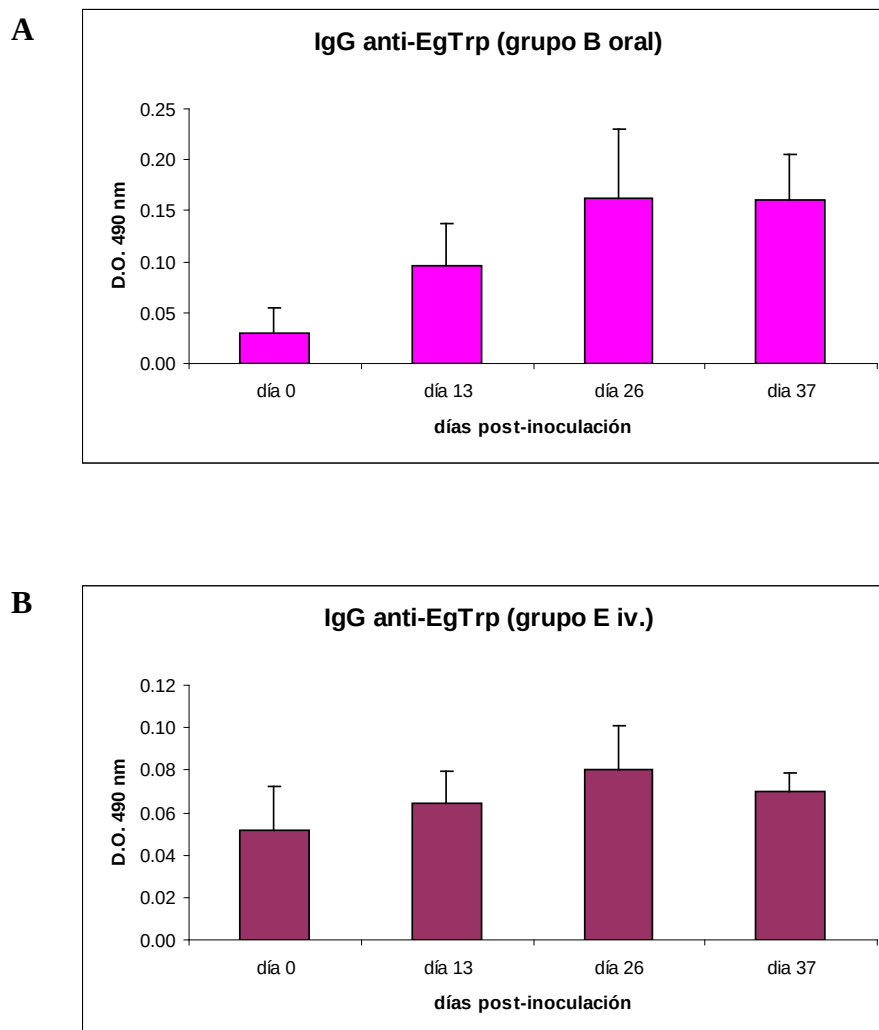


Figura 42. Ensayos de ELISA para detección de respuesta de IgG anti-EgTrp, en el grupo B vía de inoculación oral (figura A), y en el grupo E, vía de inoculación intravenosa (iv.) (figura B). Cada barra corresponde a la media de un grupo en los días 0, 13, 26 y 37 p.i.. Se representa la desviación estándar. Los datos se analizan mediante el test de Student ($p < 0.05$).

El análisis estadístico de los datos que generan a las figuras 41 y 42, nos indica que todos los grupos presentan una respuesta similar de IgG anti-antígeno de *E. granulosus* sin diferencias significativas en el día 0, esto nos permite realizar comparaciones entre los diferentes grupos.

Los niveles de los grupos A (Se-pTF2 oral), D (Se-pTF2 iv.) y E (Se-pTTrp iv.), en los días 13, 26 y 37 p.i., no presentan diferencias significativas con los niveles de los días 0 respectivos. Sin embargo, el grupo B (Se-pTTrp oral) presenta una respuesta de IgG anti-EgTrp que si bien es similar entre los días 0 y 13 p.i., presenta un aumento

significativo el día 26 y 37 p.i. comparado con el día 0; la media del día 26 y 37 p.i. es 5 veces mayor que la media del día 0.

Basándonos en el análisis estadístico sugerimos que el grupo B (Se-pTTrp oral) es el único que presenta una respuesta significativamente mayor en el día 26 y 37 p.i. con respecto al día 0, incluso cuando se compara con el grupo E; y que ningún grupo desarrollaría una respuesta de IgG anti-antígeno de *E.g.* considerable en el día 13 p.i.. Esto nos sugiere que la vía de inoculación oral sería mejor que la intravenosa y que el antígeno TetCEgTrp se expresaría mejor en ratones que TetCEgFABP2. Esto es apoyado por los resultados de los ensayos de estabilidad. Con respecto al tiempo observamos que no se detecta respuesta anti-EgTrp hasta el día 26 y que ésta se mantiene hasta el día 37 p.i..

Estos resultados indican que las construcciones con EgFABP2 no generan respuesta humoral significativa ni por la vía oral ni por la intravenosa.

La baja estabilidad del plásmido recombinante pTECH2/EgFABP2 obtenida en los estudios de estabilidad, podría explicar la baja respuesta humoral observada en las construcciones que expresan TetCEgFABP2.

Comparando los niveles de IgG anti-EgTrp y anti-EgFABP2 por la misma vía de inoculación oral o intravenosa, siempre es significativamente mayor la respuesta anti-EgTrp que la anti-EgFABP2. En otras palabras, si bien la vía de inoculación es la misma, nuevamente la proteína TetCEgTrp parecería estar mejor expresada que TetCEgFABP2. La construcción que expresa TetCEgTrp parece funcionar mejor

3. 2. Segundo ensayo de inmunización en ratones

En base a los resultados anteriores, seleccionamos la cepa recombinante de *Salmonella* Se795aroA conteniendo el plásmido recombinante que codifica para la tropomiosina (TetC-EgTrp), para inmunizar un número mayor de ratones (10 ratones) por vía oral y así obtener resultados con mayor peso estadístico. Además se compara la cepa seleccionada con la cepa recombinante LVR01-pTTrp que expresa el mismo antígeno. Se descartan las construcciones que expresan TetC-EgFABP2 debido a la baja respuesta inmune generada en el experimento anterior.

Como se mencionó se utilizan las cepas recombinantes Se-pTTrp y LVR01-pTTrp, y se organizan 4 grupos con 10 ratones cada uno, los mismos se inoculan con dos dosis orales (refuerzo al día 15).

- A) LV-pTTrp
- B) LV-pT (control)
- C) Se-pTTrp
- D) Se-pT (control)

Los ratones son sangrados en el día 0, 22, 29 y 44 p.i., y se colecta materia fecal en el día 0 y 43 p.i.. Mediante ELISA se estudia la respuesta de IgG total anti-EgTrp, anti-TetC y anti-LPS en sangre. También se analiza la respuesta de IgA secretoria anti-EgTrp y anti-TetC en materia fecal.

3. 2. 1. Respuesta de IgG anti-EgTrp

En la figura 43 se muestra el gráfico que representan la respuesta de IgG total anti-EgTrp de los grupos A y C.

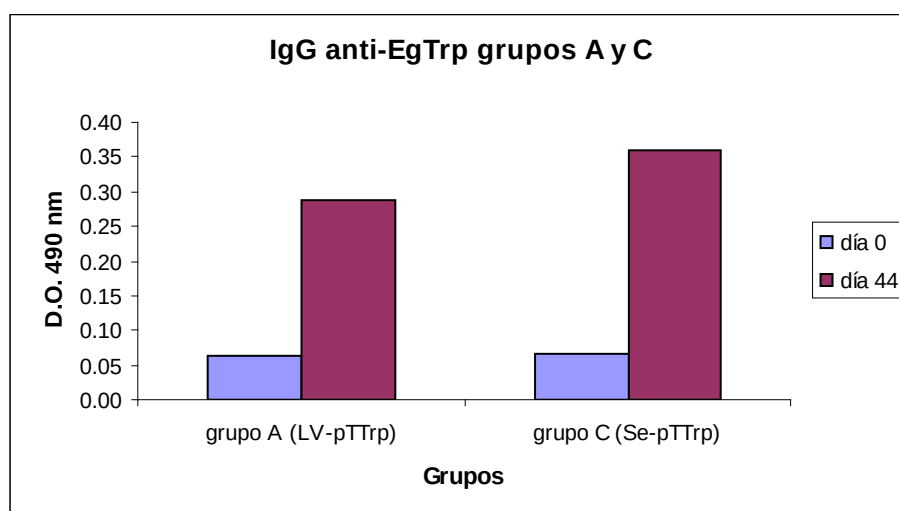


Figura 43. Ensayos de ELISA para detección de respuesta de IgG total anti-EgTrp de los grupos A y C. Cada barra corresponde a la mediana de un grupo de ratones en un día p.i. dado. Los datos se analizan mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney U, considerando diferencias significativas cuando $p < 0.05$.

Con respecto a lo mostrado en la figura 43, los niveles del día 0 de ambos grupos no presentan diferencias significativas. La respuesta de IgG anti-EgTrp del grupo LV-pTTrp (A) en el día 44 es significativamente mayor que la del día 0 p.i.. Una diferencia mayor se observa en el grupo Se-pTTrp (C) entre el día 0 y el 44 p.i.. No existe una diferencia significativa entre los niveles de respuesta del grupo A y C en el día 44 p.i.. De este análisis se desprende que ambos grupos LV-pTTrp y Se-pTTrp generarían una buena respuesta de IgG anti-EgTrp al día 44 y la intensidad de estas dos respuestas son similares.

Una vez realizadas las determinaciones con los controles LV-pT (B) y Se-pT (D), se verifica que no se observa respuesta de IgG anti-EgTrp en ninguno de los dos grupos, en ninguno de los diferentes días post-inoculación (los datos no se muestran). Esto demostraría que cuando no se expresa el antígeno recombinante no se observa respuesta contra el mismo.

3. 2. 2. Respuesta de IgA anti-EgTrp

La figura 44 muestra la respuesta de IgA secretoria anti-EgTrp en materia fecal; se define un nuevo grupo control (no inoculado) donde las muestras fueron tomadas antes de la inoculación (día 0), a partir de un conjunto de ratones al azar de cada grupo, y el resto de las muestras fueron tomadas de todos los ratones en el día 43 p.i..

Del análisis estadístico de los datos que generan la figura 44 se desprende que los niveles de IgA anti-EgTrp de los grupos controles LV-pT (B) y Se-pT (D) son similares al del grupo control no inoculado, no encontrándose diferencias significativas entre estos grupos. Esto indicaría que las construcciones LV-pT (B) y Se-pT (D) no generan respuesta de IgA anti-EgTrp como era esperable.

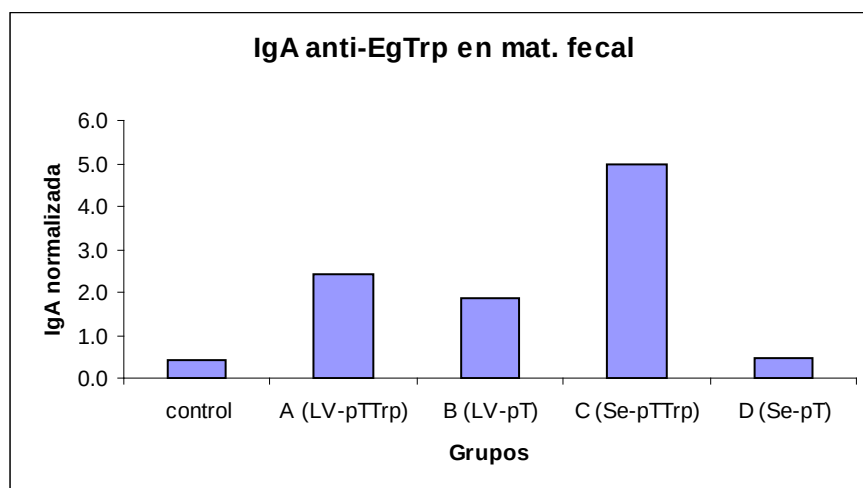


Figura 44. Ensayos de ELISA para detección de respuesta de IgA anti-EgTrp en materia fecal de ratones. Se grafica IgA normalizada con respecto a IgA total versus grupo de ratones. Cada barra corresponde a la mediana de un grupo en el día 43 p.i., excepto el grupo control (día 0). Los datos se analizan mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney U, considerando diferencias significativas cuando $p < 0.05$.

El grupo LV-pTTrp (A) presenta un nivel de IgA secretoria anti-EgTrp significativamente mayor que el grupo control no inoculado, y el nivel del grupo Se-pTTrp (C) comparado con el mismo grupo control es aún mayor. De esta forma, el grupo Se-pTTrp (C) generaría una respuesta significativamente mayor (el doble) que el grupo LV-pTTrp (A).

Por otro lado la respuesta de IgA anti-EgTrp del grupo A es significativamente mayor que la del grupo LV-pT (B), y la del grupo C también es significativamente mayor que la del grupo control Se-pT (D).

Por lo tanto, si bien ambas construcciones generan una buena respuesta de IgA secretoria anti-EgTrp, la construcción Se-pTTrp (C) generaría una mejor respuesta que la construcción LV-pTTrp (A).

3. 2. 3. Respuesta de IgG anti-TetC

Para analizar si al expresarse la proteína de fusión TetCEgTrp se afecta o modifica la respuesta anti-TetC producida por los grupos controles, o sea si la proteína recombinante TetC-EgTrp se expresa de manera similar que el fragmento TetC en

ambas cepas, se estudia la respuesta de IgG anti-TetC de los cuatro grupos en diferentes días post-inoculación, los resultados se muestran en la figura 45.

Tanto en el grupo LV-pTTrp (A) como LV-pT (B) se aprecia un aumento significativo de la respuesta humoral anti-TetC en los días 22 y 29 en relación a los días 0 p.i. correspondientes.

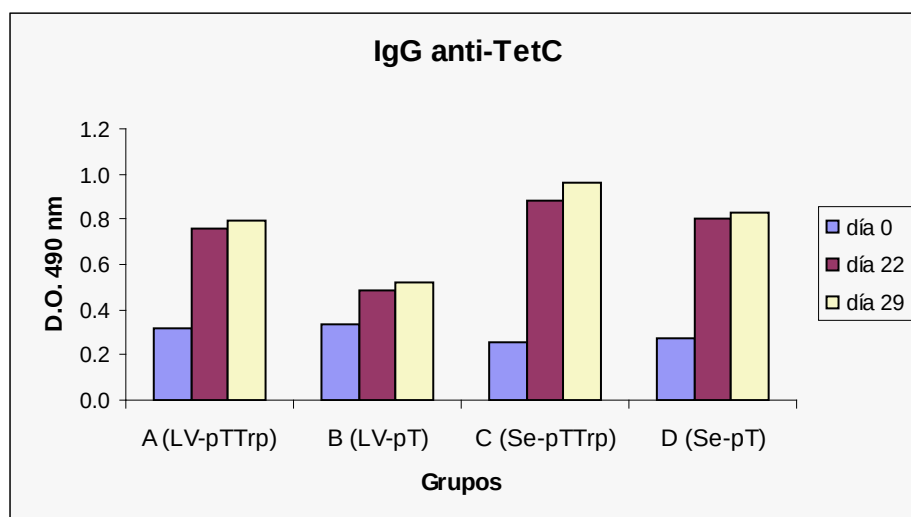


Figura 45. Ensayos de ELISA para detección de IgG total anti-TetC.

