

and regulation of the polysaccharide metabolism is far from complete. The steps concerning glycogen synthesis were elucidated in Gram-negative bacteria and it was established that the committed step is given by the ADP-Glc PPase, an allosteric enzyme regulated by molecules from the main carbon assimilation route in the organism. The experimental work of this thesis mainly involved studies on the occurrence and regulation of glycogen synthesis in Gram positive bacteria. The focus was the molecular cloning and characterization of ADPGlc PPase from: i) the Firmicutes group (low G+C content), which representative microorganism is *Streptococcus mutans*; and ii) those orga-

nisms with high G+C content, particularly the *Streptomyces coelicolor* and *Mycobacterium tuberculosis*. The most relevant contribution of this work relies in establishing that ADPGlc PPase in Gram positive bacteria possesses regulatory and structural properties distinctive from those found for the enzyme from Gram negative bacteria, cyanobacteria, green algae and higher plants. Additionally, in this work they were obtained key molecular tools for future studies on structure regulation-relationship, allowing reaching a more comprehensive understanding of the distinctive characteristics of the enzyme in the different natural sources.

Estudio de la respuesta inmune, innata y adquirida, en equinos infectados con el Virus de la Anemia Infecciosa Equina

Alejandra Bailat

abailat@fbc.unl.edu.ar

Dra. Ileana Malan Borel

Laboratorio de Inmunología Básica

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

Universidad Nacional del Litoral

Fecha de la defensa: 01/03/2013

Resumen

El Virus de la Anemia Infecciosa Equina (VAIE) es un retrovirus que ocasiona una enfermedad persistente en equinos, cuya evolución es característica; de curso cíclico y dinámico, y culmina en una prolongada fase asintomática que perdura por el resto de la vida del huésped. Esta etapa de la Anemia Infecciosa Equina implica un estado de equilibrio permanente entre la infección viral y el sistema inmune del animal.

En equinos cursando la etapa de portador inaparente, se observó que una inmunodepresión transitoria traía como consecuencia la recrudescencia de la infección, aumentando la replicación viral y generando un nuevo pico febril. Sin embargo, al restituirse el sistema inmunológico, disminuía la viremia y los equinos volvían al estado asintomático. A partir de estas observaciones, se le asignó al sistema inmune un papel fundamental en el control de la replicación viral en este estadio de la infección. Sin embargo, los mecanismos inmunológicos involucrados en la manutención de este delicado equilibrio no están dilucidados.

El objetivo del presente trabajo consistió en analizar la participación de receptores celulares y citoquinas, pertenecientes tanto a la inmunidad innata como adaptativa, en

la respuesta inmune que se desarrolla en equinos que cursan la etapa asintomática de la infección por el VAIE.

Con este fin se investigó, mediante transcripción reversa seguida de PCR semicuantitativa, la expresión basal de TLR4 y su correceptor MD-2, como así también las citoquinas, IFN- α , TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-4 y TGF- β , en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) provenientes de animales infectados y de animales sanos. Por otra parte, mediante inmunohistoquímica se estudió la expresión de TLR4, IFN- γ y TGF- β en hígado y bazo, órganos considerados reservorio viral durante la etapa asintomática de la AIE. En ambos estudios se analizó si la condición de portador inaparente de los equinos VAIE(+) podría traer aparejada una alteración en dicha expresión. Los resultados de la expresión basal de receptores y citoquinas en PBMC de animales infectados mostraron que los equinos en etapa asintomática de la infección expresan niveles de dichas moléculas comparables a los hallados en equinos no infectados, a excepción de la citoquina antiviral IFN- α , la cual estaría disminuida en los animales VAIE(+). Con respecto a la expresión en órganos reservorio, se detectaron niveles disminuidos de IFN- γ en el bazo de equinos VAIE(+), en relación a lo hallado en equinos VAIE(-). Las otras dos moléculas investigadas en hígado y bazo presentaron niveles comparables a los hallados en animales sanos. Respecto a estos resultados, sería interesante estudiar los mecanismos regulatorios que podrían estar actuando en esta etapa de la enfermedad, los cuales parecerían estar frenando la expresión de citoquinas frecuentemente elevadas en respuestas antivirales. Por otra parte, lo hallado aporta información novedosa para el estudio de la

respuesta inmune durante la etapa asintomática de la infección, ya que no existen en la bibliografía estudios al respecto.

Se evaluó, por otra parte, la capacidad de los receptores de la familia TLRs, de reconocer secuencias conservadas del VAIE. Para ello se realizó una estimulación *in vitro* de CD derivadas de médula ósea murina, con el péptido gp90, el cual representa una región conservada de la glicoproteína gp90 del VAIE. Los resultados mostraron que, en las condiciones evaluadas, la secuencia viral de la proteína de envoltura representada por dicho péptido, no sería reconocida por receptores de la familia TLR. Al respecto, sería de gran interés realizar estudios de estimulación *in vitro* empleando la proteína nativa o bien partículas virales infectivas, lo cual incluiría el análisis de otros ligandos de TLR, además de permitir evaluar la participación de las regiones glicosiladas en la interacción proteína-receptor.

Finalmente, con el objetivo de analizar la respuesta inmune celular en la etapa asintomática de la infección por VAIE, se estudió la secreción de citoquinas y la expresión de receptores en PBMC, en respuesta al estímulo específico con secuencias virales conservadas contenidas en los péptidos gp90 y gp45. Los resultados mostraron diferencias entre los equinos asintomáticos seleccionados, habiéndose obtenido respuestas que iban desde aquellas comparables a de equinos VAIE(-), pasando por respuestas con un perfil de citoquinas compartido Th1/Th2 hasta, finalmente, respuestas con un perfil claramente Th1, con altos niveles de IL-12 e IFN- γ . Estos resultados evidencian la complejidad del estudio de infecciones lentivirales en especies animales no endocriadas y además están de acuerdo con investigaciones realizadas en otras infecciones retrovi-

rales, respecto de los perfiles de citoquinas, la variabilidad entre individuos y su relación con la progresión de la enfermedad.

