

Tesis de Maestría.

# Activación y control de la vía clásica del complemento sobre la capa laminar de *Echinococcus granulosus*.

---



Lic. Anabella Barrios  
Tutor: Álvaro Díaz

PEDECIBA Biología, Biología  
celular y molecular.

Febrero, 2017.



*Dedicada a mis padres,  
por su amor y apoyo incondicionales.*

## Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi tutor Álvaro Díaz por haberme dado la oportunidad de trabajar con su grupo, gracias por enseñarme con gran dedicación y paciencia a lo largo de este camino que me lleva a seguir comprendiendo qué es eso de investigar. Gracias por las incontables horas de discusión y por ser una fuente inagotable de ideas, lo que sin dudas a esta Tesis le vino bárbaro!

En segundo lugar quisiera agradecer a todos los integrantes de la Cátedra de Inmunología, muy especialmente a la querida “casita del medio”. En esta “casita” no solo encontré excelentes profesionales, sino también grandes amigos! Los cuales hacen que el lugar de trabajo sea un lugar cálido y divertido. No puedo dejar de agradecer a mis amigos de la UBP, que sin dudas también han sido parte de este proceso.

Muy especialmente quiero agradecer a mi padres y hermanos, son mi apoyo incondicional, mi fuerza interior y siempre están en mi corazón. A Leo, mi amor, mi gran compañero, el que a pesar de las demandas del trabajo y los horarios extraños de este, me entiende y acompaña siempre. Agradezco también a toda mi familia y a mis amigos.

## Resumen

La hidatidosis o equinococosis quística es la infección por la fase larvaria del cestodo *Echinococcus granulosus*. La naturaleza crónica de la infección, junto con el extraordinario tamaño que alcanza el parásito en el parénquima de órganos internos y con su inmunogenicidad, implican un gran potencial para generar respuestas inflamatorias. De no ser controlado este potencial por mecanismos reguladores, la inflamación desencadenada no solo se dañaría al parásito, sino que también comprometería la supervivencia del hospedador. Por lo tanto, la capacidad de controlar los mecanismos inflamatorios, incluyendo la activación del sistema complemento, debe ser una parte importante y compleja de la adaptación del parásito a su forma de vida.

Nuestro grupo ha estudiado la interacción entre *E. granulosus* larvario y el sistema complemento. En estos estudios resulta central la capa laminar, que es la cubierta acelular con la que se protege la larva establecida (hidátide). La capa laminar de *E. granulosus* es una red mucínica en cuyo interior hay nano-depósitos de una sal cálcica de inositol hexakisfosfato ( $\text{InsP}_6$ ) cálcico. La naturaleza acelular y macroscópica de la capa laminar implican que los mecanismos efectores de complemento basados en opsonización y lisis tendrían poca importancia una vez establecido el parásito. En cambio, los efectos pro-inflamatorios de las anafilotoxinas, en particular  $\text{C5a}$ , derivada de  $\text{C5}$ , sí son perjudiciales para el parásito aún establecido.

La aparición de la capa laminar durante el desarrollo larvario coincide con una disminución importante en la activación del sistema complemento sobre la superficie del parásito. Coincidente con ello, la capa laminar es capaz de secuestrar al inhibidor de la vía alternativa, el factor H. Sin embargo, esto no parece ser suficiente para el control global del sistema complemento, ya que la capa laminar resulta opsonizada por anticuerpos del hospedero. Además se observó que el  $\text{InsP}_6$  cálcico es capaz de unir  $\text{C1q}$ , sin que se determinaran las consecuencias funcionales de esta interacción. Así, los datos previos a esta Tesis planteaban las posibilidades de activación de la vía clásica por dos mecanismos paralelos, o de una posible inhibición de la vía mediada por el  $\text{InsP}_6$  cálcico.

En la presente Tesis se analizó el potencial de la capa laminar de activar la vía clásica, con foco en los posibles efectos del  $\text{InsP}_6$  cálcico sobre la iniciación y la continuación de la vía.

Los resultados obtenidos son complejos, pero globalmente apoyan las conclusiones que siguen. Primero, la capa laminar no activa en forma detectable la vía de las lectinas, en presencia de suero humano. Segundo, la capa laminar efectivamente puede activar de manera significativa la vía clásica, a través de los anticuerpos unidos a la red mucínica, y también a través del  $\text{InsP}_6$  cálcico. Tercero, la activación que ocurre sobre el  $\text{InsP}_6$  cálcico es ineficiente, y, al menos a concentraciones bajas de complemento, puede competir con la posibilidad de activación sobre los anticuerpos. Cuarto, la activación iniciada sobre el  $\text{InsP}_6$  cálcico se continua también en forma ineficiente, en particular a nivel de depósito de C4 y C3, lo que es coherente con la ausencia en este compuesto de grupos nucleofílicos aceptores, para las proteínas con tioéster. La combinación de los efectos anteriores conduce a que la presencia del  $\text{InsP}_6$  cálcico resulte irrelevante para la capacidad global de la capa laminar de activar C5, en el sistema homólogo (capa laminar de origen humano y complemento humano), y a concentraciones bajas de complemento. Esto a su vez implica que la búsqueda de mecanismos reguladores de la vía clásica sobre la capa laminar debe enfocarse a la red mucínica.

Ya que la retención de C1q en cantidades importantes por el  $\text{InsP}_6$  cálcico no parece estar asociada a un mecanismo de inhibición de la vía clásica, resulta interesante considerar que constituya una adaptación del parásito no relacionada a la cascada del sistema complemento. Dadas las múltiples funciones inmuno-reguladoras que posee C1q, no se puede descartar que la hidátide secuestre esta molécula sobre su superficie como adaptación para evitar unión del componente a receptores celulares que desencadenen efectos negativos para el parásito, o por el contrario para potenciar, por presentación multivalente, interacciones que promuevan respuestas de tipo anti-inflamatorias.

## Lista de abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

BSA: seroalbúmina bovina (inglés, *bovine serum albumin*)

BBK32: lipoproteína de *Borrelia burgdorferi*

C1-INH: inhibidor de C1

C3bBb: convertasa de C3 de la vía alternativa

C4bp: proteína de unión a C4b

C4b2a: convertasa de C3 de la vía clásica

CCP: proteínas de control de complemento (del inglés, *complement control protein*)

CFHR: proteína relacionada a factor H (del inglés, *complement factor H related*)

CG: capa germinativa

CIP: proteína que interfiere con complemento (del inglés, *complement interferin protein*)

CL: capa laminar

CR1: receptor de complemento 1 (del inglés, *complement receptor 1*)

DAF: factor acelerador del decaimiento (del inglés, *decay accelerating factor*)

DTT: ditioneitol

Eap: proteína extracelular de adherencia (del inglés, *extracellular adherence protein*)

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético (del inglés, *ethylenediaminetetraacetic acid*)

EGTA: Ácido etilenbis (oxietilennitrilo)tetra acético (del inglés, *ethylene glycol-bis ( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid*)

ELISA: enzimoimmunoensayo (del inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

fB: factor B

Fc: región constante de inmunoglobulinas

fH: factor H

FHL-1: (del inglés, *factor H like-1*)

fl: factor I

GPI: glicofosfatidil inositol (del inglés, *glycophosphatidyl inositol*)

NMR: resonancia magnética nuclear (del inglés, *nuclear magnetic resonance*)

iC3b: producto de inactivación de C3

iC4b: producto de inactivación de C4

IgA: inmunoglobulina de clase A

IgG: inmunoglobulina de clase G

IgM: inmunoglobulina de clase G

IL-4: interleuquina 4

InsP<sub>6</sub>: *myo*-inositol hexakisfosfato

kDa: kilodalton

LDL: lipoproteína de baja densidad (del inglés, *low density lipoprotein*)

MAC: complejo de ataque a membrana (del inglés, *membrane attack complex*)

MBL: (del inglés, *mannan binding lectin*)

MASPs: proteasa de serina asociada a MBL (del inglés, *MBL associated serine protease*)

NET: trampas extracelulares de neutrófilos (del inglés, *neutrophil extracellular traps*)

PepO: endopeptidasa O

PBS: amortiguador fosfato salino (del inglés, *phosphate-buffered saline*)

PVDF: fluoruro de polivinilideno (del inglés, *PolyVinylidene Fluoride*)

RCA: reguladores de activación del complemento (del inglés, *regulators of complement activation*)

Sbi: proteína de unión a inmunoglobulinas de *S. aureus*

SC: sistema complemento

SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida empleando SDS (del inglés, *SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*)

SH: suero humano

SHN: suero humano normal

TCA: ácido tricloroacético (del inglés, *trichloroacetic acid*)

Th: linfocito T colaborador (del inglés, *T helper lymphocyte*)

TMB: tetrametilbencidina

VA: vía alternativa

VBS: tampón veronal salino (del inglés, *veronal buffer saline*)

VC: vía clásica

VL: vía de las lectina



# Índice de contenidos

Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Resumen	iii
Lista de abreviaturas	v
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1.1 <i>Echinococcus granulosus</i></b>	<b>1</b>
<b>1.2 Hidátide</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Capa Laminar</b>	<b>4</b>
<b>1.3.1 Estructura y bioquímica de la capa laminar</b>	<b>5</b>
<b>1.3.1.1 Mucinas</b>	<b>6</b>
<b>1.3.1.2 <i>myo</i>-inositol hexakisfosfato</b>	<b>7</b>
<b>1.3.2 La capa laminar y la respuesta inmune</b>	<b>9</b>
<b>1.4 Sistema complemento</b>	<b>10</b>
<b>1.4.1 Activación del sistema complemento</b>	<b>12</b>
<b>1.4.1.1 Vía clásica</b>	<b>12</b>
<b>1.4.1.2 Vía de las lectinas</b>	<b>14</b>
<b>1.4.1.3 Vía alternativa</b>	<b>15</b>
<b>1.4.1.4 Vía terminal</b>	<b>16</b>
<b>1.4.2 Mecanismos de regulación del sistema complemento, con énfasis en la VC</b>	<b>17</b>
<b>1.4.3 Mecanismos de evasión, con énfasis en aquellos que controlan a la VC</b>	<b>19</b>
<b>1.5 <i>E. granulosus</i> y el sistema complemento</b>	<b>22</b>
<b>1.6 Antecedentes sobre la interacción entre el sistema complemento y la capa laminar</b>	<b>23</b>
<b>1.6.1 Antecedentes vinculados a la vía alternativa</b>	<b>23</b>
<b>1.6.2 Antecedentes vinculados a la vía clásica</b>	<b>23</b>
<b>1.6.3 Antecedentes vinculados a la vía de las lectinas</b>	<b>25</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>26</b>

2.1	Resumen del problema planteado	26
2.2	Objetivo general	26
2.3	Objetivos específicos	26
3.	Materiales y Métodos	2
3.1	Preparación de herramientas de trabajo	27
3.1.1	Obtención de suspensiones de partículas de CL	27
3.1.2	Modificación de la CL para eliminación de componentes específicos presentes en la misma	29
3.1.2.1	Tratamiento de la CL con EDTA: eliminación de gránulos de $InsP_6$ cálcico	29
3.1.2.2	Tratamiento de la CL con la preparación proteolítica pronasa: eliminación de inmunoglobulinas	30
3.1.3	Obtención de suero humano normal producido en el Laboratorio	31
3.2	Técnicas generales	31
3.2.1	Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA)	31
3.2.2	Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	31
3.2.3	Tinción con azul brillante de Coomassie	32
3.2.4	Transferencia húmeda a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF)	32
3.2.5	Western blots	32
3.3	Estrategia experimental general y reactivos comerciales de complemento empleados	33
3.3.1	Ensayos de activación de complemento	34
3.3.1.1	Incubación de CL con SH	34
3.3.1.2	Determinación de parámetros de activación y control del complemento	35
3.3.1.2.1	Estudio del depósito covalente de C4 y C3	35
3.3.1.2.2	Estudio del depósito no covalente de C5	36
3.3.1.2.3	Medida de los productos de activación de los componentes C4, C2 y C3 en sobrenadantes	37
3.3.1.2.4	Cuantificación de C5a en sobrenadantes	37
3.3.2	Estudio de la unión de C1q y C4bp	38