Cada barra corresponde a la mediana de un grupo en un día p.i. determinado.

Los datos se analizan mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney U, considerando diferencias significativas cuando $p < 0.01$.

Los niveles de IgG anti-TetC del grupo LV-pTTrp (A) y LV-pT (B) en el día 0 no presentan diferencias significativas, siendo estos grupos comparables; y en los días 22 y 29 p.i. se observa una respuesta significativamente mayor en el grupo LV-pTTrp (A) respecto al LV-pT (B). Parecería que la presencia del antígeno EgTrp fusionado a TetC favoreciera la expresión o presentación de la proteína recombinante cuando se utiliza las construcciones de LVR01.

Este fenómeno no se observa cuando se utiliza la cepa Se795aroA, ya que los grupos Se-pTTrp (C) y Se-pT (D) no presentan diferencias significativas cuando se comparan sus niveles en los días 0, 22 y 29 p.i..

En los grupos Se-pTTrp (C) y Se-pT (D) se aprecia un aumento significativo de la respuesta de IgG anti-TetC en los días 22 y 29 p.i. con respecto a los días 0 p.i. respectivos.

Por otro lado, no existen diferencias significativas de respuesta entre el grupo A y C en el día 0, 22 y 29 p.i., en tanto el grupo D presenta una respuesta significativamente mayor que el grupo B en el día 22 y 29 p.i..

De esta manera, sugerimos que las construcciones con la cepa Se795aroA originarían una mejor respuesta de IgG anti-TetC que las de la cepa LVR01, excepto si LVR01 expresa la fusión TetCEgTrp (grupo A) en cuyo caso las respuestas se igualarían.

3. 2. 4. Respuesta de IgA anti-TetC

La figura 46 describe los niveles de IgA anti-TetC encontrados en las heces de los ratones de cada grupo, en el día 43 p.i.; y el nivel del grupo control que corresponde a ratones no inoculados. El grupo LV-pT (B) no presenta diferencias significativas con el grupo control, mientras que en los grupos LV-pTTrp (A), Se-pTTrp (C) y Se-pT (D) se observa una respuesta significativamente mayor que en el grupo control.

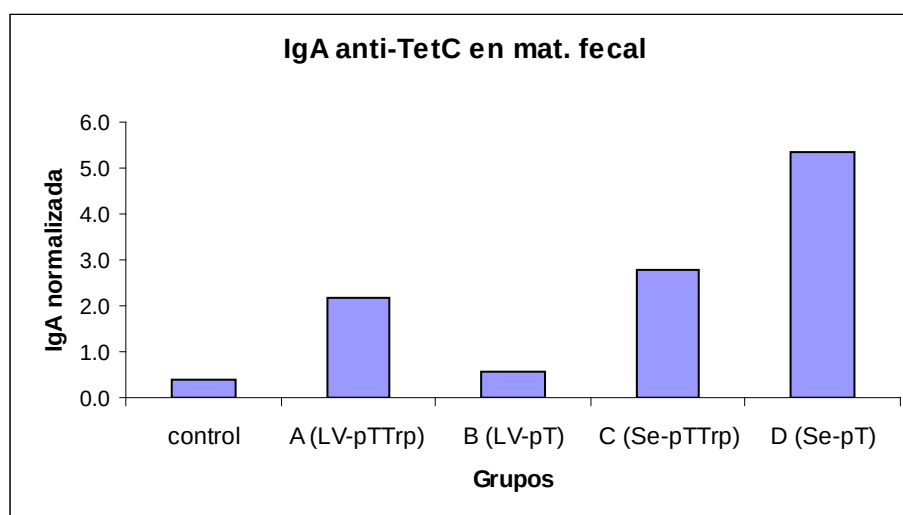


Figura 46. Ensayos de ELISA para detección de respuesta de IgA anti-TetC en materia fecal de ratones. Se grafica IgA normalizada con respecto a IgA total versus grupo. Cada barra corresponde a la mediana de un grupo en el día 43 p.i., excepto el grupo control (día 0). Los datos se analizan mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney U, considerando diferencias significativas cuando $p < 0.05$.

La respuesta de IgA anti-TetC del grupo LV-pTTrp (A) es significativamente superior que la del grupo LV-pT (B), aquí se repite la tendencia observada anteriormente, donde parecería que la presencia del antígeno EgTrp en las construcciones con LVR01 aumentara de alguna manera la respuesta inmune contra la proteína recombinante, en particular contra TetC. Esto no ocurre con las construcciones con Se795aroA, ya que los grupos C y D no presentan diferencias significativas. Sería necesaria la repetición del ensayo para poder confirmar esta hipótesis.

Los niveles de los grupos LV-pTTrp (A) y Se-pTTrp (C) no presentan diferencias significativas, mientras que la respuesta de D es significativamente superior a la del grupo B.

La respuesta de IgA anti-TetC en materia fecal sigue la misma tendencia que la respuesta de IgG anti-TetC en sangre.

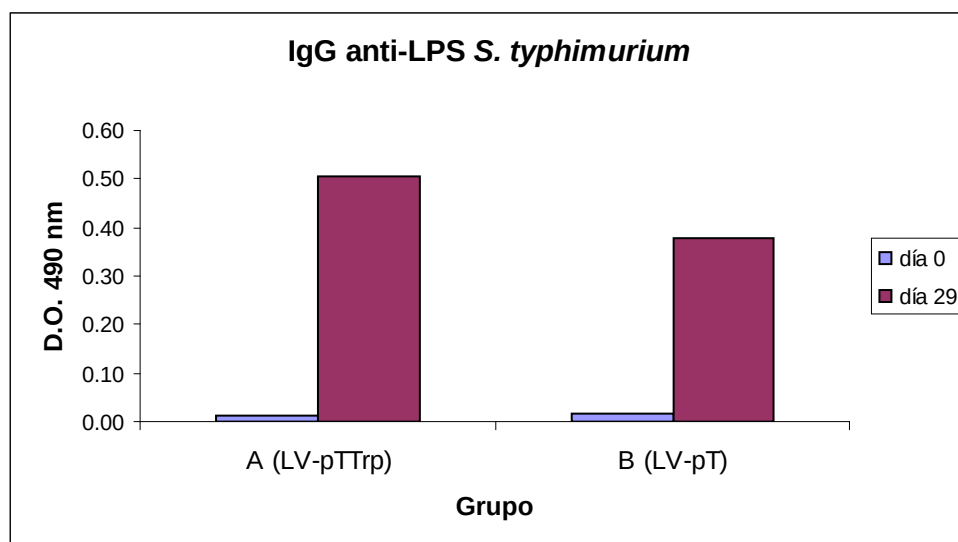
De manera similar las construcciones con la cepa Se795aroA originan una mejor respuesta de IgA anti-TetC que las de la cepa LVR01, excepto cuando ésta última expresa la fusión TetCEgTrp en cuyo caso las respuestas se igualan.

3. 2. 5. Respuesta de IgG anti-LPS

Finalmente se detecta los niveles de IgG anti-LPS de ambas cepas de *Salmonella*, estos resultados se muestran en la figura 47 A y 47 B. Recuérdese que la cepa LVR01 es una cepa de *S. typhimurium*, mientras que la cepa Se795aroA es una cepa de *S. enteritidis*. Del análisis estadístico de los datos que originan la figura 47 A, se concluye que la repuesta de IgG anti-LPS de *S. typhimurium* del grupo LV-pTTrp (A) en el día 29 es significativamente mayor que la del día 0 p.i.. Algo similar ocurre en el grupo B, donde el nivel del día 29 es superior que el del día 0 p.i.. La respuesta anti-LPS del grupo A en el día 29 p.i. es significativamente mayor que la del grupo B en ese día.

Del análisis de los datos que generan la figura 47 B se desprende que el grupo Se-pTTrp (C) presenta una respuesta de IgG anti-LPS de *S. enteritidis* significativamente mayor en el día 29 respecto al día 0 p.i.. También en el grupo Se-pT (D) existe un aumento significativo de la respuesta en el día 29 con respecto al día 0 p.i.. Al comparar los niveles del grupo Se-pTTrp (C) y Se-pT (D) en el día 29 no se aprecia diferencia significativa.

A



B

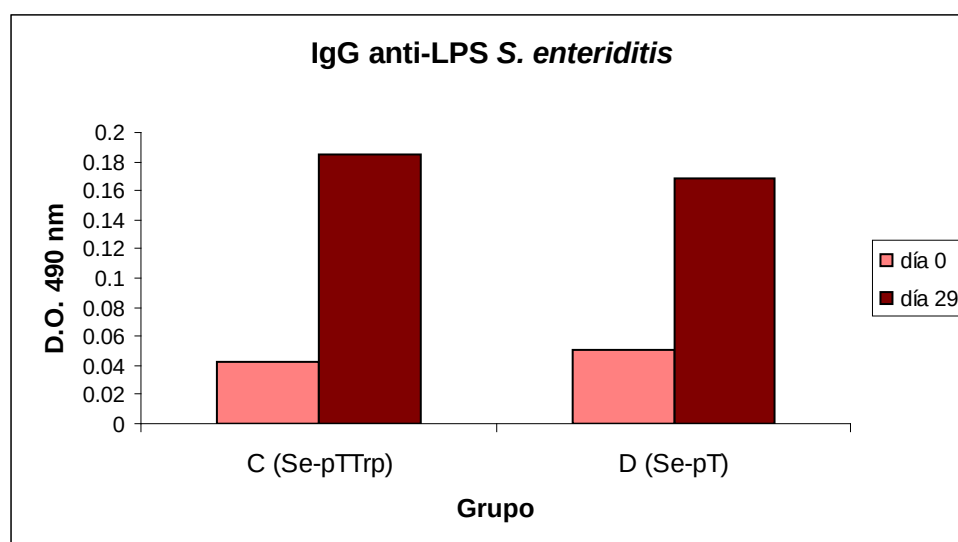


Figura 47. Ensayos de ELISA para detección de IgG total anti-LPS.

En el gráfico 47 A se representa los niveles de las cepas recombinantes de *S. typhimurium* (grupos LV-pTTrp y LV-pT), y en el gráfico 47 B los niveles de las construcciones de *S. enteriditis* (grupos Se-pTTrp y Se-pT).

Cada barra corresponde a la mediana de un grupo en un día post-inoculación determinado.

Los datos se analizan mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney U, considerando diferencias significativas cuando $p < 0.05$.

Basándonos en estos resultados, sugerimos que en los cuatro grupos las bacterias recombinantes ingresan al organismo y generan una buena respuesta humoral de IgG anti-LPS.

Por otro lado, parecería que la presencia de EgTrp como fusión a TetC en la cepa LVR01 (grupo LV-pTTrp), de alguna manera facilitaría este ingreso y/o presentación, cuando se la compara con el grupo LV-pT. Las figuras 45, 46 y 47 apoyarían esta hipótesis.

El segundo ensayo de inmunización básicamente confirmó los resultados del primero y nos permitió comparar dos construcciones Se-pTTrp (grupo C) y LV-pTTrp (grupo A) (LVR01: cepa derivada de perro). Se-pTTrp produjo una mejor respuesta de IgA anti-EgTrp que LV-pTTrp, mientras que los niveles de IgG anti-EgTrp, IgG anti-TetC e IgA anti-TetC fueron similares.

Curiosamente las respuestas IgG anti-TetC e IgA anti-TetC del grupo LV-pT (B) fueron considerablemente menores que las del grupo Se-pT (D). Estos resultados nos permiten sugerir que la construcción LV-pT no lograría generar una inmunidad anti-TetC tan buena como Se-pT, probablemente debido a una menor expresión del fragmento TetC.

Discusión

Tropomiosina de *Echinococcus granulosus*

Obtención de ADNc completo y su análisis

A partir de un clon que contenía un fragmento de ADNc de la tropomiosina de *Echinococcus granulosus* (EgTrp) y utilizando la secuencia de la tropomiosina de *E. multilocularis*, se clonó mediante RT-PCR, el ADNc correspondiente a una de las isoformas del gen *EgTrp* desde el codón ATG hasta el codón de terminación (TGA). Así se obtuvo un fragmento de ADN de 855 pb con un marco abierto de lectura que codifica para 284 AA, generando una proteína con una masa molecular de 32971.55 Da y un punto isoeléctrico teórico de 4.63.

El análisis de la secuencia aminoacídica reveló un 99% de similitud con la tropomiosina de *E. multilocularis* (TPM), 87% con la tropomiosina de *Schistosoma japonicum* (SjcTM), 86% con la tropomiosina de *S. mansoni* (TMI), 73% con la tropomiosina de *Caenorhabditis elegans* (CeTMI), 73% con la tropomiosina de *Onchocerca volvulus* (Ov-tmy-1) y 73% con la tropomiosina de *Drosophila melanogaster* (Tm1 isoforma J). La comparación con las α -tropomiosinas de vertebrados arroja porcentajes de similitud levemente menores (alrededor del 70%), indicándonos un alto grado de conservación a lo largo de la escala zoológica.

De acuerdo a la estructura secundaria predicha de EgTrp usando algoritmos computacionales, ésta presentaría 84.15% (239 AA) de estructura en α -hélice y 12.68 % (36 AA) adoptaría una estructura con enrollamientos al azar (ver figura 9). Esta estructura coincide con una posible estructura α -helicoidal típica de este tipo de proteínas. Por otro lado, EgTrp presenta el patrón típico de heptapéptidos de estructura “coiled coil” (ver figura 10).

En base a lo expuesto no tenemos dudas que la secuencia codificante que hemos clonado de *E. granulosus* pertenece a la familia de la tropomiosina.

Debido a que el cebador 5' (Df5 nt directo) ha sido diseñado en base a la secuencia de la tropomiosina de *E. multilocularis* (TPM), la secuencia codificante de tropomiosina

obtenida presenta 15 pares de bases pertenecientes a al gen *TPM*. Basándonos en el alto porcentaje de identidad nucleotídica que presentan las secuencias de estas tropomiosinas (99.2 %), es muy probable que estas bases sean compartidas por ambos organismos. Esto podría ser confirmado mediante experimentos de 5'-RACEs (amplificación rápida de extremos de ADNc 5').

Isoformas del gen *EgTrp*

Debido a la existencia de isoformas de tropomiosina a lo largo de la escala zoológica con funciones específicas tanto en las células musculares como no-musculares, nos interesó la búsqueda de isoformas de tropomiosina en *E. granulosus* y el posterior estudio de los mecanismos de corte y empalme. Además, ensayos previos de *Western Blot* indicaban la existencia de varias isoformas de tropomiosina.

