

C*05. Este orden de frecuencias varía cuando se comparan los grupos con y sin patologías. La comparación estadística de éstas frecuencias arroja un aumento significativo en la distribución de los alelos HLA-B*35 y HLA-C*07 en pacientes con patología en comparación con aquellos asintomáticos ($p=0,040$ y $p=0,001$, respectivamente), lo que sugiere que estarían asociados a susceptibilidad a enfermedad. No se ha observado un aumento significativo en la presencia de alelos que pudiera ser asociado con protección frente al desarrollo de patologías. Se observó un aumento estadísticamente significativo en la CPV de los pacientes con el alelo A*31 en comparación con aquellos que poseían el alelo A*02. En Argentina, los alelos más frecuentes para los genes de HLA de clase I son A*02, B*35 y C*07, lo que concuerda con los resultados obtenidos. Dos alelos fueron asociados con susceptibilidad frente al desarrollo de patologías: B*35 y C*07. En Japón y Brasil el alelo HLA-A*02 se asoció con protección frente al desarrollo de patologías; si bien en nuestro estudio no se observa ésta asociación ($p=0.052$), es probable que si ocurra al aumentar el N poblacional. En este sentido, este alelo se encontró asociado a menores niveles de CPV en comparación con el resto, especialmente en relación al A*31. Sería importante analizar mayor número de casos y además, otros factores del sistema inmune en busca de marcadores para el desarrollo de patologías asociadas al HTLV-1.

10. Diseño y producción de vectores lentivirales para modular la expresión de genes involucrados en la inmunosupresión. Salcedo M; González Hermida P; Abrey Recalde J; Oliver J; Frecha, C. Instituto de Medicina Traslacional e Ingeniería Biomédica (IMTIB) CONICET- Instituto Universitario Hospital Italiano- Hospital Italiano, Buenos Aires.

La proteína STUB1 fue recientemente caracterizada como una enzima de tipo E3 ligasa, capaz de promover la degradación del factor de transcripción FOXP3 de manera específica. Es ampliamente conocido que FOXP3 tiene un rol clave en la diferenciación de células T regulatorias y por lo tanto en procesos de inmunosupresión. Además, se ha visto que STUB1 está sobreexpresada en algunas células tumorales cuya función en ellas es aún desconocida. Nos planteamos

investigar si la administración de STUB1 en células T podría tener un efecto en los niveles de inmunosupresión. Entre las herramientas de transferencia genética más adecuadas para la expresión de genes en células hematopoyéticas se encuentran los vectores lentivirales. El objetivo de este trabajo es diseñar un vector lentiviral de expresión de STUB1 humana. En primer lugar, se estudió la expresión de STUB1 en las líneas celulares tumorales HEK293T y HeLa. Por RT-PCR se comprobó la presencia de RNA mensajero de STUB1 en células derivadas de cáncer cérvico-uterino. A partir del diseño de primers específicos con sitios de enzimas de restricción se aisló el cDNA de STUB1 y se clonó en un plásmido lentiviral autoinactivable (SIN), río abajo del promotor ubicuo EF1alfa, seguido por una secuencia IRES y la secuencia del gen reportero GFP (LV-STUB1). Los plásmidos se amplificaron por transformación en bacterias E. Coli competentes (TOP10), seleccionándose los clones positivos por PCR colony. Posteriormente, se comprobó la presencia del inserto mediante corte con enzimas de restricción específicas y se confirmó la correcta secuencia y orientación del cDNA de STUB1 por secuenciación. Los vectores lentivirales se produjeron en células productoras HEK293T. Se realizó una cotransfección de tres plásmidos: plásmido empaquetador portando los genes gag-pol, plasmido que codifica para la envuelta del virus de la stomatitis vesicular (VSVG), y aquél con la secuencia de STUB1IRESGFP. Se optimizó el método de transfección utilizando el sistema PEI, en preferencia a otros sistemas testeados (CaCl₂, Lipofectamina). Los vectores lentivirales fueron recolectados al día 2 de la transfección y preservados -80 grados para su posterior utilización en células target. Se testó la eficiencia de transducción de las partículas lentivirales en células Jurkat E6-1. Los niveles de GFP se midieron por Citometría de Flujo, 72h post transducción. Los resultados obtenidos demuestran que el vector LV-STUB1 es capaz de transducir más del 35% de las células a una multiplicidad de infección de 0.5 vectores/célula (MOI: 0.5), sin afectar la viabilidad celular. Estos resultados sugieren que sería posible obtener una mayor expresión del transgén a MOIs más altas. Los próximos experimentos incluyen la validación funcional del transgén y la optimización del

vector para su utilización en modelos de inmunosupresión.