<b>3.4</b>	<b>Procesamiento de los datos obtenidos</b>	<b>39</b>
<b>3.4.1</b>	<b>Procesamiento de datos de densitometría de western blot para cantidad de productos de C4, C3 y C5 depositados</b>	<b>39</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Procesamiento de datos de densitometría de western blot para activación de C4, C2 y C3, e inactivación de C4</b>	<b>40</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Cuantificación en sobrenadantes del C5a producido</b>	<b>41</b>
<b>4.</b>	<b>Resultados</b>	<b>42</b>
<b>4.1</b>	<b>Ensayos con material hidático de origen de ratón</b>	<b>42</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Estudio de la contribución de la VC a la activación del complemento sobre la CL</b>	<b>42</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Estudio de la capacidad de los anticuerpos unidos específicamente a la CL de iniciar a la VC, en ausencia de contribución de la VA</b>	<b>52</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Efecto de los gránulos de <math>InsP_6</math> cálcico sobre la activación de la VC, en ausencia de contribución de la VA</b>	<b>54</b>
<b>4.2</b>	<b>Ensayos con material hidático de origen humano</b>	<b>68</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Verificación de ausencia de contribución de VA a la dilución de SH 1:60 y observación de ausencia de activación de VL sobre CL de origen humano</b>	<b>68</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Efecto de los gránulos de <math>InsP_6</math> cálcico sobre la activación de la VC sobre CL de origen humano, en ausencia de contribución de la VA</b>	<b>69</b>
<b>5.</b>	<b>Discusión</b>	<b>76</b>
<b>5.1</b>	<b>Interacción entre los gránulos de <math>InsP_6</math> cálcico y el sistema complemento en ausencia de VA</b>	<b>76</b>
<b>5.1.1</b>	<b>Iniciación de la VC</b>	<b>77</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Formación y actividad de la convertasa de C3 de la VC y depósito de C3 consiguiente</b>	<b>81</b>
<b>5.1.3</b>	<b>Activación de la vía terminal</b>	<b>84</b>
<b>5.1.4</b>	<b>Conclusión global de los resultados obtenidos</b>	<b>85</b>
<b>5.2</b>	<b>Interacción entre los gránulos de <math>InsP_6</math> cálcico y el sistema complemento en presencia de la VA</b>	<b>87</b>
<b>5.3</b>	<b>Significado biológico de los resultados obtenidos</b>	<b>88</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>90</b>
<b>7.</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>91</b>

# 1. Introducción

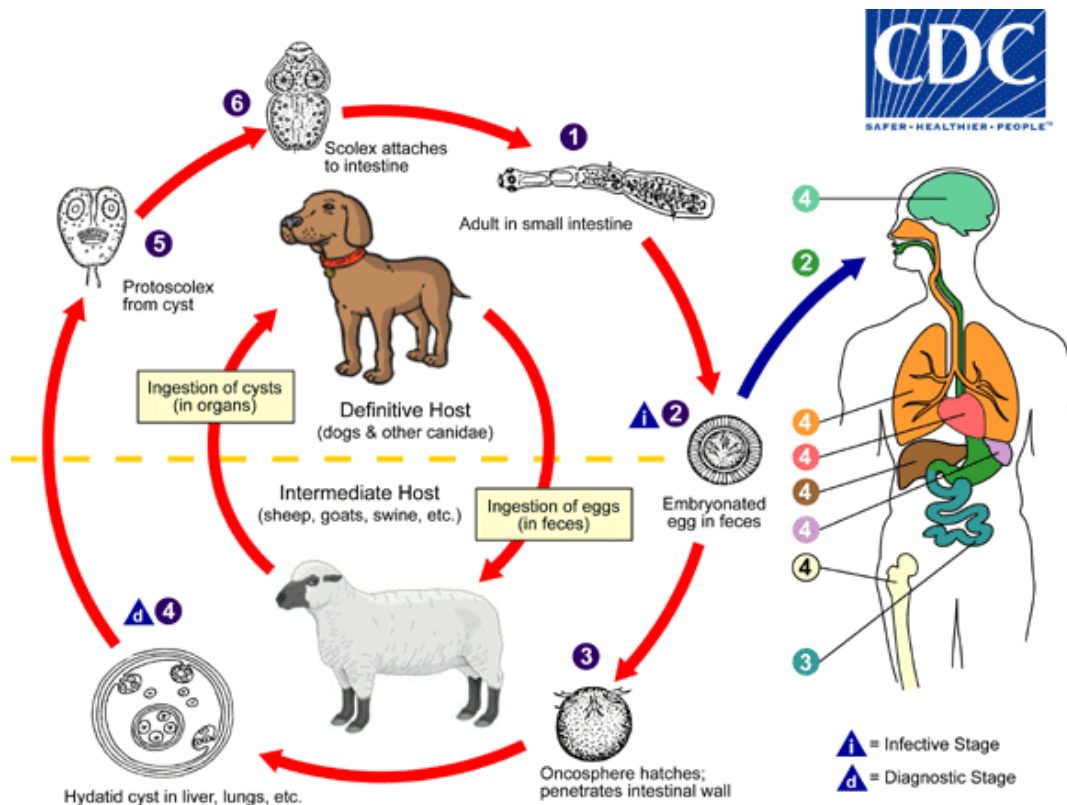
## 1.1 *Echinococcus granulosus*

El género *Echinococcus*, perteneciente al filo platelmintos, a la clase cestoda y a la familia *taeniidae*, agrupa a endoparásitos obligados con ciclos de vida que requieren de dos hospedadores. Actualmente se reconocen en el género nueve especies: *E. multilocularis*, *E. vogeli*, *E. oligarthra*, *E. granulosus*, *E. equinus*, *E. ortleppi*, *E. canadensis*, *E. shiquicus* y *E. felidis*. Esta clasificación se basa en análisis taxonómicos moleculares, que comparan secuencias de ADN mitocondrial y nuclear. En una clasificación anterior, lo que ahora son las especies *E. equinus*, *E. ortleppi* y *E. canadensis* estaban agrupadas dentro de *E. granulosus*, especie dentro de la que se reconocían varios genotipos. Los genotipos G1-G3 (también llamados cepas de oveja y de búfalo), corresponden ahora a la especie *E. granulosus sensu stricto*. De manera similar, los genotipos G4, G5, y G6-G10 corresponden en la clasificación actual a *E. equinus*, *E. ortleppi* y *E. canadensis*, respectivamente [1]. Este conjunto de especies surgido de la antigua especie *E. granulosus* se denomina ahora *E. granulosus sensu lato*. En todas las especies del género, carnívoros (cánidos o félidos) actúan como hospederos definitivos (o sea alojan la forma adulta del gusano), mientras que herbívoros (roedores, lagomorfos y ungulados) actúan como hospederos intermediarios (o sea albergan a la larva, también llamada metacestodo). Cada especie tiene preferencias de hospedero definitivo y/o intermediario.

La infección por las formas larvarias de las especies agrupadas como *E. granulosus sensu lato* se denomina hidatidosis o equinococosis quística. Esta enfermedad zoonótica es relevante en países con fuerte actividad ganadera como son Argentina y Uruguay. Para estos países, datos de secuenciación evidenciaron que la mayoría de las infecciones de ganado y el 80 % de los casos de infecciones en humanos son causadas por *E. granulosus sensu stricto* [2].

El ciclo de vida de *E. granulosus sensu lato* se resume en la Figura 1.1. Brevemente, el estadio adulto se aloja en el intestino delgado de cánidos, principalmente perros donde, se reproduce y libera huevos embrionados al ambiente a través de las heces. Los hospedadores intermediarios (ungulados, principalmente ovinos, bovinos, suinos y equinos) ingieren estos huevos que, una vez en el intestino delgado, eclosionan liberando oncosferas. Las oncosferas penetran la pared intestinal y son llevadas por el sistema circulatorio al parénquima de

órganos internos, principalmente hígado y pulmón. Una vez allí se desarrollan a larvas llamadas hidátides, que a su vez producen protoscólices. El potencial reproductivo de la larva es muy alto, pudiendo llegar a formarse miles de protoscólices en una única hidátide. Además, los protoscólices presentan una sorprendente plasticidad en cuanto a su capacidad de diferenciación: si son ingeridos por el hospedero definitivo (en vísceras de hospedadores intermediarios infectados), se diferencian a adultos, pero si se liberan en el medio interno de un hospedero intermediario, por ruptura de una hidátide fértil, se desarrollan en forma reversa a nuevas hidátides, en un proceso llamado infección secundaria. En el hospedero definitivo, luego de ser ingeridos, los protoscólices evaginan y se adhieren a la mucosa intestinal, donde se desarrollan al estadio adulto en cuestión de 32 - 80 días. El ser humano, que se ve infectado al ingerir vegetales o aguas contaminadas, es un hospedador intermediario accidental, no contribuyendo al ciclo del parásito [3]. En el ser humano la infección provoca, en el largo plazo, fallas en los órganos por compresión debida al crecimiento de la hidátide. Existen además complicaciones como la ruptura de la hidátide con el riesgo consecuente de choque anafiláctico y/o de infecciones secundarias [4], y la sobreinfección bacteriana. La infección con *E. granulosus* larvario es crónica y muchas veces asintomática, lo que hace difícil su diagnóstico. Esta aparente paradoja entre la falta de síntomas y la presencia de macroparásitos en el organismo es común a muchas infecciones con helmintos y evidencia la gran capacidad de evasión del sistema inmune de estos organismos [5].

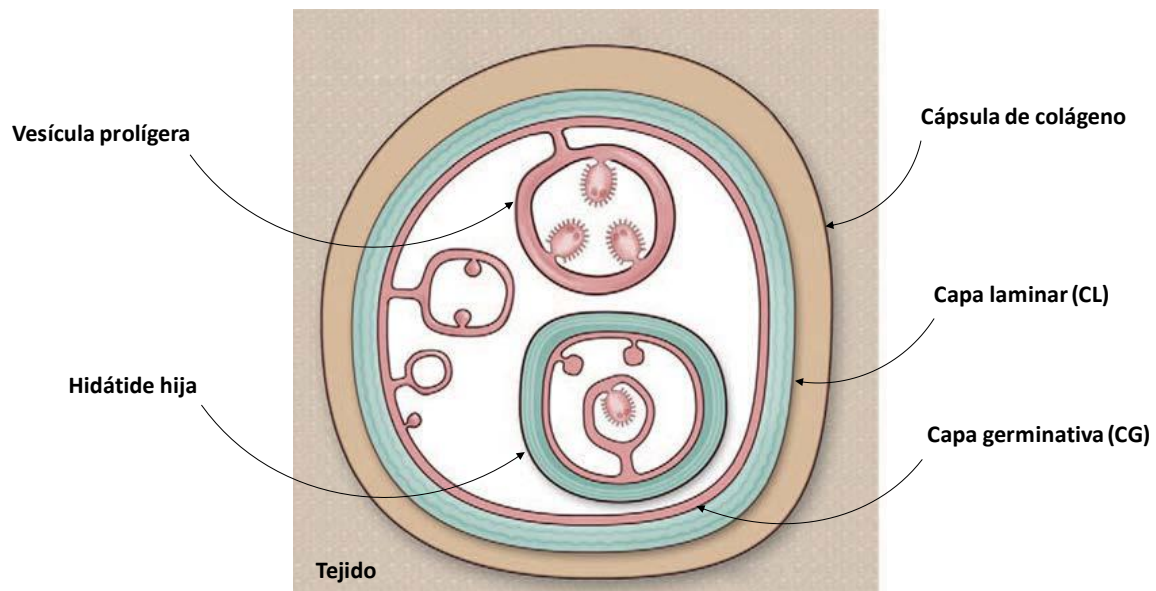


**Figura 1.1 Ciclo de vida de *E. granulosus*.** El detalle de cada etapa se encuentra en el texto principal en la sección 1.1. Imagen tomada de <https://www.cdc.gov/parasites/echinococcosis>

## 1.2 Hidátide

La hidátide es una estructura parasitaria unilocular subsférica llena de líquido (líquido hidático) y turgente, que puede alcanzar decenas de cm de diámetro. Está delimitada por una pared (Figura 1.2). Ésta a su vez se compone por una capa celular, la capa germinativa (CG), y externa a ella, una capa de material extracelular, la capa laminar (CL). La CG está formada por una capa fina de células que incluye, del lado externo, un sincitio. De esta capa brotan hacia el interior de la hidátide pequeñas vesículas que dan lugar a la formación de protoscólices. Por otro lado, las células de la CG son las encargadas de sintetizar y secretar los componentes de la CL. Por fuera de la CL se encuentra una cápsula de colágeno producida por el hospedador (capa adventicia) o una zona de reacción inflamatoria local activa con infiltración de leucocitos, dándose también situaciones intermedias. El predominio de uno u otro tipo de reacción se relaciona con el grado de adaptación de la especie/genotipo del parásito a la especie de hospedador intermediario en cuestión; la formación de la cápsula de colágeno es

un signo de buena adaptación parásito-hospedador, y por lo general correlaciona con el desarrollo de hidátides fértiles (es decir conteniendo protoscólices). En cambio, en los casos de una mala adaptación del parásito, se genera una zona de reacción inflamatoria activa y se producen hidátides no fértiles [6]. En conjunto, la hidátide y la capa adventicia y/o reacción inflamatoria local conforman lo que se denomina quiste hidático.