Iniciamos así el rastreo de posibles productos del procesamiento alternativo del transcrito primario mediante RT-PCR, utilizando diferentes combinaciones de cebadores correspondientes a los posibles exones de *EgTrp*. Esta búsqueda se vió limitada por: 1) las condiciones de amplificación y el par de cebadores utilizados, ya que podían determinar la amplificación de una o dos isoformas; 2) las concentraciones de los ADNc de las isoformas de tropomiosina, ya que no son equivalentes; sin duda la isoforma clonada anteriormente es la mayoritaria debido a que siempre se amplifica y con la mayor intensidad.

A pesar de estas limitaciones pudimos determinar dos nuevas isoformas además de la completada previamente. Se trató de optimizar el método utilizando ADNc enriquecido en tropomiosinas (ver materiales y métodos) y diferentes condiciones de amplificación pero sin embargo en varios casos donde debía amplificarse más de una isoforma, sólo se obtuvo un producto de PCR (por ejemplo PCR desde los exones 1 al 8, 1-7, 2-8, 2-7, etc.).

Probablemente muchas veces no pudimos visualizar más de un producto de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, debido a la baja sensibilidad de este método. Este tipo de visualización era necesaria para la posterior purificación del ADN y secuenciación, razón por la cual no recurrimos a técnicas más sensibles como es la electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con

nitrate de plata. Algunas veces recurrimos a reacciones de reamplificación que, a nuestro juicio, no siempre son convenientes.

La RT-PCR presenta las ventajas de bajo costo, rapidez y sencillez, y como aproximación a la constatación de un mecanismo de procesamiento alternativo es muy acertado (Smith y cols., 1996). No podemos afirmar que no existan más isoformas de tropomiosina. El estudio del patrón de procesamiento alternativo también podría ser abordado mediante ensayos de protección de nucleasa S1, pero este análisis además de ser más complejo es más costoso (Smith y cols., 1996). También se podría realizar un rastreo de una biblioteca de ADNc de *E. granulosus* con sondas diferenciales de las diferentes isoformas, o con una sonda común a las isoformas obtenidas. Mediante el secuenciado de los clones obtenidos se podrían confirmar las isoformas determinadas y encontrar nuevas. Otra opción sería el rastreo de la biblioteca con el anticuerpo anti-EgTrp disponible.

Es así como obtuvimos tres isoformas a partir del gen *EgTrp*, la isoforma A, la B y la C. La isoforma A de 284 AA (32975 Da) suponemos que es la más abundante ya que es la que se amplifica mayoritariamente en todos los casos. La misma está integrada por los exones 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6C, 7 y 8; y se corresponde con la secuencia codificante clonada en primer lugar.

La isoforma B de 230 AA (26500 Da) está formada por los exones 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7 y 8. Su secuencia codificante está contenida en el exón 1 terminando en el codón de terminación (TGA) del exón 6B, de modo que parte del exón 6B y los exones 6C, 7 y 8 forman parte de su región 3' no traducida (3'UTR). Se analizó la secuencia del exón 6B después del codón TGA (342 pb), utilizando el programa blastx, no encontrándose similitud con ninguna proteína. Tampoco se encontró ningún marco abierto de lectura en los 342 pb analizados utilizando el programa GeneRunner. La región codificante del exón 6B tiene 51 nucleótidos, seguida del codón de terminación y de 342 nts de secuencia no codificante que forma parte de la región 3'UTR de la isoforma B.

Se analizó la posibilidad de que el codón TGA codificara para una selenocisteína. Estos aminoácidos son inusuales y se han encontrado solamente en algunas enzimas (Agorio y cols., 2003; Copeland, 2003). Igualmente se buscaron posibles elementos señal de

incorporación de selenocisteína (SECIS) en el 3' UTR del ADNc de la isoforma B, río abajo del codón TGA, mediante el programa <http://genome.unl.edu/SECISearch.html>. El elemento SECIS se define por una secuencia nucleotídica característica que forma una estructura secundaria en horquilla en el ARNm impidiendo que prosiga la traducción, esta pausa permite la incorporación de selenocisteína mediante un proceso co-traducciona. No se encontraron elementos SECIS en la secuencia de ADNc de la isoforma B de la tropomiosina, por lo tanto sugerimos con firmeza que este TGA es un codón de terminación.

Un proceso similar se observa en el procesamiento alternativo del transcrito primario del gen *mTm I* de *Drosophila melanogaster*. Este gen de tropomiosina da lugar a dos isoformas, una embrionaria y otra torácica, que difieren solamente en 27 AA del extremo carboxilo terminal. La isoforma embrionaria contiene los exones 1, 2, 3, y 5 (el exón 4 salta). La presencia del codón de terminación TAA en el exón 5 determina que este exón codifique para los últimos 27 AA; el resto es secuencia no traducida. Por otro lado, la isoforma torácica contiene a los exones 1, 2, 3, 4, y 5, pero en el exón 4 existe otro codón de terminación de la traducción TAA que determina que el exón 4 codifique solamente para 27 AA, el resto de la secuencia es no codificante (Basi y cols., 1984).

Se postula que el extremo amino terminal de las tropomiosinas es más conservado debido a que interviene en el solapamiento cabeza-cola de la molécula cuando se polimeriza, mientras que el extremo carboxi terminal es más variable ya que participaría en la especialización funcional de la molécula (Basi y Storti, 1986).

Por último, la isoforma C de 244 AA (28147 Da) contiene al exón 1, 2, 3, 5, 6A, 6C, 7 y 8, y estos mismos exones se corresponden con su secuencia codificante.

Se concluye que de existir un único gen de tropomiosina en *E. granulosus*, los exones 4 y 6B sufren saltos alternativos en el procesamiento del transcrito primario. La isoforma A sufre el salto alternativo del exón 6B, mientras que en la isoforma C ocurre el salto del exón 4 y del 6B. La isoforma B presenta todos los exones pero la traducción termina en el codón de terminación ubicado en el exón 6B.

El exón 6B parecería tener un rol crítico en la determinación de la estructura primaria de las isoformas de la tropomiosina y seguramente en su función ya que determina que se traduzcan el exón 6B, o los exones 6C, 7 y 8.

Es llamativo además que cuando no salta el exón 6B tampoco lo hace el exón 4. Este hecho nos lleva a pensar que la regulación espacial y temporal de la expresión de la isoforma B es consecuencia de la inactivación de la maquinaria del procesamiento alternativo del transcrito primario.

Finalmente, la conservación de secuencia de las tres isoformas a nivel del extremo amino terminal, nos lleva a sugerir que intervendría en el solapamiento cabeza-cola de la molécula cuando se polimeriza. En cambio el extremo carboxi terminal sería más variable ya que participaría en la especialización funcional de la molécula, como postularon Basi y Storti para las isoformas de tropomiosina de *D. melanogaster* (Basi y Storti, 1986).

De forma complementaria abordamos el estudio de las posibles isoformas de tropomiosina en *E. granulosus* mediante la detección de las isoformas a nivel proteico y su correspondencia con la información obtenida a nivel de ARNm (ADNc).

A partir de un experimento de *Western Blot* con un suero anti-EgTrp se marcaron tres bandas proteicas de un extracto proteico total de protoescólices, cuyas masas moleculares aparentes no son coincidentes con las deducidas a partir de sus ARNm. Estas diferencias pueden ser explicadas por el uso de marcadores preteñidos, ya que estos sirven para la determinación de masas moleculares aproximadas. La unión de cromóforos a las proteínas del marcador de tamaño afecta el tamaño molecular aparente en una SDS-PAGE, aunque luego cada marcador es calibrado contra proteínas estándares no teñidas y se reporta el peso molecular aparente (información del fabricante Gibco). Un desfazaje de 5000 Da fue comprobado experimentalmente cuando determinamos la masa molecular real de la proteína EgTrp recombinante por espectrometría de masa MALDI-TOF.

Teniendo en cuenta la diferencia de tamaño (4500-5000 Da) entre la masa molecular real teórica y la masa molecular inferida a partir del gel desnaturizante en presencia de SDS, se sugiere que: la isoforma A correspondería a la banda de 37500 Da ya que es la más abundante (masa molecular teórica 32975 Da) y la banda inferior de 31000 Da podría corresponder a la isoforma B (masa molecular teórica 26500 Da).

La banda proteica superior de 41500 Da podría corresponder a una isoforma no identificada aún ya que su tamaño no coincidiría con las isoformas A, B, o C obtenidas anteriormente. La existencia de una isoforma mayor podría deberse a la existencia de exones en las regiones 5' y/o 3' del gen, no analizadas en este estudio, y/o al uso de promotores alternativos.

En este experimento no se observó una banda proteica esperada de aproximadamente 33000 Da que podría corresponder a la isoforma C (masa molecular teórica 28147 Da). Probablemente la expresión proteica de esta isoforma sea muy baja no detectándose señal mediante este método. Esto es coincidente con la baja señal de amplificación obtenida en los ensayos de RT-PCR (ver figura 13).

Para profundizar más este análisis sería necesario realizar un experimento de *Western Blot* a partir de una electroforesis en poliacrilamida bidimensional (2D-PAGE), utilizando un extracto proteico total de PEs como muestra. A pesar de que los puntos isoelectricos teóricos de las isoformas de tropomiosina descubiertas son similares (pIA: 4.63, pIB: 4.67, pIC: 4.60), el número de proteínas marcadas nos dará idea del número de isoformas de tropomiosina existentes dado la alta resolución de esta técnica. La identificación de cada isoforma resulta más precisa en tanto nos informa simultáneamente dos parámetros, la masa molecular y el punto isoelectrico. Finalmente, puede verificarse la existencia de más de una isoforma con masa molecular similar que en una dimensión no se visualizan.

Eventualmente, estas proteínas luego de ser identificadas por *Western Blot*, pueden ser extraídas de un gel de poliacrilamida bidimensional, para ser sometidas a espectrometría de masa MALDI-TOF. Mediante el análisis del patrón de péptidos obtenido luego de la digestión enzimática y la información de secuencia que se dispone, dichas isoformas pueden ser identificadas sin lugar a dudas.

No descartamos la posibilidad de realizar experimentos de inmunoprecipitación del extracto total de proteínas de PEs utilizando el suero anti-EgTrp disponible. Luego de la misma se realizaría una electroforesis en gel de poliacrilamida en una o dos dimensiones y *Western Blot* para separar e identificar las isoformas precipitadas, completando la identificación por espectrometría de masa.

La determinación de las isoformas de tropomiosina de *E. granulosus* abre nuevas puertas hacia el conocimiento de la biología de este parásito, permitiéndonos la identificación de moléculas claves que participan en mecanismos básicos, como pueden serlo la contracción muscular y el procesamiento alternativo. Además, este tipo de moléculas podrían ser blanco de drogas y vacunas.

Hasta el presente no se ha reportado la existencia de procesamiento alternativo del transcrito primario en *E. granulosus*, constituyéndose así en un nuevo campo de estudio.

Estructura génica de *EgTrp*

Se determinó el patrón exón-intrón del gen de tropomiosina de *Echinococcus granulosus* mediante PCR a partir de ADN_g utilizando la misma batería de cebadores que en los ensayos descritos anteriormente. La región estudiada, de 5674 pb, comienza en el codón de inicio de la traducción ATG en el exón 1 y termina en el último codón de terminación de la traducción TGA en el exón 8.

La región analizada de este gen contiene 10 exones: E1, E2, E3, E4, E5, E6A, E6B, E6C, E7 y E8; y siete intrones: I, II, III, IV, V, VI, VII. Se encuentra un codón de iniciación ATG (primer codón de E1) y dos de terminación (TGA). El primero de ellos se ubica dentro del exón 6B y el segundo es el último codón secuenciado del exón 8. Los exones 6A, 6B y 6C resultaron muy interesantes ya que son consecutivos, no encontrándose secuencias intrónicas entre ellos y el exón 6B sufriría saltos alternativos. Siguiendo un único marco abierto de lectura, E6B codifica para 17 AA hasta el codón de terminación de la traducción TGA; siguiendo hacia 3' presenta 342 pb de secuencia exónica no traducida. No tenemos elementos para desconocer al codón de terminación TGA como tal, ya que estos 342 nt fueron analizados, no encontrándose similitud con ninguna proteína ni elementos SECIS (indican inserción de selenocisteína) en la región río abajo al mismo.

Del análisis de secuencia se desprende que todos los intrones que hemos determinado contienen los sitios dador GT y aceptor AG en los límites exón-intrón, característicos de este tipo de procesamiento (Breathnach y Chambon, 1981). Exceptuando el sitio dador del intrón IV (en la base 2405), todos los sitios dadores (en el extremo 5' del intrón) se encuentran en un contexto consenso.

Los sitios aceptores (en los extremos 3' de los intrones) presentan regiones típicas de polipirimidinas de distinta extensión, río arriba del sitio AG. En particular en el intrón II y el intrón VII, los sitios aceptores se encuentran dentro de una secuencia consenso.

El análisis de secuencias consenso típicas del procesamiento alternativo confirma la existencia del salto alternativo del exón 4 y del exón 6B. Además, verifica que el mecanismo de regulación del procesamiento alternativo del transcrito primario es altamente conservado en metazoarios (Kabat y cols., 2006).

Las secuencias conservadas asociadas con el salto de exones en el procesamiento alternativo de exones han sido descritas en varios organismos (Miriami y cols., 2003). Estas secuencias consisten en motivos ricos en C ubicados río arriba del extremo 3' del intrón precedente al exón que salta, y en secuencias ricas en G ubicadas río abajo del extremo 5' del intrón posterior. Estos motivos consisten en 20 bases aproximadamente, y los motivos ricos en C en general no se solapan con los trectos de polipirimidinas mencionados anteriormente. Estos dos motivos son complementarios, sugiriendo la existencia de interacciones entre pares de bases que conducen al mecanismo que involucra una estructura secundaria para regular el salto de exones. Estas señales están presentes en el intrón anterior y posterior al exón 4 y en la secuencia anterior y posterior al exón 6B coincidente con secuencia exónica (ver figura 24).

Para poder afirmar que el procesamiento alternativo del transcrito primario, descrito por nosotros, es el mecanismo responsable de la generación de las isoformas de tropomiosina en *E. granulosus*, es necesario tener la certeza de que existe un único gen de tropomiosina en este organismo y que el mismo contiene las secuencias nucleotídicas encontradas en todas las isoformas obtenidas. Este tipo de análisis suele hacerse usando la técnica de *Southern Blot* sobre ADN genómico, pero requiere grandes cantidades de ADN. Dado que el material parasitario es escaso, optamos por un método basado en la PCR. En nuestro experimento de hibridización sobre amplificaciones de ADN_g se utilizó como molde productos de PCR a partir de ADN_g, amplificando la región E1-E5 y sondas radioactivas. De esta manera se comprueba que por lo menos los exones del 1 al 5 están incluidos en un único gen, recordando que el exón 4 está presente en las isoformas A y B pero no en la C. Si existieran dos genes para codificar este tipo de isoformas tendrían que marcarse dos bandas de ADN y esto no ocurrió.