11. Diseño, expresión y presentación de antígenos recombinantes del virus de la hepatitis E sobre la superficie de partículas semejantes a bacterias para el desarrollo de una vacuna de subunidad.

Müller MF(1,2); Raya MF(1,2); Arce LP(1,2); Padilla Franzotti CL(1,2); Villena J (3); Vizoso Pinto MG(1,2). (1) Laboratorio de Biología de las Infecciones, Instituto de Investigaciones en Medicina Molecular y Celular Aplicada del Bicentenario (IMMCA), CONICET–Universidad Nacional de Tucumán-Sistema Provincial de Salud de Tucumán (SIPROSA); (2) Laboratorio Central de Cs. Básicas, Facultad de Medicina-Universidad Nacional de Tucumán; (3) Laboratorio de Inmunobiología, CERELA (CONICET), Tucumán.

La hepatitis E es una enfermedad aguda que se transmite por vía fecal-oral y generalmente es autolimitante pero en embarazadas está asociada a una elevada mortalidad (~20-30%). Su agente etiológico es un virus ARN monocatenario positivo (+ssRNA) cuyo genoma es de aprox. 7,2 Kb y pertenece a la familia Hepeviridae. La respuesta inmune contra el virus de la Hepatitis E se dirige principalmente contra la proteína de la cápside viral ORF2. El motivo lisina (LysM) es un motivo ubicuo en bacterias responsable de la unión no covalente de enzimas al peptidoglicano de la pared celular. Esta propiedad puede explotarse para diseñar vacunas que consisten en proteínas recombinantes fusionadas al dominio LysM, ancladas a la superficie de partículas similares a bacterias (BLP). Las BLP son micropartículas que se obtienen por tratamiento ácido/térmico de lactobacilos inmunomoduladores. Este tratamiento produce la muerte celular y expone el peptidoglicano de su pared aumentando la capacidad de unión a los motivos LysM sin afectar sus propiedades adyuvantes. Objetivos: clonar ORF2 del HEV genotipo 3 (genotipo circulante en Argentina) como una proteína de fusión con dominio LysM, generar BLP a partir de *L. rhamnosus* para utilizarlas como plataforma para exponer el antígeno de cápside de HEV. Métodos: se realizó una PCR anidada para amplificar el gen ORF2 y para introducir simultáneamente las secuencias attB en sus extremos. La BP Clonasa (Gateway) catalizó la

recombinación de este producto de PCR con un plásmido con sitios attP para generar clones de "Entrada". El siguiente paso consistió en una recombinación catalizada por LR clonasa que reconoce los sitios attL de este plásmido y los sitios attR del vector Destino (pENHAc-[rfB]) para entonces generar el plásmido de expresión pENHAc-ORF2 y transformar en *E. coli* Rosetta por shock térmico. Las BLP se obtuvieron de cultivos en MRS de 16 h de *L. rhamnosus*, concentrados y tratados con 0.1 M HCl durante 30 minutos en baño de agua hirviendo. Luego se lavó con PBS estéril y se concentró a 2,5 x 10¹⁰ BLP / ml. Para la unión de la proteína a la superficie de las BLP, el extracto crudo de la expresión se incubó con las BLP con rotación orbital durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se lavó con PBS estéril. Se evaluó la unión de las proteínas a las BLP mediante SDS-PAGE. Resultados: la expresión de ORF2-LysM se logró con una inducción de 3 h a 37° C con IPTG 0.5 mM. Fue posible purificar la proteína de cápside mediante la unión específica del dominio LysM al peptidoglicano expuesto en la superficie de las BLP. La proteína recombinante se une a las BLP como se demostró por SDS PAGE. Conclusión: Fue posible purificar la proteína ORF2-LysM utilizando BLP como matriz de afinidad. El antígeno expuesto sobre la superficie de BLP derivadas de bacterias inmunomoduladoras se utilizará para inmunizar ratones por vía oral para evaluar la capacidad de este complejo de generar inmunidad específica.

12. Obtención de anticuerpos de dominio único derivados de camélidos (nanoanticuerpos o VHH) que reconocen específicamente las partículas 146S de la cepa O1/campos del virus de la Fiebre Aftosa. Bozzo J; Marchese F; Gonzalez M; Seki C; Periolo O; Mattion N; Grippo V. CEVAN-CONICET-SENASA, Buenos Aires.

Argentina posee el estatus de libre de Fiebre Aftosa (FA) otorgado por la OIE con zonas diferenciadas por la aplicación o no de la vacuna (zonas libres con vacunación y libres sin vacunación). En cuanto a la calidad de la vacuna, el componente inmunogénico principal es la partícula viral intacta (146S), la cual puede disociarse en productos de degradación específicos (12S) reduciendo la potencia de la vacuna.