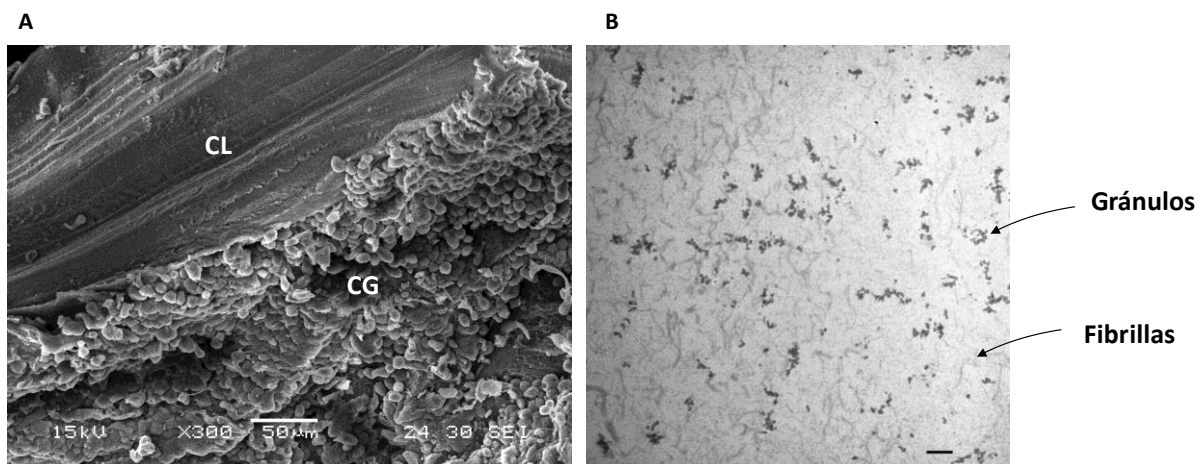
**Figura 1.2 Estructura del estadio larvario de *E. granulosus*.** El estadio larvario de *E. granulosus*, hidátide, es una estructura subsférica delimitada por una pared, compuesta por la capa germinativa (CG) y la capa laminar (CL). Por fuera de la pared suele haber una cápsula de colágeno (capa adventicia), que en conjunto con la hidátide en sí forma el quiste hidático. El interior de la hidátide contiene el líquido hidático, que baña a las células de la GL. Éstas generan brotes hacia el interior de la hidátide, que se vesicularizan y forman protoscólices. Ocasionalmente, pueden encontrarse vesículas hijas, con su propia LL, en el interior de hidátides mayores. Tomado y modificado de [7].

### 1.3 Capa Laminar

La CL es importante en la biología de *E. granulosus* larvario, ya que contribuye al mantenimiento de la integridad física de la hidátide y condiciona la interacción con el sistema inmune del hospedador. Como ya se mencionó, esta estructura acelular es sintetizada por las células de la CG subyacente, a las que protege del contacto directo con las células del sistema inmune del hospedador [7]. La CL es una estructura específica del género *Echinococcus*, que en *E. granulosus* alcanza unos 3 mm de espesor. Es hidrofílica, elástica, macroscópicamente consistente, y da sostén físico a la hidátide, permitiéndole estar turgente.

### 1.3.1 Estructura y bioquímica de la capa laminar

La CL debe su nombre a laminaciones concéntricas que posee observables al microscopio óptico, así como también al microscopio electrónico [8] (Figura 1.3A). A nivel molecular la CL se compone de una malla de glicoproteínas altamente O-glicosiladas (mucinas) (sección 1.3.1.1) y abundantes nano depósitos de una sal cálcica de *myo*-inositol hexakisfosfato ( $\text{InsP}_6$  cálcico) (sección 1.3.1.2). Las mucinas son el componente principal en las CL de todas las especies de *Echinococcus*, mientras que los gránulos de  $\text{InsP}_6$  cálcico están presentes en *E. granulosus sensu stricto* y *E. equinus*, pero no *E. multilocularis* [9]. Estos dos grandes componentes moleculares se corresponden a nivel ultraestructural con una red de fibrillas y con gránulos electrón densos, respectivamente (Figura 1.3B).



**Figura 1.3 Ultraestructura de la capa laminar de *E. granulosus*.** En (A) se muestra una micrografía electrónica de barrido, en la que se puede apreciar a la CG y a las laminaciones presentes en la CL. En (B) se muestra una micrografía electrónica de transmisión, en la que se puede observar las fibrillas correspondientes a las mucinas y los gránulos electrón densos correspondientes a los depósitos de  $\text{InsP}_6$  cálcico. La barra corresponde a 0,5  $\mu\text{m}$ . La micrografía mostrada en (A) fue amablemente cedida por María Celina Elissondo (CONICET-Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina).



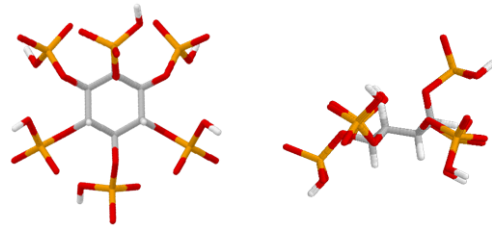


**Figura 1.4 Organización molecular de apomucinas expresadas por la capa germinativa.** Se muestran las secuencias predichas de las cuatro apomucinas candidatas a constituir la CL: EGC00317, EGC02904, EGC04254 y EGC05092. EGC00317 se muestra alineada con su ortólogo de *E. multilocularis*, EMC00019. EGC02904 y EGC04254, que están muy relacionadas, se muestran alineadas entre sí. EGC05092 (cuya secuencia está incompleta) se muestra de forma de enfatizar los motivos repetidos (R1, S y R2). Los residuos formando los péptidos señal predichos se muestran en rojo, y las extensiones C-terminales correspondientes a señales para la adición de anclas a GPI están marcadas con una línea gris por debajo. Además se indican: los residuos de Ser/Thr posiblemente O-glicosilados en verde, los residuos Asp/Glu en azul, los residuos Arg/Lys en magenta y las Cys desapareadas en anaranjado. Una representación esquemática de las características de estas apomucinas se incluye debajo utilizando los mismos colores. Tomado de [14].

### 1.3.1.2 *myo*-inositol hexakisfosfato

Los compuestos de *myo*-inositol fosforilados son componentes ubicuos de las células de los eucariotas. Entre estos compuestos, el *myo*-inositol hehakisfosfato ( $\text{InsP}_6$ ), en el cual todas las posiciones del inositol están sustituidas por grupos fosfato, es el más abundante. El  $\text{InsP}_6$  está presente en concentraciones de entre 10 a 100  $\mu\text{M}$  en células de mamíferos, dependiendo del tipo celular y del estadio de diferenciación de la célula [16], [17].

Tal como se deduce de su estructura (Figura 1.5), el  $\text{InsP}_6$  puede sufrir hasta 12 desprotonaciones, dando lugar a especies de altísimas densidades de carga negativa. Debido a esto, el  $\text{InsP}_6$  se asocia fuertemente con cationes di- y trivalentes, dando tanto complejos solubles como sales insolubles. En general, en condiciones de exceso de cationes por mol de  $\text{InsP}_6$  predomina la formación de productos insolubles [18] y [19]. De hecho, en plantas, el  $\text{InsP}_6$  se encuentra insolubilizado con diferentes cationes ( $\text{K}^+/\text{Ca}^+/\text{Mg}^+$ ,  $\text{Mn}^+$  y  $\text{Zn}^+$ ), formando depósitos dentro de compartimentos rodeados de membranas [20]. En animales existe solo un antecedente de la presencia de depósitos intracelulares de  $\text{InsP}_6$  (insolubilizado como sal de  $\text{Mg}^{++}$ ), en la larva del mesozoario *Dicyema typus*, [21]. Hasta donde se conoce, en el resto de las células eucariotas, el  $\text{InsP}_6$  no forma depósitos masivos como los mencionados previamente. En células de mamíferos, en particular el  $\text{InsP}_6$  se encuentra en el citosol y en el núcleo. Las funciones del  $\text{InsP}_6$  no se comprenden bien. Entre múltiples funciones propuestas [22] resulta claro su papel en la exportación de ARN mensajeros del núcleo [23] y su papel como precursor de los pirofosfatos de inositol, que son moléculas de señalización [24].

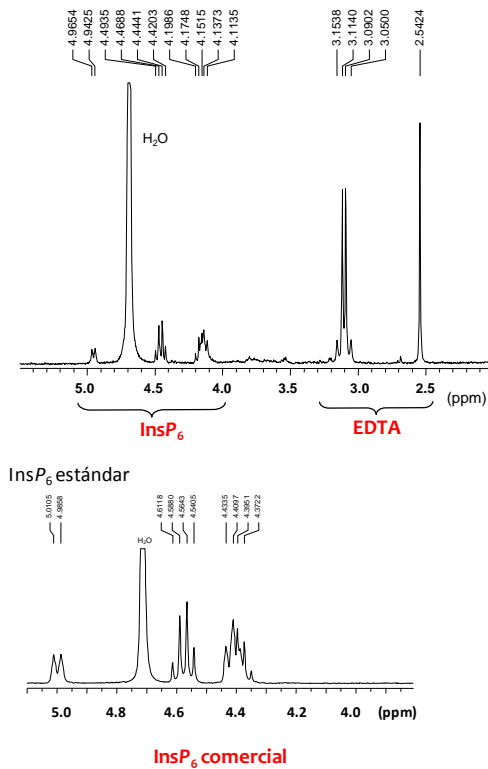


**1.5 Estructura del  $\text{InsP}_6$ .** Se muestra al en su conformación estéricamente más estable, cinco grupos fosfato en disposición ecuatorial y solo uno en disposición ecuatorial.

Con respecto a *E. granulosus*, los resultados del grupo han mostrado que el  $\text{InsP}_6$  es sorprendentemente abundante en la CL (aproximadamente el 30% de la masa seca total). Como ya se mencionó, la sal cálcica del  $\text{InsP}_6$  (junto con una pequeña proporción de sal magnésica) da lugar a los gránulos detectables al microscopio en la CL [25]. La química del  $\text{InsP}_6$  predice que en condiciones extracelulares (o del sistema vesicular), el compuesto precipita como sal de calcio, contrariamente a condiciones citosólicas/nucleares, en las que se predice forma un complejo soluble con magnesio [18], [19]. El caso de *E. granulosus* constituye la primera evidencia de la existencia de depósitos extracelulares de  $\text{InsP}_6$  en eucariotas.

Como se mencionó previamente, los componentes de la CL son sintetizados en la CG. En particular el  $\text{InsP}_6$  es sintetizado y cargado en vesículas membranosas, en las cuales aparece en forma insoluble, como depósitos de 41 nm aproximadamente [26]. Estas vesículas vuelcan su contenido al exterior, donde se localiza la CL, de forma que los depósitos, aislados o agrupados, resultan distribuidos por toda la malla de mucinas [7].