En base a lo expuesto sugerimos que existe un único gen de tropomiosina (*EgTrp*) en este organismo. Para confirmar esta hipótesis será necesario realizar un experimento de *Southern Blot* clásico, y así determinar el número de genes de tropomiosina.

Por otro lado, el análisis expuesto anteriormente de la secuencia del gen *EgTrp* demuestra que este gen contiene a todos los exones encontrados en las tres isoformas obtenidas. La existencia de señales específicas de procesamiento alternativo apoya fuertemente la hipótesis de que estas tres isoformas surgen del gen *EgTrp* en estudio.

Estudios de expresión

El estudio de expresión proteica de la tropomiosina, fue también abordado a nivel de la localización de la expresión mediante inmunohistoquímicas e inmunotinciones *in toto* utilizando el suero anti-*EgTrp* previamente mencionado, que no discrimina entre las distintas isoformas.

Las secciones analizadas por inmunohistoquímica presentaron una fuerte señal a nivel de las ventosas de los PEs y una señal más tenue y ubicua.

La ausencia de señal en la capa germinativa apoya los estudios previos ya mencionados, según los cuales *EgTrp* es un gen de expresión diferencial, expresándose en PEs y no en la capa germinativa (Esteves y cols., 2003).

Las ventosas están formadas principalmente por células musculares e intervienen en la adhesión a las paredes del intestino delgado del hospedero definitivo, a las que se aferran fuertemente en la base de las vellosidades (Thompson, 1995).

La señal de las ventosas es consistente con la presencia de isoformas musculares de tropomiosina, mientras que la señal débil y generalizada podría corresponder a isoformas no-musculares.

La musculatura de PE comprende la musculatura superficial por debajo del tegumento, constituido de fibras musculares circulares y longitudinales y la musculatura interna, longitudinal que se extiende de la parte posterior del PE al borde posterior de la ventosa. Las fibras musculares sobrepasan así ligeramente el "cuello" a menudo encogido que delimita el cuerpo del escólex. Cuatro largos husos de fibras longitudinales se prolongan en la parte anterior del escólex, entre las cuatro ventosas, para su inserción en la base

del rostelo. También existe un sistema complejo de fibras musculares que aseguran la movilidad de las ventosas y del rostelo.

Otro tipo de musculatura existe en el interior de las ventosas, se encuentran fibras musculares superficiales circulares y longitudinales y fibras transversales que aseguran la contracción (Al Nahhas, 1988).

Sería interesante realizar inmunohistoquímicas por microscopía electrónica para profundizar este estudio, logrando determinar la localización intracelular de esta proteína y comprobar su interacción con otras proteínas como la actina mediante el uso de anticuerpos marcados diferencialmente.

Mediante inmunotinciones *in toto* se detectó una fuerte señal en la región apical correspondiente al rostelo y las ventosas (escolex), y en la región caudal donde se encuentra la zona peduncular. El cuerpo o soma basal al escolex presentó una señal más débil.

La localización de la señal a nivel caudal podría asociarse también a estructuras musculares. Los PEs se unen a la capa germinativa mediante el pedúnculo y luego éste desaparece, permaneciendo muchas veces esbozos del mismo a nivel caudal. Hemos observado mediante microscopía óptica *in vivo* que el pedúnculo posee movimiento, y suponemos que esta zona debe de ser rica en células musculares.

Llamativamente, no se observa señal en las inmunolocalizaciones *in toto* a nivel de las ventosas (región apical) cuando los PEs se encuentran invaginados. Esto nos indica que el suero no penetraría correctamente a nivel del tegumento apical cuando los protoescólices están invaginados. Este hecho se debe a la constitución diferencial del tegumento en la región apical y caudal y no a la ausencia de expresión en el PE invaginado.

Observando la morfología externa de los protoescólices evaginados se aprecian tres regiones diferentes: la región del soma que no presenta microtricas y está cubierta por elevaciones romas, las cuales se consideran como microtricas en desarrollo cubiertas por glicocaliz; la región del escolex que contiene las cuatro ventosas; y la región que

presenta las dos hileras de ganchos (rostelo). La región de las ventosas está recubierta por microtricas típicas de cestodes (Antoniou y Tselentis, 1993).

Las microtricas de los PEs evaginados en la región apical son más cortas (6 μm aprox.) y más finas que las de los PEs invaginados (7.5 μm aprox.). Los extremos libres de las microtricas luego de la evaginación son más finos y presentan una apariencia tipo picaporte. La morfología de estas microtricas sugiere que deben de tener un rol importante en el censado del ambiente. Las microtricas aparecen más cortas luego de la evaginación porque estarían bajo la influencia de estímulos químicos (Antoniou y Tselentis, 1993). Este tipo de microtricas más gruesas y largas podría dificultar la entrada del suero que en el PE invaginado debe además, atravesar dos veces el tegumento.

La expresión de la tropomiosina a nivel proteico coincide con la expresión de la misma a nivel de ARNm, de acuerdo a los experimentos de hibridización *in situ* realizados. Esto indica que la transcripción y la traducción ocurren en los mismos tipos celulares, coincidiendo espacialmente. Nuevamente se obtuvo señal a nivel de las ventosas y una señal más débil, y generalizada en el resto del PE.

Por lo tanto el patrón de expresión en ambos niveles es coincidente con una expresión muy fuerte a nivel de las ventosas y con una expresión más leve y generalizada en el resto del PE, pudiendo pertenecer ésta última señal a isoformas no-musculares.

En base a nuestros resultados podemos concluir que al menos alguna de las isoformas de tropomiosina estaría asociada a estructuras musculares, probablemente la forma mayoritaria (A). La expresión más tenue y ubicua podría deberse a una o más isoformas no-musculares, éstas podrían corresponder a la isoforma B y/o C. Este estudio podría profundizarse mediante ensayos de hibridización *in situ* utilizando como sonda las regiones diferenciales de las isoformas conocidas, buscando así la localización de la expresión de cada isoforma.

Expresión de EgTrp y EgFABP2 en cepas atenuadas de *Salmonella*

La vacunación constituye la mejor herramienta costo-eficacia para la profilaxis de enfermedades infecciosas. Las respuestas específicas de patógenos pueden ser estimuladas por infecciones previas o a través de la vacunación. Sin embargo hay enfermedades para las cuales no hay vacunas disponibles o si las hay, éstas no son completamente satisfactorias en términos de seguridad, eficacia y costos (Spreng y cols., 2006).

Las vacunas que son capaces de estimular no sólo la respuesta inmune sistémica sino también la de mucosas presentan varias ventajas. La estimulación de respuestas locales en la puerta de entrada podría proteger contra la infección y la enfermedad.

Es posible que vacunas basadas en cepas de *Salmonella* de laboratorio adaptadas al ratón sean incapaces de producir buenas respuestas inmunes en otras especies animales debido a la pobre colonización y persistencia en el tejido profundo, obligando a un reducido rango de huéspedes a algunos aislados de *Salmonella* (Stabel y cols., 1993). Para evitar este inconveniente y debido a que el candidato a vacunar contra la echinococcosis quística era el perro, Chabalgoity y colaboradores construyeron la cepa LVR01 como un mutante en *aroC* de *S. typhimurium* a partir de una cepa salvaje aislada originalmente de perro. Este mutante puede producir antígenos heterólogos generando respuesta inmune humoral y celular en perros vacunados oralmente (Chabalgoity y cols., 2001). De aquí surge la cepa LVR01 empleada en este trabajo.

En base a la información disponible y la posibilidad de vinculación con grupos con vasta experiencia en el tema, decidimos expresar los antígenos EgTrp y EgFABP2 de *Echinococcus granulosus* como fusiones C-terminales al fragmento C de la toxina del tétanos bajo la regulación del promotor *nirB* (plásmido pTECH2), en cepas vacunales atenuadas de *Salmonella*. Estas cepas presentan atenuaciones en la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos o en el gen de resistencia al estrés *htrA*.

El antígeno EgTrp fusionado a TetC presenta una mutación en una base que cambia el aminoácido 34 (aminoácido 141 de la secuencia codificante completa). Esta mutación probablemente fue introducida por la enzima Taq polimerasa en la reacción de PCR. El codón ATG (M) cambia por AAG (K), de manera que la secuencia aminoacídica

original "DERMA" cambia por "DERKA". Continuamos trabajando con esta construcción ya que consideramos que el cambio de un aminoácido probablemente no modificaría la respuesta inmune generada por el antígeno.

Luego del clonado de EgTrp y EgFABP2 en el plásmido pTECH2, logramos obtener una óptima expresión de ambas proteínas de fusión en una amplia batería de cepas atenuadas de *Salmonella*, siendo la misma mayor en la cepa Se795aroA para ambos casos. La proteína de fusión TetCEgFABP2 presenta una baja expresión en la cepa BRD726, mientras que en las cepas SL3261, C5aroD, C5htrA, LVR01 presenta una expresión intermedia.

Por otro lado, la proteína recombinante TetCEgTrp se expresa en niveles intermedios en las cepas SL3261, C5aroD, BRD726, C5htrA y LVR01.

La cepa LVR01 expresa ambos antígenos con buenos niveles aunque los mismos son menores que los de la cepa Se795aroA.

A pesar de que el desarrollo de cepas que portan plásmidos que codifican para genes heterólogos ha sido relativamente exitoso, un número de vacunas fallaron o presentaron una eficacia reducida porque la expresión del antígeno heterólogo era inestable. La estabilidad *in vivo* de la expresión del antígeno es esencial para la eficacia de la vacuna bacteriana recombinante (Spreng y cols., 2006).

Debido a esto llevamos a cabo estudios de estabilidad del plásmido *in vitro* e *in vivo*, seleccionándose en base al porcentaje de estabilidad a la cepa Se795aroA recombinante expresando EgTrp y EgFABP2, para realizar ensayos primarios de inmunización en ratones. Cabe destacar que en la mayoría de las cepas recombinantes se obtuvieron porcentajes de estabilidad menores para las construcciones pTECH2/EgFABP2 que para pTECH2/EgTrp.

Esto podría relacionarse con problemas de plegamiento observados en la purificación de EgFABP2 recombinante, donde ocurre la formación de cuerpos de inclusión por problemas de insolubilidad, una vez que es solubilizada es inestable, precipitando al poco tiempo.

Un comportamiento similar podría ocurrir en las *Salmonellas* recombinantes donde la expresión de la proteína de fusión podría ser tóxica para la bacteria obligándola a morir o a perder el plásmido, aumentando así el número de bacterias nativas y resultando una baja expresión de la proteína recombinante.

Estudios de inmunización en ratones

Los estudios de inmunización se realizaron en dos etapas, variando el número de ratones inmunizados, entre otros parámetros. Se analizó la respuesta inmune frente a las construcciones más estables, evaluando la respuesta de IgG contra los antígenos EgTrp o EgFABP2, TetC y LPS bacteriano. Se analizó así la respuesta anti-antígenos específicos, para determinar si estos antígenos estaban siendo expresados y eran detectados por el sistema inmune del ratón, la respuesta anti-TetC para confirmar la expresión y respuesta contra las proteínas recombinantes respectivas, la respuesta de IgG anti-LPS para determinar si las bacterias son vistas por el sistema inmune. Finalmente, se evaluó también la vía de inoculación más adecuada. Este conjunto de ensayos nos permiten inferir que la vía de inoculación oral es más adecuada que la intravenosa y que el antígeno TetCEgTrp se expresa mejor y/o es más inmunogénico que el TetCEgFABP2.

Por otro lado, se determina que la expresión de TetCEgTrp no afectaría la cantidad de bacterias vistas por el sistema inmune.

La vía de inoculación oral resulta ventajosa debido a su sencillez y a la posibilidad de generar inmunidad de mucosas en el nivel donde el parásito interactúa con el hospedero definitivo, el perro.

Más del 90% de las enfermedades infecciosas comunes acceden al huésped a través de membranas mucosas, este es el caso del *Echinococcus granulosus*. El sistema inmune de mucosas consiste de un camino integrado e intercomunicado de tejido linfoide, compuesto de sitios inductivos y efectores para la protección del huésped contra patógenos y provee señales positivas y negativas para la inducción y regulación de respuestas inmunes en ambos compartimentos de mucosas y sistémico luego de la exposición al antígeno. La ruta oral es la más común y más explorada entre las rutas de inmunización de mucosas (Spreng y cols., 2006).

La inmunización oral con vacunas de *Salmonella* recombinantes puede inducir respuestas de IgA contra antígenos heterólogos en el estómago, en saliva y en lavados bronquiales, indicando que la inmunización oral puede potencialmente generar

protección en sitios distantes de mucosas (Black y cols., 1987; Maskell y cols., 1987; Poirier y cols., 1988; Stabel y cols., 1990; Stabel y cols., 1991; Su y cols., 1992; Walker y cols., 1992; Dusek y cols., 1994; Simonet y cols., 1994; Redman y cols., 1995; Smerdou y cols., 1996; Fagan y cols., 1997; Wu y cols., 1997; Cortesy-Theulaz y cols., 1998; Gomez-Duarte y cols., 1998; 1999).

La construcción que expresa el otro antígeno, EgFABP2 no resultó adecuada bajo ningún punto de vista; fue poco estable, tal como lo demostraron los ensayos de estabilidad y las respuestas de IgG anti-EgFABP2 y anti-TetC. Varias son las razones que explicarían estos resultados. Por un lado, este antígeno demostró ser poco soluble cuando fue purificado a partir de *E. coli*, hecho por demás interesante ya que otras proteínas de la familia, como su homóloga EgFABP1, no se comportan de la misma manera. Probablemente el plegado de esta proteína en este sistema procariota no sea el correcto, razón por la cual tampoco se exprese adecuadamente en los sistemas *Salmonella*-pTECH2 empleados en este trabajo.

Por otro lado, se sugiere a través de la determinación de IgG anti-LPS que una alta proporción de bacterias recombinantes morirían o perderían el plásmido, aumentando así el número de bacterias nativas. Por último, las bajas respuestas anti-EgFABP2 y anti-TetC demostrarían la baja expresión de la proteína de fusión TetCEgFABP2.

Estos resultados nos guiaron hacia el segundo ensayo de inmunización con un mayor número de ratones, donde sólo utilizamos construcciones que expresan a TetC-EgTrp (Se795aroA y LVR01) y empleamos únicamente la vía de inoculación oral. La elección de LVR01 como vector no fue arbitraria; esta cepa está adaptada para infectar perros, uno de los hospederos de *E. granulosus*. Como se menciona anteriormente, pensar en una vacuna para cánidos resulta ventajoso ya que se cortaría el ciclo del parásito en el hospedero definitivo, impidiendo la producción de huevos infectivos; además, generalmente este hospedero consiste solamente en un animal, el perro.