Study of the innate and acquired immune responses in horses infected with Equine Infectious Anemia Virus

Summary

The Equine Infectious Anemia Virus (EIAV) causes persistent disease in horses that is characterized by lethargy and chronic anemia. Equine Infectious Anemia (EIA) has a cyclical and dynamic evolution, in which the animals remain free of clinical symptoms but become life-long EIAV carriers. Studies of unapparent carrier stage showed that a transient immunosuppression led to recrudescence of infection, increasing the viral replication rate and generating a new fever spike. However, when the equine immune system was reconstituted, the viremia decreased and horses returned to the asymptomatic stage. From these observations, a key role in controlling viral replication at this stage of infection was assigned to the immune system. However, the immunological mechanisms involved in maintaining this delicate balance have still not been elucidated.

The objective was to analyze the involvement of cellular receptors and cytokines belonging to both innate and adaptive immunity in the immune response that develops in horses during the asymptomatic stage of EIAV infection.

Using reverse-transcription followed by semiquantitative-PCR, we investigated the basal expression of TLR-4, MD-2, IFN- α , TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-4 and TGF- β in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from infected and healthy animals. Moreover, through immunohistochemistry we stu-

died the expression of TLR4, IFN- γ and TGF- β in liver and spleen because these organs are considered viral reservoirs. The results of the basal expression of cytokine and receptors in PBMC from infected animals showed that the levels were comparable to those found in uninfected horses, except for the antiviral cytokine IFN- α , which would be reduced in EIAV(+) animals. Regarding the expression in reservoir organs, decreased levels of IFN- γ in the spleen of EIAV(+) equines were detected, while TLR4 and TGF- β levels were comparable to those found in healthy animals. Accordingly, it would be interesting to study the regulatory mechanisms that might be acting at this stage of EIA, which seem to down-regulate the expression of antiviral cytokines. Moreover, our findings provide novel information for the study of the immune response during the asymptomatic phase of infection, since there are no references in the literature.

The ability of innate immunity receptors, specifically of the TLR family, to recognize conserved sequences of EIAV was assessed. For that purpose, murine bone marrow derived-dendritic cells were stimulated *in vitro* with gp90 peptide, which represents a conserved region of the gp90 glycoprotein of EIAV. The results showed that the viral sequence represented by this peptide would not be recognized by TLRs. Accordingly, it would be of interest to conduct *in vitro* stimulation studies using the native protein or infectious viral particles, which would include the analysis of other TLR ligands and would allow us to evaluate the involvement of glycosylated regions in the receptor-protein interaction.

Finally, to explore the cellular response in the asymptomatic stage of EIA, we studied

cytokines and receptor expression in PBMC in response to specific stimulation with conserved viral sequences contained in gp90 and gp45 peptides. The results showed differences between the asymptomatic horses selected, with responses that ranged from those similar to responses obtained in EIAV(-) equines, through responses with a shared Th1/Th2 cytokine profile, to respon-

ses with a clear Th1 profile, with high levels of IL-12 and IFN- γ . These results demonstrate the complexity of the study of lentiviral infections in outbred animal species and are also in agreement with research on other retroviral infections in terms of cytokine profiles, the relationship of cytokine profiles with disease progression and variability between individuals.

Desarrollo de un inmunógeno prototípico para el control de mastitis bovinas causadas por *Staphylococcus aureus*

Camussone Cecilia María

camussone.cecilia@inta.gob.ar

Luis Fernando Calvinho, PhD

Dr. Iván Marcipar

Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. INTA. Ruta 34, Km 227. (2300) Rafaela, Santa Fe. Argentina.

Área de Investigación en Producción Animal
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas
Universidad Nacional del Litoral

Fecha de la defensa: 25/03/13

Resumen

La mastitis bovina es la enfermedad del ganado lechero que causa las mayores pérdidas económicas al productor y a la industria lechera. Si bien puede ser causada por varios agentes etiológicos, *Staphylococcus aureus* es el patógeno más frecuentemente aislado de casos de mastitis en Argentina y en otros países de gran desarrollo lechero. *S. aureus* posee la habilidad de invadir tejidos y sobrevivir intracelularmente, lo cual lo protegería de la respuesta inmune humoral del hospedador y el tratamiento con antibióticos. Estas particulares características

determinan que no sea efectivamente controlado por las medidas preventivas y terapéuticas tradicionales, tendiendo a producir infecciones intramamarias (IIM) crónicas, que pueden ocasionar daños permanentes al tejido mamario. Por consiguiente, se han propuesto medidas alternativas que permitan una mayor reducción de la prevalencia de mastitis, tendiendo a un menor uso de antimicrobianos. Una de ellas es la manipulación de los mecanismos de defensa específicos del hospedador a través del uso de inmunógenos. En las últimas décadas se han desarrollado diversas vacunas experimentales. Algunas de ellas, compuestas por bacterinas o lisados de cultivos de *S. aureus*, alcanzaron la fase de comercialización. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento con estos inmunógenos muestran un control parcial de la infección. Estas observaciones señalan la necesidad de explorar nuevas alternativas para mejorar el desempeño de las bacterinas actualmente disponibles. Se ha propuesto que, para una protección adecuada, la vía de administración del inmunógeno, así como el adyuvante