La insolubilización del  $\text{InsP}_6$  por asociación con calcio predice que el tratamiento de la CL con agentes quelantes de cationes sería capaz de disolver a los gránulos. Esto fue corroborado, y de hecho el tratamiento con EDTA o EGTA elimina selectivamente a los gránulos de la CL [26]. En el contexto de la CL, el tratamiento con EDTA es selectivo para el  $\text{InsP}_6$  cálcico, ya que en los extractos correspondientes solamente se detecta (por  $^1\text{H-NMR}$ )  $\text{InsP}_6$  (y EDTA) (Figura 1.6).



**Figura 1.6.** El tratamiento de la CL con EDTA remueve selectivamente al **InsP<sub>6</sub>**. EL análisis por <sup>1</sup>H-RMN del sobrenadante recuperado luego del tratamiento de la CL con EDTA muestra solamente señales correspondientes al **InsP<sub>6</sub>** y al EDTA utilizado en la remoción. Tomado y modificado de [26].

Hasta el día de hoy se desconoce cuál es la función que desempeñan los gránulos de **InsP<sub>6</sub>** cálcico en la biología del parásito. Es llamativa la abundancia de estos depósitos localizados en la interfase con el hospedero, así como el hecho que la presencia de los gránulos no se conserva en todo el género *Echinococcus*. En general son planteables tanto un papel estructural como un papel en la interacción con el hospedero.

### 1.3.2 La capa laminar y la respuesta inmune

La característica más notable de la biología de *E. granulosus* larvario es su adaptación a controlar la respuesta inflamatoria del hospedero. Contrastando con su persistencia en un lugar fijo, sistémico, y con su gran tamaño, la hidátide en general crece rodeada de una cápsula de colágeno pobremente infiltrada. Inmunológicamente la infección induce respuestas efectoras polarizadas hacia Th2, conteniendo un fuerte componente regulador/tolerogénico

[27]. Por su localización y masividad, la CL constituye un elemento central en la relación hospedero-parásito. Se piensa que la CL es responsable al menos en parte del control inflamatorio local y la respuesta reguladora global. De acuerdo con esto, la inflamación local que dispara el parásito en establecimiento se resuelve al mismo tiempo que comienza la síntesis de la CL [27]. Esto parece indicar que los motivos moleculares presentes en la CL son decodificados como material inocuo, o incluso tolerogénico. Nuestro grupo ha trabajado sobre esta hipótesis, enfocándose en el estudio de los mecanismos regulatorios inducidos por la CL en el hospedero intermediario. Para esto se ha trabajado con una preparación particulada de la CL estudiando las respuestas que induce en el sistema inmune innato, con énfasis en células dendríticas y macrófagos. La exposición a esta preparación condiciona a estos tipos celulares hacia fenotipos “semi-maduros”, potencialmente tolerogénicos [28]. Consistente con este planteo, en un modelo animal de colitis aguda, el pre-tratamiento de ratones con una preparación de CL reduce significativamente la severidad de la enfermedad [29].

Como se mencionó, la CL representa una barrera para las células del sistema inmune del hospedador que intentan llegar a la GL. Sin embargo, el tamaño de poro de esta malla tridimensional es lo suficientemente grande como para permitir el intercambio libre de macromoléculas de hasta al menos 150 kDa [30]. Esta característica, sumado al gran grosor de la CL en *E. granulosus*, hacen que esta estructura proporcione una gran superficie de interacción con las cascadas solubles presentes en el plasma del hospedador, como son las de la coagulación, sistema de quininas, fibrinolítica y el sistema complemento. Como se describe en la sección 2, el objetivo de esta Tesis es estudiar la interacción de una de las vías de la activación del sistema complemento con la CL, por lo que en las siguientes secciones se profundiza en las características del complemento, así como en lo que se conoce sobre su interacción con *E. granulosus*.

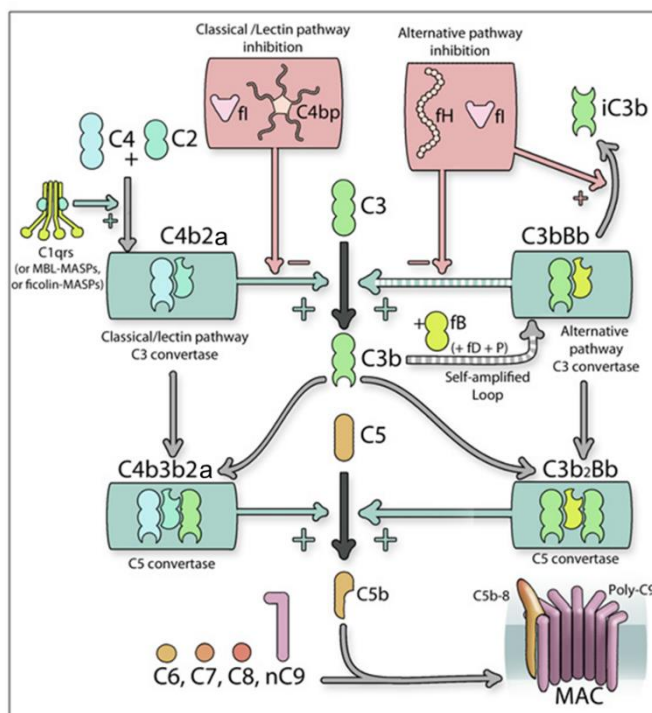
## **1.4 Sistema complemento**

El sistema complemento (SC) fue descubierto en los años 1890 por Jules Bordet como un componente termo-sensible del plasma normal que favorecía la opsonización y eliminación de bacterias por anticuerpos. Por ello, se le dio nombre por su capacidad de “complementar” a la actividad de los anticuerpos.

El SC constituye uno de los mecanismos efectores más importantes de la respuesta inmune innata y también es efector de la respuesta inmune adaptativa. Este sistema es una compleja red constituida por más de 30 proteínas en gran parte plasmáticas (que representan más del 15% de la fracción globular del plasma), y también asociadas a membranas [31].

Convencionalmente, las funciones desempeñadas por el SC incluían tres mecanismos efectores: reclutamiento de células inflamatorias e inmunocompetentes a través de la liberación de anafilotoxinas, opsonización de patógenos y/o células infectadas, y destrucción de patógenos susceptibles a través del ensamblaje del llamado complejo de ataque a membrana, (MAC, del inglés *membrane attack complex*). Así durante muchos años se pensó que el papel del SC en la inmunidad estaba restringido a la rama efectora. Sin embargo, actualmente se sabe que este sistema tiene impacto sobre la instrucción de respuestas adaptativas, actuando tanto sobre las células dendríticas como sobre los linfocitos B y T [32]. Por otro lado, hoy por hoy se sabe que el SC no solamente es capaz de “complementar” otras funciones del sistema inmune, sino que también es capaz orquestar procesos no inmunológicos. Así, el SC participa en diversos procesos biológicos homeostáticos como ser la maduración de la sinapsis nerviosa, angiogénesis, movilización de células madres progenitoras hematopoyéticas, regeneración de tejido y metabolismo lipídico [31].

Existen tres vías de activación del complemento: clásica (VC), de las lectinas (VL) y alternativa (VA) (Figura 1.7). A continuación se describen los mecanismos de iniciación de cada una, profundizando en la VC, la cual como se detalla en la sección Objetivos, es el foco de estudio de esta Tesis. Existe un delicado balance entre la activación del SC y su regulación, que evita que este sistema pueda activarse y generar daño en superficies propias. Más adelante se describen los mecanismos de regulación del SC, también con énfasis en la VC. Las vías de activación del SC y su regulación han sido extensamente descritas en libros de texto de Inmunología así como libros específicos sobre dicho sistema [33], [34], en los que se basan las secciones que siguen.



**Figura 1.7 Vías de activación del sistema complemento.** Se resume la activación y control del SC. El detalle de la activación se encuentra en el texto principal, en la sección 1.4. Tomado y modificado de [27].

## 1.4.1 Activación del sistema complemento

### 1.4.1.1 Vía clásica

La VC comienza con la unión del subcomponente C1q del complejo C1 a sus blancos. C1q es una glicoproteína hexamérica de 460 kDa, con estructura de ramillete. Está formado por 3 cadenas, A, B y C (habiendo seis de cada una), las cuales se asocian para formar seis fibras heterotriméricas de tipo colágeno que terminan en extremos C-terminales con dominios globulares. Los dominios de tipo colágeno mantienen la arquitectura hexamérica e interaccionan con moléculas efectoras, mientras que los dominios globulares le brindan las propiedades de reconocimiento [35].

C1q reconoce la porción Fc de anticuerpos de clase M (IgM) o de clase G (IgG) que se encuentran formando inmunocomplejos. Es bien conocida la gran capacidad de IgM de activar la VC, la cual está dada por la estructura pentamérica de esta inmunoglobulina.

Recientemente Diebolder y cols. [36] demostraron que las IgG al hexamerizarse en la superficie blanco a través de interacciones Fc-Fc activan en forma potenciada al complejo C1, actuando así de manera similar a la IgM. Entonces, tanto a través de IgM como de IgG, la VC se activa de forma particularmente fuerte sobre superficies que presentan epítopes antigénicos repetidos, como son las de los patógenos. C1q puede además, unirse a la lectina SIGN-R1 y a pentraxinas unidas a patógenos. C1q puede reconocer también estructuras propias alteradas, como fibras de  $\beta$ -amiloide, LDL modificada, ADN extracelular, como el presente en las NETs (del inglés, *neutrophil extracellular traps*) [37], y células apoptóticas [38], [39]. C1q facilita la eliminación de las NETs y de los cuerpos apoptóticos por células fagocíticas sin generar lisis e inflamación, lo que contribuye al mantenimiento de la tolerancia inmune [37], [40]. Uno de los blancos de C1q sobre la superficie de las células apoptóticas es el lípido aniónico fosfatidilserina, que es traslocado a la cara externa de la membrana plasmática durante el proceso de apoptosis [41]. La unión a fosfatidilserina, así como la unión a ADN, ejemplifican la capacidad del C1q de unirse a arreglos repetidos con carga negativa, que en principio pueden ser propios o expuestos por microorganismos.

La versatilidad de unión a blancos de C1q, se basa sobre todo en la estructura heterotrimérica de los dominios globulares, ya que cada subunidad posee propiedades de unión únicas. Más específicamente, los sitios de unión para IgG se encuentran en la región ecuatorial de la subunidad B, orientados hacia la cara externa de la cabeza globular, mientras que los polianiones se unen a la subunidad C, quedando posicionados en la cara interna del cono del ramillete de C1q [39].

Los restantes componentes del complejo C1 son cuatro moléculas de proteasas de serina que se unen a la región de tipo colágeno de C1q: dos moléculas de C1r y dos de C1s. El heterotetrámero formado por C1r y C1s, que es dependiente de calcio, tiene la estructura C1s-C1r-C1r-C1s, es decir que las moléculas de C1s están ubicadas en los extremos.

C1r y C1s son muy similares en estructura: poseen seis dominios, de los cuales el C-terminal es el dominio serina proteasa, mientras que los cinco restantes son dominios no catalíticos. En condiciones de no activación, C1r y C1s circulan como zimógenos. La activación de la VC requiere de interacciones múltiples entre una única molécula de C1q y su activador, por lo que el activador generalmente tiene un alto peso molecular o tiene estructuras repetidas, como ya se introdujo. La unión de dos o más de las cabezas globulares de C1q a su blanco provoca un cambio conformacional en esta proteína que da lugar a la autoactivación de C1r,



a través de un corte proteolítico a nivel de su dominio serina proteasa. Una vez activada, C1r es capaz de activar a C1s, la cual al estar más expuesta que C1r en relación a los tallos de fibra de tipo colágeno de C1q, puede continuar con la activación de los siguientes componentes de la VC.

El siguiente paso es la activación del componente C4. C4 pertenece a la familia de las  $\alpha_2$ -macroglobulinas, y está formado por tres cadenas unidas por puentes disulfuro:  $\alpha$  de 93 kDa que porta un grupo tioéster interno [42],  $\beta$  de 75 kDa y  $\gamma$  de 32 kDa. C1s activa a C4 mediante el corte proteolítico de la cadena  $\alpha$  generándose así dos fragmentos, uno soluble más chico, C4a (9 kDa), y uno más grande C4b (196 kDa). En humanos existen dos isoformas de C4, C4A y C4B, las cuales difieren en el aceptor covalente al que se unen preferentemente [43]. En la molécula de C4b, el enlace tioéster queda expuesto y es por lo tanto susceptible a ataque por nucleófilos. En la mayoría de las moléculas de C4b que se generan, el enlace tioéster se hidroliza por reacción con agua (nucleófilo mayoritario en el plasma). Sin embargo, en una cierta proporción (muy baja) de las moléculas de C4b, el tioéster reacciona con grupos amino (isoforma C4A) o hidroxilo (isoforma C4B) presentes en la superficie activadora, uniéndose así en forma covalente, mediante enlace amida o éster respectivamente, a la molécula de C4b con la superficie. Dada la extrema reactividad del enlace tioéster, las moléculas de C4b que se hidrolizan reaccionarán con nucleófilos del entorno inmediato al lugar donde se originó la activación.