Del estudio de la inmunidad de mucosas se desprende que ambas construcciones generarían una alta respuesta de IgA secretoria anti-EgTrp, sin embargo el grupo Se-pTTrp generó una mejor respuesta que el grupo LV-pTTrp.

Ambas construcciones generaron una buena respuesta de IgG anti-EgTrp hasta el día 44 p.i., con intensidad similar. Las construcciones con la cepa Se795aroA originarían una mejor respuesta humoral de IgG anti-TetC que las de la cepa LVR01, aunque las mismas se igualan cuando LVR01 expresa la fusión TetCEgTrp.

La respuesta de IgAs anti-TetC en materia fecal siguió la misma tendencia que la respuesta de IgG anti-TetC en sangre. De manera similar las construcciones con la cepa Se795aroA originarían una mejor respuesta de IgA anti-TetC que las de la cepa LVR01, excepto cuando LVR01 expresa la fusión TetCEgTrp en cuyo caso las respuestas se igualan. Esto nos sugiere que el antígeno EgTrp podría estar actuando como adyuvante cuando se utiliza la cepa LVR01, favoreciendo la respuesta humoral anti-TetC, o sea favorecería la expresión y/o presentación de la proteína de fusión TetCEgTrp en comparación con la proteína TetC. Este resultado tendría que ser confirmado mediante la repetición del ensayo.

En todos los grupos las bacterias recombinantes ingresaron al organismo generando una buena respuesta humoral de IgG anti-LPS.

La construcción Se-pT sería más adecuada como vector vacunal que LV-pT, ya que genera una mayor inmunidad anti-TetC probablemente debido a una mayor expresión del fragmento TetC.

Sin embargo, no olvidemos que la construcción LV-pTTrp genera una buena respuesta humoral anti-EgTrp en ratones y que la cepa LVR01 fue aislada de perro, ambas características convierten a esta construcción en un vector vacunal promisorio contra *E. granulosus* para ser evaluado en perros.

Queda pendiente el estudio de la respuesta inmune celular a través de ensayos de proliferación y medida de niveles de citoquinas, ya que se ha demostrado que antígenos heterólogos expresados en *Salmonella* pueden inducir respuestas específicas de células T (proliferación de linfocitos *in vitro*, producción de citoquinas por células T) (Brown y cols., 1987; Sadoff y cols., 1988; Schodel y cols., 1990; Yang y cols., 1990; Sjostedt y cols., 1992; Stabel y cols., 1993; Oyston y cols., 1995; Verma y cols., 1995; 1995a; Chabalgoity y cols., 1997; Karem y cols., 1997; Catmull y cols., 1999; Passetti y cols., 1999; Steger y cols., 1999).

Los antígenos heterólogos expresados en *Salmonella*, en la mayoría de los casos reportados, producen una clara respuesta de células T de tipo Th1 como lo indica la

producción de IFN- γ por las células T y la predominancia de la respuesta de anticuerpos IgG2a específica de antígeno (Schodel y cols., 1990b; Yang y cols., 1990; Xu y cols., 1995). Sin embargo, han sido reportadas respuesta de células T del tipo Th2, con altos niveles de IgG1 específico de antígeno y producción de IL-5 (Brett y cols., 1993; Chabalgoity y cols., 1997; Stager y cols., 1997; Wu y cols., 1997).

Recapitulando, parece alentador el uso de las cepas recombinantes Se795aroA-pTECH2/EgTrp y LVR01-pTECH2/EgTrp en ensayos de inmunización en perros, con el consiguiente desafío parasitario y estudios de protección, como posibles vacunas orales en cánidos contra la equinococcosis quística.

Expresión de EgTrp, EgFABP1 y EgFABP2 en el virus vaccinia Ankara (MVA)

En base al éxito obtenido en la erradicación de la rabia en los zorros de Bélgica, este trabajo abordó la construcción de virus vaccinia Ankara modificados (MVA) recombinantes que expresan antígenos de *Echinococcus granulosus*, para ser evaluados como vacunas orales en perros y así combatir la echinococcosis quística.

Basándonos en la información disponible, se aprecia que la construcción y uso de MVA recombinantes como candidatos vacunales es muy promisorio para varios tipos de enfermedades. Si bien no se ha reportado el uso de esta herramienta para expresión de antígenos de parásitos multicelulares, los resultados previos obtenidos en otros sistemas nos impulsaron para su uso.

De esta manera preparamos tres tipos de MVA recombinantes puros, verificando la presencia del gen de interés y la expresión del antígeno en cuestión. Cada recombinante expresa una proteína diferente de *E. granulosus*: EgTrp, EgFABP2 y EgFABP1. Mientras que las proteínas recombinantes EgTrp y EgFABP1 presentan altos niveles de expresión, la proteína EgFABP2 se expresa pobremente (ver figura 38), esto coincide con los bajos porcentajes de estabilidad que presentan las construcciones de *Salmonella* que expresan esta proteína y con la baja estabilidad proteica observada en la purificación de EgFABP2 recombinante.

Luego de la producción y purificación a gran escala se obtuvieron los recombinantes MVA-pSC11, MVA-pEgTrp y MVA-pEgFABP2 en Tris-HCl 1mM pH 9.0, con altos

títulos virales y a MVA-pEgFABP1 con un título menor, ya que falta terminar el último paso de producción.

Los títulos virales obtenidos permitirán realizar ensayos de inmunización en ratones o directamente en perros, ya que basándonos en el inóculo utilizado en los ensayos con zorros contra la rabia (Blancou y cols., 1986), se requeriría aproximadamente 10^8 ufp para inocular oralmente a cada perro.

Es necesario planificar un esquema de vacunación con el consiguiente estudio de la respuesta inmune humoral y celular, y el análisis de protección ante el desafío parasitario, para poder caracterizar estas construcciones. Las mismas son estables por largos períodos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pudiéndose obtener una alta producción viral en pocos días para nuevos ensayos.

Conclusiones y perspectivas

En base a la comparación de la secuencia codificante completa de EgTrp con otros miembros de la familia de tropomiosinas y al estudio de su estructura primaria y secundaria podemos concluir sin lugar a dudas que la secuencia que hemos clonado es una tropomiosina de *Echinococcus granulosus*.

Se obtuvieron tres isoformas del gen *EgTrp*: la isoforma A, la B y la C. La isoforma A suponemos que es la más abundante y está integrada por los exones 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6C, 7 y 8; correspondiéndose con la secuencia codificante clonada en primer lugar. La isoforma B está formada por los exones 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 6C, 7 y 8. Su secuencia codificante está contenida desde el exón 1 hasta el codón de terminación (TGA) del exón 6B, de modo que parte del exón 6B y los exones 6C, 7 y 8 forman parte de su región 3' no traducida. El análisis de esta región no codificante desde varias perspectivas confirmó la existencia de este codón de terminación como tal. Finalmente, la isoforma C contiene al exón 1, 2, 3, 5, 6A, 6C, 7 y 8, y estos mismos exones se corresponden con su secuencia codificante.

De existir un único gen de tropomiosina en *E. granulosus*, los exones 4 y 6B sufrirían saltos alternativos en el procesamiento del transcrito primario. La isoforma A sufre el salto alternativo del exón 6B, mientras que en la isoforma C ocurre el salto del exón 4 y del 6B. La isoforma B presenta todos los exones pero la traducción termina en el codón de terminación ubicado en el exón 6B. No descartamos la existencia de más isoformas. El estudio del patrón de procesamiento alternativo también podría ser abordado mediante ensayos de protección de nucleasa S1.

Se detectaron tres bandas reactivas de tropomiosinas a nivel proteico con un suero anti-EgTrp en lisados de PEs, dos de ellas se corresponderían con la isoforma A y B, mientras que la otra correspondería a una isoforma no identificada aún. La isoforma C obtenida a nivel del ADNc no se correlaciona con ninguna de las isoformas proteicas obtenidas.

Para completar el análisis de las isoformas de tropomiosina a nivel proteico, ya sea para confirmar las determinadas como para identificar nuevas, proponemos el análisis por espectrometría de masa extrayendo proteínas aisladas por electroforesis bidimensional

(2D-PAGE) y previamente identificadas por *Western Blot*, ya sea a partir de lisados proteicos de protoesclóides o de inmunoprecipitados.

La región del gen *EgTrp* dilucidada (5674 pb), comienza en el codón de inicio de la traducción ATG en el exón 1 y termina en el último codón de terminación de la traducción TGA. Esta región contiene 10 exones: E1, E2, E3, E4, E5, E6A, E6B, E6C, E7 y E8; y siete intrones: I, II, III, IV, V, VI, VII. Se encuentra un codón de iniciación ATG y dos de terminación (TGA). El primer codón TGA se ubica dentro del exón 6B y el segundo es el último codón secuenciado del exón 8. Es necesario confirmar los seis primeros aminoácidos del gen y de las isoformas determinadas, ya que corresponden a la secuencia de la tropomiosina de *E. multilocularis*.

Todos los intrones determinados contienen los sitios dadores GT y aceptor AG en los límites exón-intrón, característicos de este tipo de procesamiento.

El análisis de secuencias consenso típicas del procesamiento alternativo confirma la existencia del salto alternativo del exón 4 y del exón 6B. Verifica además, que el mecanismo de regulación del procesamiento alternativo del transcrito primario es altamente conservado en metazoarios.

Sugerimos que existiría un único gen de tropomiosina (*EgTrp*) en este organismo. Para confirmar esta hipótesis será necesario realizar un experimento de *Southern Blot* para determinar el número de genes de tropomiosina.

El patrón de expresión de la tropomiosina a nivel de la proteína y del ARNm es coincidente, con una expresión muy fuerte a nivel de las ventosas, consistente con la presencia de isoformas musculares de tropomiosina, y con una expresión más leve y generalizada en el resto del PE, que podría indicar la expresión de isoformas no-musculares.

Este estudio podría profundizarse mediante ensayos de hibridización *in situ* utilizando como sonda las regiones diferenciales de las isoformas conocidas, buscando así la localización de la expresión de cada isoforma.

La cepa de *Salmonella* Se795aroA presentó uno de los mayores niveles de expresión proteica tanto de la proteína de fusión TetCEgTrp como de TetCEgFABP2, mientras

que la cepa LVR01 expresa ambos antígenos con buenos niveles aunque menores que los de la cepa Se795aroA.

En base a los porcentajes de estabilidad se selecciona a la cepa Se795aroA recombinante expresando EgTrp y EgFABP2, para realizar ensayos de inmunización en ratones. En la mayoría de las cepas recombinantes se obtuvieron porcentajes de estabilidad menores para las construcciones pTECH2/EgFABP2 que para pTECH2/EgTrp.

De los ensayos de inmunización en ratones se concluye que la vía de inoculación oral es más adecuada que la intravenosa y que el antígeno TetCEgTrp se expresa mejor y/o es más inmunogénico que el TetCEgFABP2. Por otro lado, una alta proporción de bacterias que expresan TetCEgFABP2 morirían o perderían el plásmido, aumentando así el número de bacterias nativas vistas por el sistema y disminuyendo la expresión de la proteína de fusión TetCEgFABP2.

Finalmente concluimos que es recomendable el uso de las cepas recombinantes Se795aroA-pTECH2/EgTrp y LVR01-pTECH2/EgTrp en ensayos de inmunización en perros, con el consiguiente desafío parasitario y estudios de protección, como posibles vacunas orales en perros contra la equinococcosis quística.

Queda pendiente el estudio de la respuesta inmune celular a través de ensayos de proliferación y medida de niveles de citoquinas (proliferación de linfocitos *in vitro* y producción de citoquinas por células T).

Obtuvimos exitosamente tres tipos de MVA recombinantes puros, cada recombinante expresa una proteína diferente de *E. granulosus*: EgTrp, EgFABP2 y EgFABP1. Las proteínas recombinantes EgTrp y EgFABP1 presentan altos niveles de expresión, mientras que la proteína EgFABP2 se expresa pobremente.

Los recombinantes MVA-pSC11, MVA-pEgTrp y MVA-pEgFABP2 puros presentan altos títulos virales y MVA-pEgFABP1 puro posee un título menor, ya que falta terminar el último paso de producción. Estos títulos virales permitirán realizar ensayos de inmunización en ratones o directamente en perros. Es necesario planificar un esquema de vacunación con el consiguiente estudio de la respuesta inmune humoral y celular, y el análisis de protección ante el desafío parasitario, para poder caracterizar estas construcciones.

Bibliografia

Agorio A., Chalar C., Cardozo S. y Salinas G. (2003) Alternative mRNAs arising from trans-splicing code for mitochondrial and cytosolic variants of *Echinococcus granulosus* thioredoxin glutathione reductase. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 12920-8

Al Nahhas S. (1988) Tesis de doctorado: *Echinococcus multilocularis*: role des protoscolex dans l'obtention des kystes *in vivo* et *in vitro*. Université des Science et Techniques du Languedoc (Montpellier II)

Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. y Lipman D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402

Alvite G., Di Pietro S. M., Santomé J. A., Ehrlich R. y Esteves A. (2001) Binding properties of *Echinococcus granulosus* fatty acid binding protein. *Biochim. Biophys. Acta*. **1533**: 293-302

Anderson R. J., Hannan C. M., Gilbert S. C., Laidlaw S. M., Sheu E. G., Korten S., Sinden R., Butcher G. A., Skinner M. A. y Hill A. V. (2004) Enhanced CD8⁺ T cell immune responses and protection elicited against *Plasmodium berghei* malaria by prime boost immunization regimens using a novel attenuated fowlpox virus. *J. Immunol.* **172**: 3094-3100

Antoniou M. y Tselentis Y. (1993) Studies on *Echinococcus granulosus* using the scanning electron microscope. *Parasitol. Res.* **79**: 537-42

Anyanful A., Sakube Y., Takuwa K. y Kagawa H. (2001) The third and fourth tropomyosin isoforms of *Caenorhabditis elegans* are expressed in the pharynx and intestines and are essential for development and morphology. *J. Mol. Biol.* **313**: 525-37

Barry E. M., Gomez-Duarte O., Chatfield S., Rappuoli R., Pizza M., Losonsky G., Galen J. y Levine M. M. (1996) Expression and immunogenicity of pertussis toxin S1 subunit-tetanus toxin fragment C fusions in *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 908. *Infection and Immunity* **64**: 4172-81

Basi G. S., Boardman M. y Storti R. V. (1984) Alternative splicing of a *Drosophila* tropomyosin gene generates muscle tropomyosin isoforms with different carboxy-terminal ends. *Molecular and Cellular Biology* **4**: 2828-36

Basi G. S. y Storti R. V. (1986) Structure and DNA sequence of the tropomyosin I gene from *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Biological Chemistry* **261**: 817-27

Behbehani A. M. (1983) The smallpox story: life and death of an old disease. *Microbiol. Rev.* **47**: 455-509

Belyakov I. M., Moss B., Strober W. y Berzofsky J. A. (1999) Mucosal vaccination overcomes the barrier to recombinant vaccinia immunization caused by preexisting poxvirus immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 4512-7