Al C4b depositado se le puede asociar el componente C2, que posee un sitio de corte proteolítico. En el caso de que el C4 se haya depositado cerca del complejo C1, este C2 también podrá ser activado proteolíticamente por C1s, generando los fragmentos C2a (70 kDa) y C2b (30 kDa). C2a queda transitoriamente asociado a C4b formando un complejo enzimático inestable, la convertasa de C3 de la VC (C4b2a); C2b queda en la fase fluida. La convertasa, cuyo sitio activo proteolítico está en C2a, es capaz de activar proteolíticamente al componente principal del SC, C3.

#### **1.4.1.2 Vía de las lectinas**

Esta vía es estructural y funcionalmente muy similar a la VC. La activación de la VL se inicia por la unión de complejos por ciertas lectinas (MBL, ficolinas, colectina-11) y proteasas llamadas MASPs (del inglés, *MBL associated serine proteases*), a sus azúcares blanco. Estos complejos

son análogos al complejo C1, y cuentan también con un componente de reconocimiento (la lectina) y componentes efectores (las MASPs). A consecuencia del reconocimiento, la MASP llamada MASP-2 se autoactiva y activa a continuación a C4. A continuación se unirá C2 al C4b depositado y al igual que en la VC, el C2 que se una a C4b depositado cerca del complejo iniciador podrá ser activado por MASP-2, dando lugar a la formación de una convertasa de C3, C4bC2a, idéntica a la de la VC.

#### **1.4.1.3 Vía alternativa**

El inicio de la VA es atípico; a diferencia de las otras dos vías, la VA comienza de manera espontánea y es rápidamente amplificada o controlada según se produzca sobre superficies con alta o baja capacidad de activación (lo que en principio corresponde a superficies foráneas o superficies propias, respectivamente). La iniciación mencionada se basa en que el C3 en plasma es constantemente hidrolizado espontáneamente a bajos niveles formando C3b, que se une covalentemente a las superficies biológicas cercanas. Por ello se dice que esta vía actúa como un sistema de inmuno-vigilancia. Tras la activación de C3, C3b expone un sitio que permite la asociación con el factor B, análogo a C2. Una vez unido factor B a C3b, el primero es activado por la serina proteasa factor D (que circula activa en plasma), generándose de esta manera la convertasa de C3 de la VA, C3bBb. Esta convertasa es, como C4b2a, termodinámicamente inestable; su cinética de disociación es disminuida por la asociación de properdina, regulador positivo de la VA que no tiene análogo en la VC/VL. Dado que C3b es componente y producto de la convertasa de C3 de la VA, existe un mecanismo de retroalimentación positivo que lleva a la amplificación del depósito inicial generado por esta vía, así como también el generado por la VC y VL. La activación efectiva de la VA depende, además de la naturaleza de la superficie, de la concentración de componentes de dicha vía; la VA depende de la concentración de complemento en forma mucho más marcada que la VC y la VL.

Las tres vías del SC, que como se describió difieren en las moléculas iniciales que determinan su activación, convergen en la activación proteolítica del C3. C3 es el componente del SC más abundante en el plasma (1,2 mg/mL). Es una glicoproteína de 185 kDa formada por dos cadenas,  $\alpha$  (115 kDa) y  $\beta$  (70 kDa), unidas por un enlace disulfuro. C3, que pertenece a la

familia de las  $\alpha_2$ -macroglobulinas como C4, también posee un enlace tioéster interno en la cadena  $\alpha$ . En la forma nativa de la proteína, el tioéster se encuentra en un bolsillo hidrofóbico protegido del agua y por lo tanto es relativamente estable. La activación de C3, mediada por las convertasas mencionadas, C3bBb o C4b2a, ocurre por un corte proteolítico en la cadena  $\alpha$ , lo cual genera los fragmentos C3a (9 kDa) y C3b (176 kDa). C3a, que va a la fase soluble, es una anafilotoxina que participa en el reclutamiento y activación de células efectoras de la respuesta innata. C3b actúa como opsonina, marcando a la superficie donde se depositó para su posterior fagocitosis, y permite la continuación de la cascada sobre la superficie. La unión de C3b a la superficie activadora tiene lugar por un mecanismo basado en el tioéster interno, muy similar al ya descrito para C4, con la diferencia de que solo existe una forma de C3, que tras la activación se une preferentemente a grupos hidroxilo. El C3b generado da lugar a nuevas convertasas de C3 de la VA, en lo que es el asa de amplificación de esta vía ya mencionada, y puede dar lugar a la formación de convertasas de C5, como se explica en la siguiente sección.

#### **1.4.1.4 Vía terminal**

Luego de que se alcanza una cierta densidad de moléculas de C3b depositadas sobre la superficie activadora, se inicia la activación de la vía terminal. En esta, el depósito de una molécula de C3b sobre las convertasas de C3 (C4b2a y C3bBb) cambia la especificidad de sustrato de dichas convertasas de C3 a C5, volviéndolas así convertasas de C5 (C4b2a3b y C3b2Bb). C5 pertenece a la misma familia de proteínas que C4 y C3, pero carece del enlace tioéster interno. C5 (190 kDa) está formado por dos cadenas,  $\alpha$  (115 kDa) y  $\beta$  (75 kDa). La cadena  $\alpha$  es la que sufre procesamiento proteolítico por la convertasa de C5, generándose los fragmentos C5a (11 kDa) y C5b (80 kDa). C5a es una potente anafilotoxina que se une a receptores celulares (C5aR1 y C5aR2) y promueve una serie de eventos inflamatorios, incluyendo fagocitosis, reclutamiento de leucocitos, inducción de estallido respiratorio, liberación de histamina y vasodilatación. Como ya se mencionó, C5b no posee enlace tioéster, pero es capaz de asociarse con otros componentes del SC que en última instancia se insertarán en membranas lipídicas formando el MAC. Tras la activación, C5b queda asociado a la convertasa de C5 y es capaz de unirse a C6, formándose el complejo C5b-6. A este complejo se le une C7, que promueve la disociación con la convertasa y le brinda lipofilicidad al complejo

en formación, provocando la asociación de C5b-7 con membranas. Luego se une al complejo el componente C8, el cual dirige la asociación con C9, que se inserta en membranas lipídicas y polimeriza dando lugar finalmente al MAC, complejo en forma de poro que permite el pasaje de agua, iones y pequeñas moléculas.

#### **1.4.2 Mecanismos de regulación del sistema complemento, con énfasis en la VC**

Dado que la activación del SC es un proceso autoamplificado (cada componente activado puede actuar sobre muchas moléculas de su sustrato, amplificando el evento inicial), y que los efectos desencadenados por la activación son igualmente dañinos para superficies propias como extrañas, la activación del SC está finamente regulada para evitar el daño a células propias. Existen así mecanismos de regulación múltiples presentes en todas las etapas de la activación. Estos reguladores son o bien de superficie celular o bien solubles. Los segundos son en principio capaces de discriminar entre superficies propias y no propias, si bien como se explica en la sección 1.4.3, existen patógenos capaces de reclutar dichos reguladores sobre su superficie y de esta manera evitar la activación del SC. A continuación se describen los principales mecanismos de regulación del SC, con foco en aquellos relacionados al control de la VC.

Uno de los niveles de control más importante de la VC es el control de su iniciación. Este control es ejercido por C1 inhibidor (C1-INH), una proteína secretada de 105 kDa altamente glicosilada que es el único regulador negativo de la iniciación de la VC. Este regulador pertenece a la familia de las serpinas de inhibidores de proteasas de serina, y por lo tanto actúa como un sustrato suicida. C1-INH le presenta a C1r y/o C1s activadas (u otras proteasas blanco que no pertenecen al SC) un enlace peptídico que coincide con la especificidad de sustrato de dichas proteasas. Las propiedades del inhibidor determinan que la hidrólisis catalizada de dicho enlace se detenga en un paso previo a la resolución del complejo inicial enzima-sustrato, de modo que el C1-INH permanece unido covalentemente a C1r y/o C1s, inhibiéndolas. C1-INH además separa a C1r y C1s activadas del complejo C1. De estas formas, C1-INH previene la activación de C4 y C2. La actividad inhibitoria de este regulador es relativamente pobre, pero es potenciada por la presencia de polianiones, como pueden ser la heparina, glicosaminoglicanos o polifosfatos [44], [45]. Se postula que esta potenciación se

debe a que los polianiones se asocian al inhibidor y a su vez atraen a regiones cargadas positivamente presentes cerca de los sitios activos de las proteasas [46].

EL control del SC a nivel de las convertasas de C3 y C5 es llevado a cabo por proteínas de la familia RCA (del inglés *regulators of complement activation*). Estas proteínas son codificadas por un único *cluster* génico y se caracterizan por estar formadas por dominios llamados CCP (del inglés *complement control protein*), estabilizados por puentes disulfuro. Las proteínas RCA pueden actuar como cofactores de la proteasa de serina factor I (fI), que inactiva proteolíticamente a C3b y C4b, generando las formas iC3b e iC4b (que ya no pueden formar convertasas). Las proteínas RCA también pueden inhibir la asociación y promover la disociación de las convertasas ya formadas.

Varias de las proteínas RCAs regulan a las tres vías del SC. Ejemplos de esto son los reguladores asociados a membrana CR1, DAF y CD46. CR1 y CD46 actúan como cofactores del fI; CR1 nuevamente, y DAF promueven la disociación de las convertasas. Además existen proteínas RCA solubles, que controlan la activación del SC en fase fluida y además se asocian a superficies celulares y a matrices extracelulares, por lo que controlan la activación en dichas superficies. Estos son factor H (fH), FHL-1 (del inglés *factor H like-1*) y C4bp (del inglés *C4 binding protein*). Las dos primeras son los principales reguladores de la VA: se unen a C3b y actúan como cofactores del fI, además de disociar los complejos de éste con factor B. Si bien fH puede controlar la activación en fase fluida o sobre superficies, FHL-1 solo actúa en fase fluida [47]. Además de los efectos sobre la VA, se postula que el fH puede actuar como regulador negativo de la activación de la VC, al competir con C1q por la unión de moléculas cargadas negativamente [48], que se mencionó en la sección 1.4.1.1.

C4bp, también perteneciente a la familia RCA, es el principal inhibidor de la convertasa de C3 de la VC/VL. C4bp es una glicoproteína multimérica de 500 kDa, expresada principalmente por el hígado. En el plasma humano puede circular bajo distintas isoformas, siendo la mayoritaria la isoforma que contiene 7 cadenas  $\alpha$  idénticas (75 kDa) y una cadena  $\beta$  (40 kDa). Estas cadenas están unidas por interacciones anfipáticas y puentes disulfuro. Las isoformas que contienen cadena  $\beta$  circulan asociadas a la proteína S, que participa en la regulación de la coagulación. C4bp inhibe la activación de C3 al unirse al C4b depositado e impedir su asociación con C2, así como disociando la convertasa de C3 (C4b2a) ya formada y actuando como cofactor del fI para la inactivación de C4b.

Finalmente existen reguladores que actúan a nivel de la vía terminal. Entre ellos se encuentran las proteínas solubles clusterina y vitronectina, que se unen a los complejos nacientes C5b-7, C5b-8 y C5b-9, e impiden que estos se inserten en las membranas lipídicas. La vía terminal también puede ser controlada por un regulador anclado a membrana, CD59, que inhibe el último paso del ensamblaje del MAC, al unirse a C8 y C9 en los complejos C5b-8 y C5b-9, inhibiendo el reclutamiento y la polimerización de C9.

### **1.4.3 Mecanismos de evasión, con énfasis en aquellos que controlan a la VC**

El SC del hospedador ejerce una presión evolutiva significativa sobre los patógenos. Esto ha llevado a que estos organismos hayan adquirido un gran repertorio de estrategias para protegerse de los efectos deletéreos de este mecanismo efector de la respuesta inmune. En los últimos años se han caracterizado una gran variedad de estrategias de evasión del SC, en las cuales los patógenos secretan proteasas que degradan componentes, reclutan sobre su superficie reguladores negativos del hospedero y/o expresan inhibidores de complemento. Hipotéticamente, la activación de la VC en particular podría ser controlada en todos los pasos de su activación. En este sentido, varios tipos de patógenos, entre ellos los helmintos, han desarrollado moléculas inhibitorias, en casos únicas, que alteran la funcionalidad de la VC. A continuación se describen algunos de los mecanismos de evasión de la VC adoptados por patógenos.

Como se mencionó, la VC se distingue de las otras dos vías de activación del SC por ser activada por inmunocomplejos. De acuerdo con esto, existen varias moléculas de evasión que actúan a nivel de las inmunoglobulinas. Para empezar, diversos patógenos secretan proteasas que degradan inmunoglobulinas [49]. Luego, existen patógenos que producen proteínas que se unen a Fc de inmunoglobulinas impidiendo su unión a C1q. *Staphylococcus aureus* tiene asociada a su membrana a la proteína A, y secreta a la proteína de unión a inmunoglobulinas llamada Sbi (del inglés *Staphylococcal binder of Ig*), las cuales se unen a la región Fc de las IgG, bloqueando así la unión con C1q [50], [51]. *Streptococcus* de los grupos C y G poseen asociados a su pared celular a la proteína G, que actúa de la misma manera que las proteínas A y Sbi [52].

La siguiente posibilidad es la producción de proteínas que se unen a C1q, impidiendo su unión a inmunocomplejos y/o activación. La proteína estructural paramiosina de los parásitos

*Trichinella spiralis* [53], *Schistosoma mansoni* y *Taenia solium* [54] se une a la región globular de C1q, impidiendo el reconocimiento de los inmunocomplejos. Otra forma de intervención relacionada a C1q es la expresión por *Trypanosoma cruzi* de la proteína calreticulina, que se une a la región de tipo colágeno de ese componente, impidiendo la activación de la VC. Se desconoce aún si este mecanismo interfiere indirectamente con la unión a inmunocomplejos y/o con la activación del complejo C1 [55]. *Staphylococcus aureus* expresa en su superficie la proteína denominada CNA, que se une al tallo de C1q y lo estabiliza en una conformación que posee una menor afinidad por inmunocomplejos [56].

Avanzando en la activación de la VC, existen también mecanismos de inhibición por disociación del tetrámero de proteasas C1r/C1s de C1q. Este tipo de mecanismo fue descrito como una de las funciones efectoras de la calreticulina de *T. cruzi* ya mencionada, así como también para la proteína de la cubierta de astrovirus humano [57]. Otra forma de inhibición del C1 es la interferencia con la activación de C1r mediada por la lipoproteína de la bacteria *Borrelia burgdorferi* denominada BBK32. Esta proteína se una con alta afinidad a C1r e impide su auto-activación, impidiendo por lo tanto también la activación de C1s (García 2016). Por otro lado, Ooi y cols. [58] reportaron la inhibición de C1s por un inhibidor de tipo serpina (GmmSRPN10) secretado por la mosca hematófaga tsetsé, que previene la activación del SC en el tracto alimentario del insecto.

Una vez activado el complejo C1, existen mecanismos que actúan sobre la disponibilidad de componentes para formar la convertasa de C3 de la VC, es decir de C4 y C2. Behnsen y cols. [59] describieron la secreción por *Aspergillus fumigatus* de la proteasa Alp1, que es capaz de degradar, entre otros componentes, a C4. Por otro lado, Inal y cols. [60] reportaron la presencia de un receptor del componente C2 sobre la superficie de parásitos trematodes del género *Schistosoma*, que secuestra a C2 e inhibe la formación de la convertasa de C3 de la VC. El siguiente paso en la activación de la VC, cuyo control ha sido adoptado como estrategia ampliamente por diversos patógenos, es la formación de la convertasa de C3. Este control puede ejercerse por un lado por la expresión de diferentes moléculas sobre la superficie de los patógenos que reclutan a C4bp del hospedero [61]–[63], [64]. Por otro lado, algunos organismos secretan factores de virulencia que imitan a los reguladores negativos del hospedero; como ejemplos de esto están la proteína de adherencia extracelular (Eap) de *S. aureus* [65] y la proteína inhibidora de complemento (CIP) secretada por *Streptococcus agalactiae* [66], que se unen a C4b e impiden su asociación con C2.

Normalmente existe un fino balance en la activación del SC, mantenido por las proteínas de control, que evita el agotamiento de las proteínas activas. Ciertos patógenos han desarrollado mecanismos que alteran dicho balance, conduciendo a una activación exacerbada que lleva al agotamiento del complemento. Por ejemplo, *Streptococcus pneumoniae* secreta la endopeptidasa PepO, que se postula se une a C1q de forma similar a los inmunocomplejos, conduciendo al consumo de componentes [67]. PepO se une además al inhibidor C4bp, regulando de esta manera en un paso posterior de la vía, la misma activación que inicia a nivel de C1. Como otro ejemplo, Honda-Owaga y cols [68] describieron la secreción por *Streptococcus pyogenes* de la proteasa SpeB, que degrada al C1-INH, induciendo una sobre-activación y agotamiento de los componentes de la VC que sin embargo no se traduce en la formación de MAC, ya que la proteasa además degrada a varios componentes de la vía terminal.

Considerando que la VA actúa como un mecanismo de amplificación de las otras dos vías del SC, su inhibición también implica, indirectamente, control de los efectos de la VC. En este sentido, una gran variedad de patógenos, entre ellos *E. granulosus* [69], reclutan al inhibidor de la VA el factor H o a las moléculas relacionados con factor H (CFHR, del inglés *complement factor H related*), que inactivan a C3b y/o disocian a la convertasa de C3 de la VA [70].

Finalmente, existen mecanismos de evasión basados en la interferencia con los pasos posteriores, comunes a todas las vías: moléculas inhibidoras de convertasas de C5, moléculas que se unen a C5 y previenen su activación, antagonistas del receptor de C5a, proteasas que inactivan a C5a, y moléculas que inhiben la formación del MAC [71].

En resumen, se puede decir que si bien existen mecanismos de evasión que actúan a casi todos los niveles de la activación del SC, se destaca que la mayoría de estas estrategias se concentran en las primeras etapas, es decir hasta la formación de las convertasas de C3. De todos modos, suele observarse que un mismo patógeno expresa diversos mecanismos para evitar la activación del SC. Estas estrategias de evasión multifactoriales minimizan la formación de mediadores pro-inflamatorios, en particular de C5a.

### **1.5 *E. granulosus* y el sistema complemento**

La naturaleza crónica de la hidatidosis, junto con el extraordinario tamaño que alcanza la hidátide en el parénquima de órganos internos, su inmunogenicidad y localización sistémica,



implican un gran potencial para generar respuestas inflamatorias. De no ser controlado este potencial por mecanismos reguladores, la inflamación desencadenada no solo se dañaría al parásito, sino que también comprometería la supervivencia del hospedador. Por lo tanto, la capacidad de controlar los mecanismos inflamatorios, incluyendo la activación del SC, debe ser una parte importante y compleja de la adaptación del parásito a su forma de vida.

Nuestro grupo ha trabajado en el estudio de la interacción de *E. granulosus* y el SC desde los años 1990. Se observó que en las etapas pre-quísticas, *E. granulosus* promueve una respuesta inflamatoria local, con activación del SC principalmente a través de la VA [72]. En particular, los protoscólices, al diferenciarse en hidátides (en la vía de desarrollo reverso en que se basa el sistema de infección experimental más empleado), pierden esta capacidad de activar fuertemente el SC, y este cambio es esencial para lograr la resolución de la inflamación [73]. Además, ensayos de infección por *E. granulosus* en ratones deficientes en C5 y controles demostraron la importancia del SC, y de ese componente específicamente, en la restricción del establecimiento y también del posterior crecimiento del parásito, al menos en ese modelo experimental. En los ratones deficientes en C5 existió menor reclutamiento de eosinófilos al sitio de infección, a partir de lo cual se propuso que la generación de C5a era probablemente un mecanismo importante involucrado en los efectos observados de C5 [74]. Esto es esperable en particular para los efectos del SC sobre el crecimiento del parásito ya establecido, ya que en esta etapa cualquier opsonización y/o formación del MAC ocurrirían sobre la CL, acelular. Sin embargo, no se puede descartar que en las fases tempranas previas a la CL, los restantes mecanismos efectores del SC (opsonización y formación del MAC), sí sean dañinos para el parásito.

Teniendo en cuenta que el evento clave en la diferenciación de las oncosferas (y en la vía reversa, de los protoscólices) hacia hidátides es la formación de la CL, es fácil suponer que esta estructura desempeña un papel importante en la regulación de la activación del SC. En concordancia con esto, al comparar la capacidad de activar el SC de distintos extractos solubles de *E. granulosus*, se encontró que el correspondiente a la pared de la hidátide era significativamente menos activador que los correspondientes al líquido hidático y a protoscólices, siendo esta diferencia más notoria a nivel de activación del complejo terminal [75]. Estos resultados constituyeron la primera evidencia de que la CL era decodificada por el sistema inmune innato esencialmente como una estructura no inflamatoria y llevaron al grupo

a enfocar el estudio de la interacción del parásito con el SC sobre la CL en detrimento de otras estructuras (y estadios del parásito).

## **1.6 Antecedentes sobre la interacción entre el sistema complemento y la capa laminar**

### **1.6.1 Antecedentes vinculados a la VA**

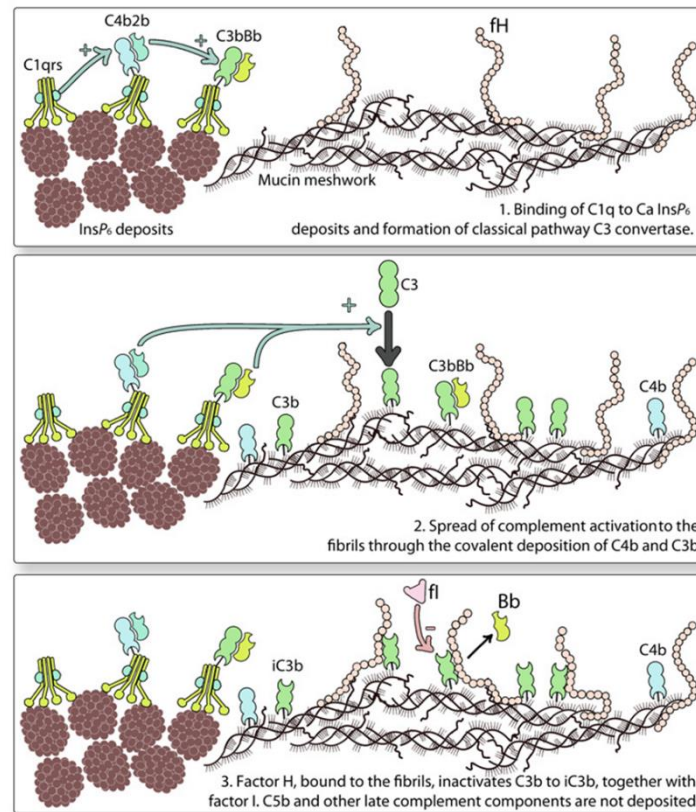
Como ya se mencionó, con respecto a el líquido hidático y los protoscólices, la CL de *E. granulosus* es un activador pobre del SC. Dadas las evidencias de activación de la VA por estadios pre-hidátide y la disminución de la capacidad de activación de esta vía una vez formada la CL [72], [75], se enfocaron los estudios iniciales a mecanismos de control de la activación de esta vía. Una búsqueda de inhibidores de la convertasa de C3 de la VA en extractos de la CL encontró actividad cofactor para la inactivación de C3b, que dependía totalmente de factor H del hospedero [69]. Además la inactivación de C3b a iC3b sobre la CL es muy rápida en comparación con superficies activadoras de complemento [76], [77]. Estos resultados sugieren que la CL es capaz de reclutar factor H sobre su superficie y por lo tanto, de controlar la VA.