Bennink J. R. y Yewdell J. W. (1990) Recombinant vaccinia viruses as vectors for studying T-lymphocyte specificity and function. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **163**: 153-84

Bisht H., Roberts A., Vogel L., Bukreyev A., Collins P. L., Murphy B. R., Subbarao K. y Moss B. (2004) Severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein expressed by attenuated vaccinia virus protectively immunizes mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 6641-46

Black R. E., Levine M. M., Clements M. L., Losonsky G., Herrington D., Berman S. y Formal S. B. (1987) Prevention of shigellosis by a *Salmonella typhi-Shigella sonnei* bivalent vaccine. *Journal of Infectious Disease* **155**: 1260-5

Blancou J., Kieny M. P., Lathe R., Lecocq J. P., Pastoret P. P., Soulebot J. P. y Desmettre P. (1986) Oral vaccination of the fox against rabies using a live recombinant vaccinia virus. *Nature* **322**: 373-5

Bowtell D. D., Saint R. B., Rickard M. D. y Mitchell G. F. (1984) Expression of *Taenia taeniaeformis* antigens in *Escherichia coli*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **13**: 173-185

Breathnach R. y Chambon P. (1981) Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **50**: 349-83

Brett S. J., Dunlop L., Liew F. Y. y Tite J. P. (1993) Influence of the antigen delivery system on immunoglobulin isotype selection and cytokine production in response to influenza A nucleoprotein. *Immunology* **80**: 306-12

Brochier B., Kieny M. P., Costy F., Coppens P., Bauduin B., Lecocq J. P., Languet B., Chappuis G., Desmettre P., Afiademanyo K., Libois R. y Pastoret P. P. (1991) Large-scale eradication of rabies using recombinant vaccinia-rabies vaccine. *Nature* **354**: 520-2

Brown A., Hormaeche C. E., Demarco De Hormaeche R., Winther M., Dougan G., Maskell D. J. y Stocker B. A. (1987) An attenuated *aroA Salmonella typhimurium* vaccine elicits humoral and cellular immunity to cloned β -galactosidase in mice. *Journal of Infectious Diseases* **155**: 86-92

Cabrera P. A., Irabedra P., Orlando D., Rista L., Harán G., Viñals G., Blanco M. T., Alvarez M., Elola S., Morosoli D., Moraña A., Bondad M., Sambrán Y., Heinzen T., Chans L., Piñeyro L., Pérez D. y Pereira I. (2003) National prevalence of larval echinococcosis in sheep in slaughtering plants *Ovis aries* as an indicator in control programmes in Uruguay. *Acta Tropica* **85**: 281-285

Cabrera P. A. (2005) Echinococcosis quística en Uruguay. *Parasitología Latinoamericana*, vol. 60, tomo 1: 99-100.

Capron A., Riveau G. J., Bartley P. B. y McManus D. P. (2002) Prospects for a schistosome vaccine. *Curr. Drug Targets: Immune Endocrinol. Metabol. Disord.* **2**: 281-290

- Carroll M. W., Overwijk W., Chamberlain R. S., Rosenberg S. A., Moss B. y Restifo N. P. (1997) Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara (MVA) as an effective recombinant vector: a murine tumor model. *Vaccine* **15**: 387-94
- Catmull J., Wilson M. E., Kirchhoff L. V., Metwali A. y Donelson J. E. (1999) Induction of specific cell-mediated immunity in mice by oral immunization with *Salmonella* expressing *Onchocerca volvulus* glutathione S-transferase. *Vaccine* **17**: 31-9
- Chabalgoity J. A., Khan C. M., Nash A. A. y Hormaeche C. E. (1996) A *Salmonella typhimurium htrA* live vaccine expressing multiple copies of a peptide comprising amino acids 8-23 of herpes simplex virus glycoprotein D as a genetic fusion to tetanus toxin fragment C protects mice from herpes simplex virus infection. *Molecular Microbiology* **19**: 791-801
- Chabalgoity J. A., Harrison J. A., Esteves A., Demarco De Hormaeche R., Ehrlich R., Khan C. M. y Hormaeche C. E. (1997) Expression and immunogenicity of an *Echinococcus granulosus* fatty acid-binding protein in live attenuated *Salmonella* vaccine strains. *Infection and Immunity* **65**: 2402-12
- Chabalgoity J. A., Moreno M., Carol H., Dougan G. y Hormaeche C. E. (2001) *Salmonella typhimurium* as a basis for a live oral *Echinococcus granulosus* vaccine. *Vaccine* **19**: 460-469
- Chakrabarti S., Brechling K. y Moss B. (1985) Vaccinia virus expression vector: coexpression of β -galactosidase provides visual screening of recombinant virus plaque. *Molecular and Cellular Biology* **5**: 3403-3409
- Chatfields S. N., Strahan K., Pickard D., Charles I. G., Hormaeche C. E. y Dougan G. (1992) Evaluation of *Salmonella typhimurium* strains harbouring defined mutations in *htrA* and *aroA* in the murine salmonellosis model. *Microb. Pathogen.* **12**: 145-151
- Chatfield S. N., Charles I. G., Makoff A. J., Oxe M. D., Dougan G., Pickard D. D., Slater D. y Fairweather N. F. (1992a) Use of the *nirB* promoter to direct the stable expression of heterologous antigens in *Salmonella* oral vaccine strains: development of a single-dose oral tetanus vaccine. *Bio/Technology N Y* **10**: 888-92
- Chatfield S. N., Fairweather N., Charles I., Pickard D., Levine M., Hone D., Posada M., Strugnell R. A. y Dougan G. (1992b) Construction of a genetically defined *Salmonella typhi* Ty2 *aroA*, *aroC*, mutant for the engineering of a candidate oral typhoid-tetanus vaccine. *Vaccine* **10**: 53-60
- Cohen C. y Parry D. A. D. (1990) Alpha-helical coiled coils and bundles: how to design an alpha-helical protein. *Proteins* **7**: 1-15
- Cooper H. L., Feuerstein N., Noda M. y Bassin R. H. (1985) Suppression of tropomyosin synthesis, a common biochemical feature of oncogenesis by structurally diverse retroviral oncogenes. *Mol. Cell Biol.* **5**: 972-83

Cooper G. L., Nicholas R. A., Cullen G. A. y Hormaeche C. E. (1990) Vaccination of chickens with a *Salmonella enteritidis aroA* live oral *Salmonella* vaccine. *Microb. Pathog.* **4**: 255-265

Copeland P. R. (2003) Regulation of gene expression by stop codon recoding: selenocysteine. *Gene* **312**: 17-25

Corthesy-Theulaz I. E., Hopkins S., Bachmann D., Saldinger P. F., Porta N., Haas R., Zheng-Xin Y., Meyer T., Bouzourene H., Blum A. L. y Kraehenbuhl L. P. (1998) Mice are protected from *Helicobacter pylori* infection by nasal immunization with attenuated *Salmonella typhimurium phoPc* expressing urease A and B subunits. *Infection and Immunity* **66**: 581-6

Cosma A., Nagaraj R., Buhler S., Hinkula J., Busch D. H., Sutter G., Goebel F. D. y Erfle V. (2003) Therapeutic vaccination with MVA-HIV-1 nef elicits Nef-specific T-helper cell responses in chronically HIV-1 infected individuals. *Vaccine* **22**: 21-9.

Crick F. H. C. (1953) The packing of α -helices: simple coiled-coils. *Acta Crystallogr.* **6**: 689-97

Dempster R. P., Harrison G. B. L. y Berridge M. V. (1995) Maternal transfer of protection from *Echinococcus granulosus* infection in sheep. *Res. Vet. Sci.* **58**: 197-202

Dempster R. P., Robinson C. M. y Harrison G. B. (1996) Parasite vaccine development: large-scale recovery of immunogenic *Taenia ovis* fusion protein GST-45W (B/X) from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Parasitol. Res.* **82**: 291-296

Dunne M., Al-Ramadi B. K., Barthold S. W., Flavell R. A. y Fikrig E. (1995) Oral vaccination with an attenuated *Salmonella typhimurium* strain expressing *Borrelia burgdorferi* OspA prevents murine Lyme borreliosis. *Infection and Immunity* **63**: 1611-4

Dusek D. M., Progulske-Fox A. y Brown T. A. (1994) Systemic and mucosal immune responses in mice orally immunized with avirulent *Salmonella typhimurium* expressing a cloned *Porphyromonas gingivalis* hemagglutinin. *Infectious and Immunity* **62**: 1652-7

Eckert J., Schantz P. M., Gasser R. B., Torgerson P. R., Bessonov A. S., Movessian S. O. y cols. (2001) Geographic distribution and prevalence. En: Eckert J., Gemmell M. A., Meslin F. X. y Pawlowski Z. S., editores. WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. Paris: Office International des Epizooties, p. 100-142

Elissondo M. C., Dopchiz M. C., Andresiuk M. V., Rossin M. A. y Denegri G. M. (2005) Estado actual de la quimioterapia experimental de la hidatidosis. *Parasitología Latinoamericana*, vol. 60, tomo 1: 109-110

Espenschied J., Lamont J., Longmate J., Pendas S., Wang Z., Diamond D. J. y Ellenhorn J. D. (2003) CTLA-4 blockade enhances the therapeutic effect of an attenuated poxvirus vaccine targeting p53 in an established murine tumor model. *J. Immunol.* **170**: 3401-07

Esteves A. (1996) Tesis de Doctorado: Búsqueda y caracterización de genes de expresión diferencial durante el desarrollo de *Echinococcus granulosus*. PEDECIBA, Facultad de Ciencias, UdelaR.

Esteves A., Joseph L., Paulino M. y Ehrlich R. (1997) Remarks on the phylogeny and structure of fatty acid binding proteins from parasitic platyhelminths. *Int. J. Parasitol.* **9**: 1013-23.

Esteves A., Señorale M. y Ehrlich R. (2003). A tropomyosin gene is differentially expressed in the larval stage of *Echinococcus granulosus*. *Parasitol. Res.* **89**: 501-502

Esteves A., Portillo V. y Ehrlich R. (2003a) Genomic structure and expression of a gene coding for a new fatty acid binding protein from *Echinococcus granulosus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1**: 26-34

Evans D. T., Chen L. M., Gillis J., Lin K. C., Harty B., Mazzara G. P., Donis R.O., Mansfield K. G., Lifson J. D., Desrosiers R. C., Galan J. E. y Johnson R. P. (2003) Mucosal priming of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in rhesus macaques by the *Salmonella* type III secretion antigen delivery system. *J. Virol.* **77**: 2400-09.

Fagan P. K., Djordjevic S. P., Chin J., Eamens G. J. y Walker M. J. (1997) Oral immunization of mice with attenuated *Salmonella typhimurium aroA* expressing a recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen (NrdF). *Infection and Immunity* **65**: 2502-7

Fields P. I., Swanson R. V., Haidaris C. G. y Hefron F. (1986) Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **83**: 5189-93

Franzen B., Linder S., Uryu K., Alaiya A. A., Hirano T., Kato H. y Auer G. (1996) Expression of tropomyosin isoforms in benign and malignant human breast lesions. *Br. J. Cancer.* **73**: 909-13

Fu Y., Martinez C., Chalar C., Craig P. S., Ehrlich R., Petavy A. F. y Bosquet G. (1999) A new potent antigen from *Echinococcus granulosus* associated with muscles and tegument. *Mol. Biochem. Parasitol.* **102**: 43-52

Fu Y., Saint-Andre Marchal I., Bosquet G. y Petavy A. F. (2000) Cellular immune response of lymph nodes from dogs following the intradermal injection of a recombinant antigen corresponding to a 66 kDa protein of *Echinococcus granulosus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **74**: 195-208

Garippa G., Varcasia A. y Scala A. (2004) Cystic echinococcosis in Italy from the 1950s to present. *Parassitología* **46**: 387-91

Garnier J., Gibrat J-F. y Robson B. (1996) GOR secondary structure prediction method version IV. En *Methods in Enzymology*, R.F. Doolittle Ed., vol 266, 540-553

Gemmell M. A. (1966) Immunological responses of the mammalian host against tapeworm infections. IV Species specificity of hexacanth embryos in protecting sheep against *Echinococcus granulosus*. *Immunology* **11**: 325-335

Gemmell M. A., Roberts M. G., Beard T. C., Campano Diaz S., Lawson J. R. y Nonnemaker J. M. (2001) Control of Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern. WHO/OIE, París, pag. 237.

Gomez-Duarte O. G., Galen J., Chatfield S. N., Rappuoli R., Eidels L. y Levine M. M. (1995) Expression of fragment C of tetanus toxin fused to a carboxyl-terminal fragment of diphtheria toxin *Salmonella typhi* CVD 908 vaccine strain. *Vaccine* **13**: 1596-602

Gomez-Duarte O. G., Lucas B., Yan Z. X., Panthel K., Haas R. y Meyer T. F. (1998) Protection of mice against gastric colonization by *Helicobacter pylori* by single oral dose immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* producing urease subunit A and B. *Vaccine* **16**: 460-71

Gomez-Duarte O. G., Bumann D. y Meyer T. F. (1999) The attenuated *Salmonella* vaccine approach for the control of *Helicobacter pylori*-related diseases. *Vaccine* **17**: 1667-73

Gonzalez-Aseguinolaza G., Nakaya Y., Molano A., Dy E., Esteban M., Rodriguez D., Rodriguez J. R., Palese P., Garcia-Sastre A. y Nussenzweig R. S. (2003) Induction of protective immunity against malaria by priming-boosting immunization with recombinant cold-adapted influenza and modified vaccinia Ankara viruses expressing a CD8⁺-T-cell epitope derived from the circumsporozoite protein of *Plasmodium yoelii*. *J. Virol.* **77**: 11859-66

Gordon A. M., Homsher E., y Regnier M. (2000) Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol. Rev.* **80**: 853-924

Greaser M. L. y Gergely J. (1971) Reconstitution of troponin activity from three protein components. *J. Biol. Chem.* **246**: 4226-33

Guarnera E. A. (2005) Echinococcosis quística: costos de la comunidad. *Parasitología Latinoamericana*, vol. 60, tomo 1: 101.