### **1.6.2 Antecedentes vinculados a la VC**

El control de la activación sobre la CL de la VA solamente no parece ser suficiente, ya que la CL posee cantidades significativas de IgG e IgM del hospedero unidas *in vivo*, tanto en infecciones naturales como en infecciones experimentales en ratón que podrían activar la VC [30], [78], [73]. Estas inmunoglobulinas reconocerían específicamente a la CL y no estarían simplemente adsorbidas, ya que solo son removidas de la CL mediante tratamiento con agentes caotrópicos o por extracción con glicina a pH 2 [28]. La extracción del InsP<sub>6</sub> cálcico de la CL con EDTA no afecta la cantidad de inmunoglobulinas detectables en la misma, lo que sugiere que las inmunoglobulinas tienen como blanco a las mucinas, y no al InsP<sub>6</sub> cálcico [28]. En el caso de material proveniente de infección experimental de ratones Balb/C, están

presentes los isotipos IgG1, IgG2a/c e IgM; de estos isotipos, IgM e IgG2a son activadores del SC [33]. No se dispone de datos similares para infecciones en hospederos naturales.

Interesantemente, se observó que el  $\text{InsP}_6$  cálcico puro (generado a partir de  $\text{InsP}_6$  sódico comercial y cloruro de calcio) une selectivamente C1q de suero humano [76]. También se observó que a una dilución de suero humano 1:4 *in vitro*, el depósito covalente de C3 sobre la CL ocurre más lentamente si se elimina el  $\text{InsP}_6$  cálcico. A partir de estas dos observaciones (y del hecho que el  $\text{InsP}_6$  como tal químicamente no puede actuar como aceptor covalente), se especuló con la posibilidad de que los gránulos pudieran generar iniciación de la activación de la VC, la cual se propagaría hacia las mucinas, donde sería controlada por la presencia del fH reclutado (Figura 1.8).



**Figura 1.8. Modelo para la activación de la VC sobre los gránulos de  $\text{InsP}_6$  cálcico.** El detalle de dicho modelo se explica en el texto principal de la sección 1.6.2. Tomado de [27].

En relación a posibles mecanismos de control de la VC sobre la CL, no se encontró evidencia de presencia en extractos de CL de inhibidores de la actividad enzimática de las proteasas C1r/C1s [79].

### **1.6.3 Antecedentes vinculados a la VL**

Con respecto a la VL, no se detectó unión de MBL *in vivo* a hidátides de infección natural en bovinos [79]; no se ha analizado la posible unión de ficolinas a la estructura.

## 2. Objetivos

### 2.1 Resumen del problema planteado

Los datos previos a la Tesis, fragmentarios, sugieren que durante las etapas de pre-hidátide de infección por *E. granulosus* larvario, el parásito induce una respuesta inflamatoria en el hospedador en la que participa la activación del SC. Al ocurrir el desarrollo a hidátide, la CL restringe la activación del SC sobre la superficie del parásito, en parte por el secuestro de factor H, inhibidor de la VA. Sin embargo, esto no parece ser suficiente para el control global del SC, considerando que la CL resulta opsonizada por abundantes anticuerpos, que en principio podrían activar la VC. Por otro lado, uno de los motivos moleculares principales de la CL, el  $\text{InsP}_6$  cálcico es capaz de unir selectivamente el primer subcomponente de la VC, C1q, de suero humano. La presencia entonces en la CL de dos tipos de moléculas (anticuerpos e  $\text{InsP}_6$  cálcico) capaces de unir C1q plantea la posibilidad de activación de la VC por dos mecanismos paralelos, así como de competencia entre éstos. A su vez, la activación de la VC podría también ser controlada, por mecanismos desconocidos, en los pasos posteriores al depósito de C3b.

### 2.2 Objetivo general

Caracterizar primariamente a nivel molecular el inicio, propagación y control de la VC del SC sobre la CL de *E. granulosus*, con foco en los posibles efectos de la unión de C1q por el  $\text{InsP}_6$  cálcico.

### 2.3 Objetivos específicos

1. Determinar si la CL es capaz de activar la VC.
2. Determinar si la unión de C1q por el  $\text{InsP}_6$  cálcico tiene impacto sobre la activación de los pasos iniciales de la VC sobre la CL.
3. Determinar si la presencia del  $\text{InsP}_6$  cálcico tiene impacto sobre la forma en que prosigue la activación de la VC sobre la CL más allá de sus pasos iniciales hasta la activación de C5 inclusive.

## 3. Materiales y Métodos

### 3.1 Preparación de herramientas de trabajo

#### 3.1.1 Obtención de suspensiones de partículas de CL

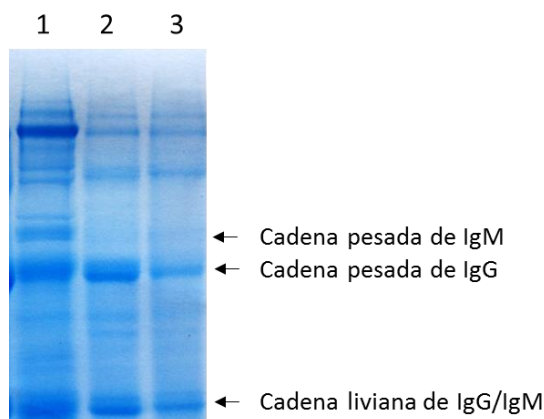
En esta Tesis se utilizó material parasitario proveniente de infecciones experimentales en ratones y de infecciones naturales en humanos.

Las hidátides de origen de ratón fueron gentilmente cedidas por el Dr. Gustavo Mourglia-Ettlin, del Laboratorio de Inmunología, y provienen de infección secundaria intraperitoneal de hembras de la cepa Balb/c de 6 a 7 semanas de edad [80]. Para las infecciones se utilizaron protoscoíces viables provenientes de infecciones naturales en ganado bovino uruguayo, por lo que se presume que corresponden a *E. granulosus sensu stricto* [2]. Las hidátides frescas (sin congelar) se incubaron en solución amortiguadora Tris/HCl 20 mM, pH 7,4 conteniendo NaCl 135 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM, Tritón X-100 0,1% m/v y NaN<sub>3</sub> 0,05% m/v. La presencia de detergente y azida se utilizó para matar al parásito y desprender la CG de la CL. Las hidátides que presentaban CG desprendida de la CL visible macroscópicamente se puncionaron con jeringa y se aspiró el líquido hidático junto con las células de la CG [27]. A continuación se removió el material fibroso del hospedador (de color amarillento) que rodea la cara externa de la hidátide por frotado de dicha superficie sobre papel de filtro. Las CL así separadas se incubaron con el tampón inicial durante 30 minutos y luego se lavaron extensamente con NaCl 2 M y CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM para eliminar las proteínas adsorbidas, que son principalmente provenientes del hospedero [7], [30], [69], [78]. Se pasaron a las CL nuevamente al tampón inicial por lavados repetidos. A partir del material así procesado se preparó una suspensión de partículas de tamaño máximo estimado de 1 mm x 1 mm x 0,1 mm (correspondiendo esta última dimensión al espesor típico de la CL en hidátides de infección en ratón), de más fácil manipulación que el material inicial. Para ello se utilizó un homogeneizador eléctrico (*TissueRuptor*, Qiagen). A fin de determinar el contenido de masa seca de la suspensión obtenida, se tomó una alícuota de 1 mL de la misma, prestando especial atención a mezclar antes de la toma, y se la pasó a un tubo de 1,5 mL previamente masado. Se lavó 4 veces con agua destilada en el propio tubo, se llevó a un volumen aproximado de 500 µL, se congeló a -

80°C, se liofilizó y se masó. Se determinó entonces la masa seca de CL en el tubo como la diferencia entre las masas inicial y final. Con este dato se calculó la concentración (mg/mL) de masa seca de CL de la suspensión “stock” original. Dicha suspensión stock, que como surge de lo anterior está en un tampón conteniendo  $\text{NaN}_3$ , se conservó siempre a 4°C.

En relación al material hidático proveniente de infecciones naturales en el ser humano, se trabajó con dos muestras, que se denominaron Muestra 1 y Muestra 2. La Muestra 1 correspondía a una mezcla de materiales hidáticos de tres pacientes, dos con localización pulmonar y uno con localización hepática, en todos los casos genotipados como *E.granulosus sensu stricto*. Estas muestras fueron amablemente donadas por la Dra. Mara Mariconti (Universidad de Pavia, Italia). Se realizó un *pool* porque la cantidad de material parasitario de cada paciente no era suficiente para emplearla individualmente en los experimentos. De los datos de nuestros colaboradores S. Miles y G. Mourglia-Ettlin (Laboratorio de Inmunología) sobre la presencia de isotipos de anticuerpos en estos materiales individuales y de la cantidad de cada uno de ellos utilizada para generar la “Muestra 1”, se deduce que en la misma son mayoritarios los isotipos IgG1 e IgG2, habiendo también IgA, pero no IgM. La Muestra 2, que correspondía a CL de hidátides de un único paciente alojadas en la columna vertebral, fue amablemente cedida por el Dr. Daniel Da Rosa, de la Cátedra de Parasitología de Facultad de Medicina. Esta muestra, proveniente de Uruguay, presumiblemente pertenece también a *E. granulosus sensu stricto*. Para la obtención de la suspensión de partículas, se sometieron a las hidátides de las muestras 1 y 2 al mismo tratamiento que el realizado para las muestras de ratón, obteniéndose dos suspensiones de concentración conocida. Se debe señalar que por tratarse de muestras congeladas, la eliminación del material proveniente de la CG y/o del hospedero pudo no haber sido igualmente completa como lo fue para el material de origen de ratón.

En la Figura 2.1 se muestra un SDS-PAGE de las muestras de CL de ambos orígenes de hospedero, se puede observar que ambas muestras de CL de origen humano poseen un patrón de bandeo muy similar entre sí, y que al contrario de la CL de origen de ratón, no poseen IgM.



**Figura 2.1 SDS-PAGE al 10% p/v de acrilamida en condiciones reductoras de materiales de CL.** Se muestra de izquierda a derecha (1) 0,3 mg de masa seca de CL de origen de ratón; (2) 0,6 mg de masa seca de CL origen humano (correspondiente a la “Muestra 1”), y (3) 0,6 mg de masa seca de CL de origen humano (“Muestra 2”). Se observa que el patrón de las bandas entre las muestras de CL de origen humano son muy similares entre sí, y que en el caso de CL de ratón hay una banda correspondiente a la cadena pesada de IgM, que está ausente en las muestras humanas.

### 3.1.2 Modificación de la CL para eliminación de componentes específicos presentes en la misma

#### 3.1.2.1 Tratamiento de la CL con EDTA: eliminación de gránulos de $\text{InsP}_6$ cálcico

Como se describió en la Introducción, la insolubilidad del  $\text{InsP}_6$  en presencia de ion  $\text{Ca}^{++}$  hace que en condiciones extracelulares este compuesto precipite dando lugar a la formación de los “gránulos de  $\text{InsP}_6$  cálcico”, que aparecen distribuidos en el interior de la malla de mucinas de la CL [7]. En consecuencia, el tratamiento de la CL con EDTA, por quelado del ion  $\text{Ca}^{++}$ , disuelve al  $\text{InsP}_6$ , eliminando los gránulos detectables al microscopio electrónico. Esta extracción es altamente selectiva, ya que el análisis por  $^1\text{H}$ -RMN del extracto correspondiente arroja solamente las señales correspondientes al  $\text{InsP}_6$  (y al EDTA) [26].