Gunning P. W., Schevzov G., Kee A. J. y Hardeman E. C. (2005) Tropomyosin isoforms: divining rods for actin cytoskeleton function. *TRENDS in Cell Biology* **15**: 333-41

Hanke P. D. y Storti R. V. (1988) The *Drosophila melanogaster* tropomyosin II gene produces multiple proteins by use of alternative tissue-specific promoters and alternative splicing. *Molecular and Cellular Biology* **8**: 3591-3602

Harrison G. B., Shakes T. R., Robinson C. M., Lawrence S. B., Heath D. D., Dempster R. P., Lightowlers M. W. y Rickard M. D. (1999) Duration of immunity, efficacy and safety in sheep of a recombinant *Taenia ovis* vaccine formulated with saponin or selected adjuvants. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **70**: 161-172

- Hashemitabar G. R., Razmi G. R. y Naghibi A. (2005) Trials to induce protective immunity in mice and sheep by application of protoscolex and hydatid fluid antigen or whole body antigen of *Echinococcus granulosus*. *J. Vet. Med.* **B 52**: 243-245
- Heath D. D. (1973) Resistance to *Taenia pisiformis* larvae in rabbits. Temporal relationships and the development phase affected. *Int. J. Parasitol.* **3**: 491-498
- Heath D. D., Lawrence S. B. y Yong W. K. (1979) Cross-protection between the cysts of *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena*, y *T. ovis* in lambs. *Res. Vet. Sci.* **27**: 210-212
- Heath D. D. y Lawrence S. B. (1981) *Echinococcus granulosus* cysts: early development *in vitro* in the presence of serum from infected sheep. *Int. J. Parasitol.* **11**: 261-266
- Heath D. D., Parmeter S. N., Osborn P. J. y Lawrence S. B. (1981) Resistance to *Echinococcus granulosus* infection in lambs. *J. Parasitol.* **67**: 797-799
- Heath D. D., Lawrence S. B. y Yong W. K. (1992) *Echinococcus granulosus* in sheep: transfer from ewe to lamb of "Are 5" antibodies and oncosphere-killing activity, but not protection. *Int. J. Parasitol.* **22**: 1017-1021
- Heath D. D. y Lawrence S. B. (1996) Antigenic polypeptides of *Echinococcus granulosus* oncospheres and definition of protective molecules. *Parasite Immunol.* **18**: 347-357
- Heath D. D., Jensen O. y Lightowlers M. W. (2003) Progress in control of hydatidosis using vaccination -a review of formulation and delivery of the vaccine and recommendation for practical use in control programmes. *Acta Trop.* **85**: 133-143
- Hendricks M. y Weintraub H. (1981) Tropomyosin is decreased in transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**: 5633-37
- Hernández Z., Cabrera P., Ferragut G., Irabuenza O., Irabedra P. y Orlando O. (2005) Echinococcosis quística en bovinos del litoral noroeste de Uruguay. *Parasitología Latinoamericana*, vol. 60, tomo 2: 274
- Hillyer G. V., García Rosa M. I., Alicea H. y Hernández A. (1988) Successful vaccination against murine *Schistosoma mansoni* infection with a purified 12 kDa *Fasciola hepatica* cross-reactive antigen. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **38**: 103-110
- Hillyer G. V. (2005) *Fasciola* antigens as vaccines against fascioliasis and schistosomiasis. *J. Helminthol.* **3**: 241-247
- Hodge J. W., Poole D. J., Aarts W. M., Gomez Yafal A., Gritz L. y Schlom J. (2003) Modified vaccinia virus Ankara recombinants are as potent as vaccinia recombinants in diversified prime and boost vaccine regimens to elicit therapeutic antitumor responses. *Cancer Res.* **63**:7942-49

Hoiseth S. K. y Stocker B. A. D. (1981) Aromatic dependent *Salmonella typhimurium* are nonvirulent and effective as live vaccines. *Nature* **291**: 238-239

Hone D., Attridge S., Van-Den-Bosch L. y Hackett J. (1988) A chromosomal integration system for stabilization of heterologous genes in *Salmonella* based vaccine strains. *Microbial Pathogenesis* **5**: 407-18

Hormaeche C. E., Khan C. M. A., Mastroeni P., Villareal B., Dougan G. y Chatfield S. N. (1995) En "*Molecular and clinical aspects of a vaccine development.*" (D. Ala'Aldeen, and Hormaeche C. E., ed.), pp. 119-153. John Wiley y Sons, Ltd., London.

Hou Chu K., Hang Wong S. y Leung S. C. P. (2000) Tropomyosin is the Mayor Mollusk Allergen: Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, Expression and IgE Reactivity. *Marine Biotechnology* **2**: 499-509

Jakobsson E., Alvite G., Bergfors T., Esteves A. y Kleywegt G. J. (2003) The crystal structure of *Echinococcus granulosus* fatty-acid-binding protein 1. *Biochim Biophys Acta*. **1**: 40-50

Jenkins R. E., Taylor M. J., Gilvary N. J. y Bianco A. E. (1998) Tropomyosin implicated in host protective responses to microfilariae in onchocerciasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **13**: 7550-5

Johnson K. S., Harrison G. B., Lightowlers M. W., O'Hoy K. L., Cogle W. G., Dempster R. P., Lawrence S. B., Vinton J. G., Heath D. D. y Rickard M. D. (1989) Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. *Nature* **338**: 585-587

Johnson K., Charles I., Dougan G., Pickard D., O'Gaora P., Costa G., Ali T., Miller I. y Hormaeche C. E. (1991) The role of a stress-response protein in *Salmonella typhimurium* virulence. *Molecular Microbiology* **5**: 401-7

Kabat J. L., Barberan-Soler S., McKenna P., Clawson H., Farrer T. y Zahler A. M. (2006) Intronic alternative splicing regulators identified by comparative genomics in nematodes. *PLoS Comput. Biol.* En prensa DOI: 10.1371/journal.pcbi.0020086.eor

Kagawa H., Sugimoto K., Matsumoto H., Inoue T., Imadzu H., Takuwa K. y Sakube Y. (1995) Genome structure, mapping and expression of the tropomyosin gene *tmy-1* of *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* **251**: 603-613

Karem K. L., Chatfield S., Kuklin N. y Rouse B. T. (1995) Differential induction of carrier antigen-specific immunity by *Salmonella typhimurium* vaccine live-vaccine strains after single mucosal or intravenous immunization of BALB/c mice. *Infection and Immunity* **63**: 4557-63

Karem K. L., Bowen J., Kuklin N. y Rouse B. T. (1997) Protective immunity against herpes simplex virus (HSV) type 1 following oral administration of recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strains expressing HSV antigens. *Journal of General Virology* **78**: 427-34

Khan C. M., Villareal-Ramos B., Pierce R. J., Riveau G., Demarco De Hormaeche R., McNeill H., Ali T., Chatfield S., Capron A., Dougan G. y Hormaeche C. E. (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 fusions to tetanus toxin fragment C in a live Aro-attenuated vaccine strain of *Salmonella*. *Journal of Immunology* **153**: 5634-42

Khan C. M., Villareal-Ramos B., Pierce R. J., Riveau G., Demarco De Hormaeche R., McNeill H., Ali T., Fairweather N., Chatfield S., Capron A., Dougan G. y Hormaeche C. E. (1994a) Construction, expression and immunogenicity of the *Schistosoma mansoni* P28 glutathione S-transferase as a genetic fusion to tetanus toxin fragment C in a live oral attenuated vaccine strain of *Salmonella*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **91**: 11261-5

Kieny M. P., Lathe R., Drillien R., Spohner D., Skory S., Schmitt D., Wiktor T., Koprowski H. y Lecocq J. P. (1984) Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature* **312**: 163-6

Klei T. R. (1997) Immunological control of gastrointestinal nematode infections. *Vet. Parasitol.* **72**: 507-516

Knox D. P. (2000) Development of vaccines against gastrointestinal nematodes. *Parasitology* **120**: S43-S61

Knox D. P., Redmond D. L., Skuee P. J. y Newlands G. F. (2001) The contribution of molecular biology to the development of vaccines against nematode and trematode parasites of domestic ruminants. *Vet. Parasitol.* **101**: 311-335

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

Lalanne A. I. (2003). Tesis de maestría: Estudios moleculares del desarrollo de cestodos: genes *Hox* y *LIM*-homeobox de *Echinococcus granulosus* y *Mesocostoides corti*. PEDECIBA, Facultad de Ciencias, UdelaR.

Lawrence S. B., Heath D. D., Harrison G. B. L., Robinson C. M., Dempster R. P., Gatehouse T. K., Lightowers M. W. y Rickard M. D. (1996) Pilot field trial of a recombinant *Taenia ovis* vaccine in lambs exposed to natural infection. *N.Z. Vet. J.* **44**: 155-157

Leary S. E. C., Griffin K. F., Garmory H. S., Williamson E. D. y Titball R. W. (1997) Expression of an F1/V fusion protein in attenuated *Salmonella typhimurium* and protection of mice against plague. *Microbial Pathogenesis* **23**:167-79

Leavitt J., Ng S. Y., Aebi U., Varma M., Latter G., Burbeck S., Kedes L. y Gunning P. (1987) Expression of transfected mutant beta-actin genes: alterations of cell morphology and evidence for autoregulation in actin pools. *Mol. Cell Biol.* **7**: 2457-66

Lightowlers M. W., Lawrence S. B., Gauci C. G., Young J., Ralston M. J., Mass D. y Heath D. D. (1996) Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. *Parasite Immunol.* **18**: 457-462

Lightowlers M. W., Rolfe R. y Gauci C. G. (1996a) *Taenia saginata*: vaccination against cysticercosis in cattle with recombinant oncosphere antigens. *Exp. Parasitol.* **84**: 330-338

Lightowlers M. W., Jensen O., Fernandez E., Iriarte J. A., Woollard D. J., Gauci C. G., Jenkins D. J. y Heath D. D. (1999) Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep. *Int. J. Parasitol.* **29**: 531-534

Lightowlers M. W., Colebrook A. L., Gauci C.G., Gauci S. M., Kyngdon C. T., Monkhouse J. L., Vallejo Rodriguez C., Read A. J., Rolfe R. A. y Sato C. (2003) Vaccination against cestode parasites: anti-helminth vaccines that work and why. *Veterinary Parasitology* **115**: 83-123

Londono L. P., Chatfield S., Tindle R. W., Herd K., Gao X. M., Frazer I. y Dougan G. (1996) Immunization of mice using *Salmonella typhimurium* expressing human papillomavirus type 16 E7 epitopes inserted into hepatitis B virus core antigen. *Vaccine* **14**: 545-52

Mackett M., Smith G. L. y Moss B. (1982) Vaccinia virus: A selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**: 7415-9

Marsland B. J., Tisdall D. J., Heath D. D. y Mercer A. A. (2003) Construction of a recombinant orf virus that expresses an *Echinococcus granulosus* vaccine antigen from a novel genomic insertion site. *Arch. Virol.* **148**: 555-562

Martinez-Fernandez A. R., Nogal-Ruiz J. J., Lopez-Aban J., Ramajo V., Oleaga A., Manga-Gonzalez Y., Hillyer G. V. y Muro A. (2004) Vaccination of mice and sheep with Fh12 FABP from *Fasciola hepatica* using the new adjuvant/immunomodulator system ADAD. *Vet. Parasitol.* **3**: 287-98

Maskell D. J., Sweeney K. J., O'Callaghan D., Hormaeche C. E., Liew F. Y. y Dougan G. (1987) *Salmonella typhimurium aroA* mutants as carriers of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit to the murine secretory and systemic immune systems. *Microbial Pathogenesis* **2**: 211-21

Mastroeni P., Chabalgoity J. A., Dunstan S. J., Maskell D. J. y Dougan G. (2000) *Salmonella*: Immune responses and vaccines. *The Veterinary Journal* **161**: 132-164

Matsumura F., Lin J. J., Yamashiro-Matsumura S., Thomas G. P. y Topp W. C. (1983) Differential expression of tropomyosin forms in the microfilaments isolated from normal and transformed rat cultured cells. *J. Biol. Chem.* **258**: 13954-64

Mayr A., Stickl H., Muller H. K., Denner K. y Singer H. (1978) The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the

parenteral vaccination and behaviour in organisms with a debilitated defence mechanism. *Zentbl. Bacteriol. Hyg. B* **167**: 375-90

McConkey S. J., Reece W. H., Moorthy V. S., Webster D., Dunachie S., Butcher G., Vuola J. M., Blanchard T. J., Gothard P., Watkins K., Hannan C. M., Everaere S., Brown K., Kester K. E., Cummings J., Williams J., Heppner D. G., Pathan A., Flanagan K., Arulanantham N., Roberts M. T., Roy M., Smith G. L., Schneider J., Peto T., Sinden R. E., Gilbert S. C. y Hill A. V. (2003) Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans. *Nat. Med.* **9**: 729-35.

McGhee J. R., Mestecky J., Dertzbaugh M. T., Eldridge J. H., Hirasawa M., y Kiyono H. (1992) The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* **10**: 75-88

McSorley S. J., Xu D. y Liew F. Y. (1997) Vaccine efficacy of *Salmonella* strains expressing glycoprotein 63 with different promoters. *Infection and immunity* **65**: 171-8

Medina E., Guzman C. A., Staendner L. H., Colombo M. P. y Paglia P. (1999) *Salmonella* vaccine carrier strains: effective delivery system to trigger anti-tumor immunity by oral route. *European Journal of Immunology* **29**: 693-9

Miller I. A., Chatfield S., Dougan G., Desilva L., Joysey H. S. y Hormaeche C. E. (1989) Bacteriophage P22 as a vehicle for transducing cosmid gene banks between smooth strains of *Salmonella typhimurium*: Use in identifying a role for *aroD* in attenuating virulent *Salmonella* strains. *Mol. Gen. Genet.* **215**: 312-316

Miriami E., Margalit H. y Sperling R. (2003) Conserved sequence elements associated with exon skipping. *Nucleic Acid Research* **31**: 1974-1983

Moorthy V. S., Pinder M., Reece W. H., Watkins K., Atabani S., Hannan C., Bojang K., McAdam K. P., Schneider J., Gilbert S. y Hill A. V. (2003) Safety and immunogenicity of DNA/modified vaccinia virus Ankara malaria vaccination in African adults. *J. Infect. Dis.* **188**: 1239-44

Moss B. y Flexner C. (1987) Vaccinia virus expression vectors. *Ann. Rev. Immunol.* **5**: 305-24

Moss B. (1996) Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 11341-8

Mulryan K., Ryan M. G., Myers K. A., Shaw D., Wang W., Kingsman S. M., Stern P. L. y Carroll M. W. (2002) Attenuated recombinant vaccinia virus expressing oncofetal antigen (tumor-associated antigen) 5T4 induces active therapy of established tumors. *Mol. Cancer Ther.* **1**: 1129-37

Mwau M., Cebere I., Sutton J., Chikoti P., Winstone N., Wee E. G., Beattie T., Chen Y. H., Dorrell L., McShane H., Schmidt C., Brooks M., Patel S., Roberts J., Conlon C., Rowland-Jones S. L., Bwayo J. J., McMichael A. J. y Hanke T. (2004) A human

immunodeficiency virus 1 (HIV-1) clade A vaccine in clinical trials: stimulation of HIV-specific T-cell responses by DNA and recombinant modified vaccinia virus Ankara (MVA) vaccines in humans. *J. Gen. Virol.* **85**: 911-9

Newton S. E. y Munn E. A. (1999) The development of vaccines against gastrointestinal nematode parasites, particularly *Haemonchus contortus*. *Parasitol. Today* **15**: 116-122

Nicholas K. B. y Nicholas H. B.jr. (1997) GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignment. Distributed by the author, <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>.

Oxer M. D., Bently C. M., Doyle J. G., Peakman T. C., Charles I. G. y Makoff A. J. (1991) High level heterologous expression in *E. coli* using the anaerobically-activated *nirB* promoter. *Nucleic Acids Research* **19**: 2889-92

Oyston P. C., Williamson E. D., Leary S. E., Eley S. M., Griffin K. F. y Titball R. W. (1995) Immunization with live recombinant *Salmonella typhimurium aroA* producing F1 antigen protects against plague. *Infection and Immunity* **63**: 563-8

Pacheco L. G. C., Zucconi E., Mati V. L. T., García R. M., Miyoshi A., Oliveira S. C., De Melo A. L. y Azevedo V. (2005) Oral administration of a live *Aro* attenuated *Salmonella* vaccine strain expressing 14-kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein induced partial protection against experimental schistosomiasis. *Acta Tropica* **95**: 132-42

Panicali D. y Paoletti E. (1982) Construction of poxviruses as cloning vectors: Insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**: 4927-31

Pasetti M. F., Anderson R. J., Noriega F. R., Levine M. M. y Sztein M. B. (1999) Attenuated *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 915 as a live vector utilizing prokaryotic or eukaryotic expression systems to deliver foreign antigens and elicit immune responses. *Clinical Immunology* **92**: 76-89

Paulino M., Esteves A., Vega M., Tabares G., Ehrlich R. y Tapia O. (1998) Modelling a 3D structure for EgDf1 from *Echinococcus granulosus*: putative epitopes, phosphorylation motifs and ligand. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **4**: 351-60

Perry S. V. (2001) Vertebrate tropomyosin: distribution, properties and function. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* **22**: 5-49

Pittenger M. F., Kazzaz J. A. y Helfman D. M. (1994) Functional properties of non-muscle tropomyosin isoforms. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**: 96-104

Poirier T. P., Kehoe M. A. y Beachey E. H. (1988) Protective immunity evoked by oral administration of attenuated *aroA Salmonella typhimurium* expressing cloned streptococcal M protein. *Journal of Experimental Medicine* **168**: 25-32

Portillo V. (1998) Tesis de maestría: Caracterización de los genes *EgFABP1* y *EgFABP2* y análisis de su expresión durante el desarrollo de *Echinococcus granulosus*. PEDECIBA, Facultad de Ciencias, Udelar.

Ramírez J. C., Gherardi M. M. y Esteban M. (2000) Biology of attenuated modified vaccinia virus Ankara recombinant vector in mice: virus fate and activation of B- and T-cell immune responses in comparison with the Western Reserve strain and advantages as a vaccine. *Journal of Virology* **74**: 923-33

Redman T.K., Harmon C. C., Lallone R. L. y Michalek S. M. (1995) Oral immunization with recombinant *Salmonella typhimurium* expressing surface protein antigen A of *Streptococcus sobrinus*: dose response and induction of protective humoral responses in rats. *Infection and Immunity* **63**: 2004-11

Roberts M., Chatfield S. N. y Dougan G. (1994) En "Novel delivery system for oral vaccines" (O.H.D.T., ed.), pp 27-58. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

Rochlitz C., Figlin R., Squiban P., Salzberg M., Pless M., Herrmann R., Tartour E., Zhao Y., Bizouarne N., Baudin M. y Acres B. (2003) Phase I immunotherapy with a modified vaccinia virus (MVA) expressing human MUC1 as antigen-specific immunotherapy in patients with MUC1-positive advanced cancer. *J. Gene Med.* **5**: 690-9

Romig T., Dinkel A. y Mackenstedt U. (2006) The present situation of echinococcosis in Europe. *Parasitology International* **55**: S187-S191

Sadjjadi S. M. (2006) Present situation of echinococcosis in the Middle East and Arabic North Africa. *Parasitol. Int.* **55** Suppl: S197-202

Sadoff J. C., Ballou W. R., Baron L. S., Majarian W. R., Brey R. N., Hockmeyer W. T., Young J. F., Cryz S. J., Ou J. y Lowell G. H. (1988) Oral *Salmonella typhimurium* vaccine expressing circumsporozoite protein protects against malaria. *Science* **240**: 336-8

Sambrook J., Fritsch E. F. y Maniatis S. T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor N.Y.

Santillán G. I. (2005) Diagnóstico de echinococcosis quística. *Parasitología Latinoamericana*, vol. 60, tomo 1: 104

Schevzov G., Vrhovski B., Bryce N. S., Elmir S., Qiu M. R., O'Neill G. M., Yang N., Verrills N. M., Kavallaris M. y Gunning P. W. (2005) Tissue-specific tropomyosin isoform composition. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **53**: 557-70

Schodel F., Enders G., Jung M. C. y Will H. (1990) Recognition of a hepatitis B virus nucleocapsid T-cell epitope expressed as a fusion protein with the subunit B of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin in attenuated *Salmonellae*. *Vaccine* **8**: 569-72

Shata M. T., Stevceva L., Agwale S., Lewis G. K. y Hone D. M. (2000) Recent advances with recombinant bacterial vaccine vectors. *Mol. Med. Today* **6**: 66-71

Simonet M., Fortineau N., Beretti J. L. y Berche P. (1994) Immunization with live *aroA* recombinant *Salmonella typhimurium* producing invasins inhibits intestinal translocation of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infection and Immunity* **62**: 863-7

Sjostedt A., Sandstrom G. y Tarnvik A. (1992) Humoral and cell-mediated immunity in mice to a 17-kilodalton lipoprotein of *Francisella tularensis* expressed by *Salmonella typhimurium*. *Infection and immunity* **60**: 2855-62

Smerdou C., Anton I. M., Plana J., Curtiss R. R. y Enjuanes L. (1996) A continuous epitope from transmissible gastroenteritis virus S protein fused to *E. coli* heat-labile toxin B subunit expressed by attenuated *Salmonella* induces serum and secretory immunity. *Virus Research* **41**: 1-9

Smith G. L., Mackett M. y Moss B. (1984) Recombinant vaccinia viruses as new live vaccines. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **2**: 383-407

Smith C. W. J., Gooding C., Roberts G. C. y Scadden D. J. (1996) En: *A laboratory guide to RNA: Isolation, Analysis, and Synthesis*; Analyzing patterns of alternative splicing, pp. 411-441. Editado por Paul A. Krieg, Wiley-Liss, Inc.

Spreng S., Dietrich G. y Weidinger G. (2006) Rational design of *Salmonella*-based vaccination strategies. *Methods* **38**: 133-43

Srinivasan J., Tinge S., Wright R., Herr J. C. y Curtiss R. R. (1995) Oral immunization with attenuated *Salmonella* expressing human sperm antigen induces antibodies in serum and the reproductive tract. *Biology of Reproduction* **53**: 462-71

Stabel T. J., Mayfield J. E., Tabatabai L. B. y Wannemuehler M. J. (1990) Oral immunization of mice with attenuated *Salmonella typhimurium* containing a recombinant plasmid which codes for production of a 31-kilodalton protein of *Brucella abortus*. *Infection and immunity* **58**: 2048-55

Stabel T. J., Mayfield J. E., Tabatabai L. B. y Wannemuehler M. J. (1991) Swine immunity to an attenuated *Salmonella typhimurium* mutant containing a recombinant plasmid which codes for production of a 31-kilodalton protein of *Brucella abortus*. *Infection and Immunity* **59**: 2941-7

Stabel T. J., Mayfield J. E., Morfitt D. C. y Wannemuehler M. J. (1993) Oral immunization of mice and swine with an attenuated *Salmonella choleraesuis* [Δ cya-12 Δ (crp-cdt)19] mutant containing a recombinant plasmid. *Infection and Immunity* **61**: 610-8

Stager S., Gottstein B. y Muller N. (1997) Systemic and local antibody response in mice induced by a recombinant peptide fragment from *Giardia lamblia* variant surface protein (VSP) H7 produced by a *Salmonella typhimurium* vaccine strain. *International Journal of Parasitology* **27**: 965-71

Steger K. K., Valentine P. J., Heffron F., So M. y Pauza C. D. (1999) Recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* stimulate lymphoproliferative responses to SIV capsid antigen in rhesus macaques. *Vaccine* **17**: 923-32

Stone D., Sodek J., Johnson P., Smillie L.B. (1975) Tropomyosin: correlation of amino acids sequences and structure. In: Proceedings of the IX Federation of European Biochemical Societies Meeting, Proteins of Contractile Systems. Biro, E.N.A. North Holland, Amsterdam, The Netherlands, pp. 125-136.

Strugnell R. A., Maskell D., Fairweather N., Pickard D., Cockayne A., Penn C. y Dougan G. (1990) Stable expression of foreign antigens from the chromosome of *Salmonella typhimurium* vaccine strains. *Gene* **88**: 57-63

Strugnell R., Dougan G., Chatfield S., Charles I., Fairweather N., Tite J., Li J. L., Beesley J. y Roberts M. (1992) Characterization of a *Salmonella typhimurium* aro vaccine strain expressing the P.69 antigen of *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity* **60**: 3994-4002

Su G. F., Brahmabhatt H. N., Wehland J., Rhode M. y Timmis K. N. (1992) Construction of stable LamB-Shiga toxin B subunit hybrids: analysis of expression in *Salmonella typhimurium* aroA strains and stimulation of B subunit-specific mucosal and serum antibody responses. *Infection and Immunity* **60**: 3345-59

Sutter G. y Moss B. (1992) Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 108947-51

Sutter G., Wyatt L. S., Foley P. L., Bennink J. R. y Moss B. (1994) A recombinant vector derived from the host-range-restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus. *Vaccine* **12**: 1032-40

Sweatman G. K., Williams R. J., Moriarty K. M. y Henshall T. C. (1963) On acquired immunity to *Echinococcus granulosus* in sheep. *Res. Vet. Sci.* **4**: 187-198

Taylor M. J., Jenkins R. E. y Bianco A. E. (1996) Protective immunity induced by vaccination with *Onchocerca volvulus* tropomyosin in rodents. *Parasite Immunol.* **5**: 219-25

Tendler M., Vilar M. M., Brito C. A., Freire N. M. S., Katz N. y Simpson A. (1995) Vaccination against schistosomiasis and fascioliasis with the new recombinant antigen Sm14-potential basis of a multivalent anti-helminth vaccine. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **90**: 255-256

Thompson J. D., Higgins D. G. y Gibson T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequences alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673-4680

Thompson R. C. A. (1995) Biology and Systematics of *Echinococcus* en: *Echinococcus* and Hydatid Disease. CAB International Publication, Oxford University Press, Oxford, England.

Thompson R. C. y McManus D. P. (2002) Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol.* **18**: 452-457

Titball R. W., Howells A. M., Oyston P.C. y Wiliamson E. D. (1997) Expression of the *Yersinia pestis* capsular antigen (F1 antigen) on the surface of an *aroA* mutant of *Salmonella typhimurium* induces high levels of protection against plague. *Infection and Immunity* **65**: 1926-30

Tobacman L. S. (1996) Thin filament-mediated regulation of cardiac contraction. *Annu. Rev. Physiol.* **58**: 447-81

Torgerson P. R., Oguljahan B., Muminov A. E., Karaeva R. R., Kuttubaev O. T., Aminjanov M. y Shaikenov B. (2006) Present situation of cystic echinococcosis in Central Asia. *Parasitol. Int.* **55** Suppl: S207-12

Verma N. K., Ziegler H. K., Wilson M., Khan M., Safley S., Stocker B. A. y Schoolnik G. K. (1995) Delivery of class I and class II MHC-restricted T-cell epitopes of listeriolysin of *Listeria monocytogenes* by attenuated *Salmonella*. *Vaccine* **13**: 142-50

Verma N. K., Ziegler H. K., Stocker B. A. y Schoolnik G. K. (1995a) Induction of a cellular immune response to a defined T-cell epitope as an insert in the flagellin of a live vaccine strain of *Salmonella*. *Vaccine* **13**: 235-44

Vrtala S., Grote M., Ferreira F., Susani M., Stocker B., Kraft D. y Valenta R. (1995) Humoral immune responses to recombinant tree pollen allergens (Bet v I and Bet v II) in mice: construction of a live oral allergy vaccine. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* **107**: 290-4

Walker M. J., Rohde M., Timmis K. N. y Guzman C. A. (1992) Specific lung mucosal and systemic immune responses after oral immunization of mice with *Salmonella typhimurium aroA*, *Salmonella typhi* Ty21a, and invasive *Escherichia coli* expressing recombinant pertussis toxin S1 subunit. *Infection and Immunity* **60**: 4260-8

Wang F. L., Wang Y., Wong W. K., Liu Y., Addivinola F. J., Liang P., Chen L. B., Kantoff P. W. y Pardee A. B. (1996) Two differentially expressed genes in normal human prostate tissue and in carcinoma. *Cancer Res.* **56**: 3634-7

Wang Z., La Rosa C., Maas R., Ly H., Brewer J., Mekhoubad S., Daftarian P., Longmate J., Britt W. J. y Diamond D. J. (2004) Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing a soluble form of glycoprotein B causes durable immunity and neutralizing antibodies against multiple strains of human cytomegalovirus. *J. Virol.* **78**: 3965-76.

Woollard D. J., Gauci C. G., Heath D. D. y Lightowers M. W. (1998) Epitope specificities and antibody responses to the EG95 hydatid vaccine. *Parasite Immunol.* **20**: 535-540

Woollard D. J., Heath D. D. y Lightowlers M. W. (2000) Assessment of protective immune responses against hydatid disease in sheep by immunization with synthetic peptide antigens. *Parasitology* **121**: 145-153

Woollard D. J., Gauci C. G. y Lightowlers M. W. (2000a) Synthetic peptides induce antibody against a host-protective antigen of *Echinococcus granulosus*. *Vaccine* **18**: 785-796

Woollard D. J., Gauci C. G., Heath D. D. y Lightowlers M. W. (2001) Protection against hydatid disease induced with the EG95 vaccine is associated with conformational epitopes. *Vaccine* **19**: 498-507

Wu S., Pascual D. W., Lewis G. K. y Hone D. M. (1997) Induction of mucosal and systemic responses against human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein 120 in mice after oral immunization with a single dose of a *Salmonella*-HIV vector. *AIDS Research and Human Retroviruses* **13**: 1187-94

Wyatt L., Shors S. T., Murphy B. R. y Moss B. (1996) Development of a replication-deficient recombinant vaccinia virus vaccine effective against parainfluenza virus 3 infection in an animal model. *Vaccine* **14**: 1451-8

Xu D., McSorley S. J., Chatfield S. N., Dougan G. y Liew F. Y. (1995) Protection against *Leishmania major* infection in genetically susceptible BALB/c mice by gp63 delivered orally in attenuated *Salmonella typhimurium* (AroA AroD). *Immunology* **85**: 1-7

Yang D. M., Fairweather N., Button L. L. McMaster W. R., Kahl L. P. y Liew F. Y. (1990) Oral *Salmonella typhimurium* (AroA-) vaccine expressing a major leishmanial surface protein (gp63) preferentially induces T helper 1 cells and protective immunity against leishmaniasis. *Journal of Immunology* **145**: 2281-5