Para cada experimento, se preparó la cantidad necesaria de suspensión de CL sin  $\text{InsP}_6$  cálcico por incubación con EDTA. En primer lugar se lavó la cantidad necesaria de suspensión stock de CL (descrita en la sección 3.1.1) tres veces (en tubo de 50 mL) con 40 mL cada vez de la solución amortiguadora Tris/HCl 20 mM, pH 8 para eliminar el Tritón X-100, exceso de sales y azida presentes en la suspensión stock. Se cuenta con cuantificaciones precisas de la cantidad



de  $\text{InsP}_6$  cálcico presente en la CL [25], lo cual permite calcular la cantidad mínima de EDTA necesaria para asegurar su extracción completa de una muestra dada [27]. Así, se usó la relación 1 mL de tampón Tris/HCl 20 mM, pH 8 conteniendo EDTA 10 mM cada 0,9 mg de masa seca de CL, lo que corresponde a un exceso molar de casi 7:1 de EDTA frente a la cantidad de calcio presente en la CL. La incubación de la CL con tampón conteniendo EDTA se realizó a temperatura ambiente durante 15 minutos y con agitación. Tal como estaba reportado previamente [27], se observó que la CL cambiaba su aspecto de opaco a translúcido al ser eliminados los gránulos. Finalizada la incubación con EDTA, se realizaron 4 lavados de la suspensión por decantación/centrifugación en tubo de 50 mL con 40 mL de VBS<sup>++</sup> cada vez.

### **3.1.2.2 Tratamiento de la CL con la preparación proteolítica pronasa: eliminación de inmunoglobulinas**

El tratamiento con la preparación proteolítica pronasa permite eliminar totalmente las inmunoglobulinas del hospedero presentes en la CL sin afectar profundamente la malla mucínica, y en particular sin alterar el tamaño ni apariencia de las partículas de suspensiones de CL [10], [28]. En este trabajo se aplicó dicho tratamiento a la suspensión de CL previamente tratada con EDTA, por razones que se explican en la sección 4.1.2.

Se tomó la cantidad necesaria de suspensión stock de CL para realizar un experimento dado, y se sometió a tratamiento con EDTA (como se describió en la sección anterior), pero en lugar de lavar con VBS<sup>++</sup>, se llevó a tampón Tris/HCl 20 mM pH 8 mediante 3 lavados por decantación/centrifugación con 40 mL cada vez, en tubo de 50 mL. Se prepararon alícuotas equivalentes a 0,9 mg de masa seca de CL en tubos de 1,5 mL y se llevó a volúmenes de 60  $\mu\text{L}$  por tubo de tampón Tris/HCl 20 mM pH 8, logrando así una concentración de 15 mg de masa seca por mL. Para la digestión en sí, a cada muestra se le agregaron 60  $\mu\text{L}$  de solución de pronasa (Sigma #P5147-1G) en el mismo tampón, de forma de obtener una concentración final en la mezcla igual a 0,125 mg de enzima/mL. Para el tratamiento control, se agregaron 60  $\mu\text{L}$  por tubo del tampón solamente. En ambos casos se incubó toda la noche a 37°C en estufa con agitación. Luego, las muestras digeridas y control se lavaron por decantación 5 veces con NaCl 2 M, 0,1% Tween 20, empleando en cada lavado un cociente de dilución (definido como el volumen de material insoluble decantado sobre el volumen total de lavado) de 1/15. A continuación se realizaron 5 lavados con VBS<sup>++</sup> manteniendo el cociente mencionado

previamente. Esto implica que la pronasa fue diluida  $6 \times 10^{11}$  veces por los lavados, lo cual asegura que la pronasa no afecta los pasos experimentales posteriores.

Se verificó la eliminación de los anticuerpos presentes en la CL por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), como se describe en la sección 3.2.2.

### **3.1.3 Obtención de suero humano normal producido en el Laboratorio**

Se dejó coagular la sangre de 5 donantes sanos durante 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  en tubos de plástico de 50 mL. Luego se dejó 1 hora a  $4^{\circ}\text{C}$  para facilitar la retracción del coágulo y se centrifugó 15 minutos a  $1000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$ . El suero se congeló por goteo en nitrógeno líquido y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Las alícuotas a ser utilizadas se descongelaron en baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$  y luego se mantuvieron en hielo. En ningún caso se utilizó suero humano normal mantenido a  $4^{\circ}\text{C}$  ni muestras que hubieran sido congeladas y descongeladas.

## **3.2 Técnicas generales**

### **3.2.1 Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA)**

Para concentrar las proteínas presentes en las muestras para su análisis por SDS-PAGE, se las precipitó mediante agregado de TCA al 10% (m/v final), seguido de incubación durante 30 minutos en hielo. Luego se centrifugó a  $10000 \text{ g}$  durante 15 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 mL de acetona fría por tubo. Se agitó y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Se descartó nuevamente el sobrenadante y se dejó evaporar el remanente de acetona. El material precipitado se resuspendió en un volumen apropiado de tampón de muestra 2X de SDS-PAGE y de ser necesario, se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

### **3.2.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

La electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) se realizó de acuerdo a lo descrito en [81]. Se emplearon geles concentradores al 3% m/v y geles separadores de porcentaje de acrilamida variables (de 8 a 12,5% m/v) según el ensayo, todos de 1,5 mm de

espesor. Las electroforesis se realizaron en el sistema *Mini Protean 3* de Bio-Rad, a 30 mA constante por gel y temperatura ambiente. A las muestras disueltas en solución amortiguadora de muestra 2X (Tris/HCl 0,2 M, pH 8, urea 8 M, SDS al 0,2 % m/v, conteniendo azul de bromofenol) se les agregó el agente reductor ditioneitol (DTT) a concentración final de 40 mM, y se calentó a 100°C durante 5 minutos. Las muestras se corrieron junto con el marcador de peso molecular de amplio rango Sigma #S8445.

### **3.2.3 Tinción con azul brillante de Coomassie**

Los geles de poliacrilamida se tiñeron con azul de Coomassie R-250 (al 0,1% m/v disuelto en ácido acético al 10% v/v y metanol al 25% v/v en agua) durante 30 minutos o hasta que se alcanzara un color homogéneo, a temperatura ambiente con agitación. Los mismos se decoloraron por inmersión en solución de desteñido (metanol al 5% v/v y ácido acético al 7,5% v/v, en agua) el tiempo necesario, a temperatura ambiente con agitación.

### **3.2.4 Transferencia húmeda a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF)**

Las membranas de PVDF (Millipore, #IPVH00010) se incubaron con metanol durante 5 minutos. Luego los geles de poliacrilamida y las membranas de PVDF se equilibraron con solución de transferencia (Tris base 48 mM, glicina 39 mM y metanol al 20% v/v) y se dispusieron en el *cassette* de transferencia entre papeles de filtro embebidos en la misma solución (en el orden: ánodo/papeles de filtro/gel/membrana/papeles de filtro/cátodo) utilizando el equipo *Mini-PROTEAN Tetra Cell and Blot Module* de Bio-Rad. Las transferencias se realizaron a razón de 56 V durante toda la noche a 4°C. Una vez finalizado el proceso, se incubaron las membranas en solución de bloqueo (PBS conteniendo Tween-20 al 0,1% m/v y seroalbúmina bovina [BSA] al 0,2%) durante 1 hora a temperatura ambiente.

### **3.2.5 Western blots**

Las membranas obtenidas según lo descrito en la sección anterior se lavaron con 50 mL de solución de lavado (PBS conteniendo Tween-20 al 0,05% m/v) durante 5 minutos con agitación y a continuación se incubaron con 2 mL de la dilución del anticuerpo primario correspondiente

en solución de bloqueo toda la noche a 4°C o durante 2 horas a temperatura ambiente, siempre con agitación.

A continuación se lavaron las membranas 4 veces con solución de lavado y se las incubó durante 1 hora y media a temperatura ambiente con 2 mL de anticuerpo secundario diluido en solución de bloqueo. El anticuerpo secundario fue anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (Calbiochem, #401393) en dilución 1/5000, o anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Calbiochem, #401253), en dilución 1/2000, según el anticuerpo primario fuera de conejo o ratón, respectivamente. Luego se realizaron 4 lavados en condiciones iguales a los anteriores y se reveló mediante el agregado de sustrato quimioluminiscente (*ECL Supersignal West Pico Chemiluminescent substrate*, Thermo Pierce, #34078). Los blots se visualizaron en el equipo *Universal Hood II* de Bio-Rad. Se realizó la cuantificación de la integral de intensidad sobre área de las bandas empleando el software *Quantity One* (versión 4.6.2), definiendo el área correspondiente a cada banda y utilizando el método *local background subtraction* (sustracción de fondo local). Este método toma como intensidad de fondo la correspondiente al borde del área definida como "banda", y se lo resta al valor de intensidad medido en cada caso.

### **3.3 Estrategia experimental general y reactivos comerciales de complemento empleados**

Los estudios realizados se basaron principalmente en ensayos *in vitro* de activación y control del complemento sobre la superficie de partículas macroscópicas de la CL. Como se explicó en la sección 3.1.1, la preparación del material de CL incluyó pasos de lavado con una solución con alta fuerza iónica (NaCl 2M), de forma de trabajar solo con los componentes intrínsecos de la estructura, más los anticuerpos del hospedero específicamente unidos (que son difíciles de extraer y además relevantes al estudio). Como también se explicó, las CL se procesaron a suspensiones de fragmentos pequeños para facilitar la manipulación. Se enfrentaron estas suspensiones, control o tratadas para eliminar componentes específicos (como se describió en la sección 3.1.2), con suero humano (SH) como fuente de complemento, a 37°C durante distintos tiempos. Para analizar la contribución de componentes/vías específico(a)s se usaron SH comerciales carentes ("depletados") de C2, C1q, o factor B (CompTech, #A312, #A300 y

#A335, respectivamente), comparativamente a los mismos sueros reconstituidos con los componentes correspondientes (CompTech; C2 #A112, C1q #A099, y factor B #A135) en sus concentraciones fisiológicas promedio reportadas (20 µg/mL para C2, 80 µg/mL para C1q, y 210 µg/mL para factor B; [34]). Los SH comerciales fueron descongelados una vez, prontamente re-congelados por goteo sobre nitrógeno líquido y conservados a -80°C, descongelándose alícuotas de los mismos al momento de su utilización. Luego de la incubación de CL con suero, se analizaron parámetros de complemento tanto en los sobrenadantes como en la fase insoluble. Para lo segundo, se lavaron las suspensiones con alta fuerza iónica de forma de eliminar los componentes no fuertemente unidos y se extrajeron los componentes fuertemente unidos para su análisis. Asimismo se realizaron ensayos para analizar simplemente la unión a las partículas de CL de ciertos componentes no dependiente de la activación de la cascada (C1q y C4bp). En estos casos, luego de la incubación de CL con suero, se lavó con soluciones de fuerza iónica fisiológica para eliminar componentes no unidos, eluyéndose luego el componente de interés por incubación con alta fuerza iónica.

### **3.3.1 Ensayos de activación de complemento**

#### **3.3.1.1 Incubación de CL con SH**

Estos ensayos se realizaron a distintas diluciones de SH. Para las diluciones 1:4 y 1:10, las condiciones experimentales fueron las mismas, pero, los ensayos realizados con SH 1:60 se modificó la escala del experimento, por lo que estos ensayos se describen por separado.

Para los ensayos con SH diluido 1:4 y 1:10, se tomaron alícuotas de la suspensión preparada según se describió en las secciones 3.1.1 y 3.1.2 equivalentes a 0,3 mg de masa seca de CL. Finalizados los lavados con VBS<sup>++</sup>, se llevó a cada una de las muestras a un volumen final de 37,5 µl o 45 µl con la misma solución y se les agregó 12,5 µl o 5 µl de SH, para ensayos con SH diluido 1:4 y 1:10 respectivamente. El SH fue suero humano normal (SHN) obtenido en el Laboratorio (sección 3.1.2.3) o SH comercial “depletado” de factor B, C2 o C1q (sección 3.3). En suma, se trabajó con volúmenes de 50 µL y una concentración final de masa seca de CL de 6 mg/mL.

Para los ensayos con SH diluido 1:60, se trabajó con un ensayo escalado 3 veces con respecto a los ensayos antes descritos, para aumentar la sensibilidad, ya que cuánto más alta es la

dilución de SH, menor es la cantidad de productos de activación de complemento generados/depositados por unidad de masa de CL. En otras palabras, se trabajó con volúmenes de reacción de 150  $\mu\text{L}$  por tubo, conteniendo 0,9 mg de masa seca de CL, es decir manteniendo la concentración de CL de 6 mg/mL de masa seca antes mencionada. Se agitaron los tubos periódicamente durante la incubación a 37°C, de manera de evitar la decantación durante el ensayo.

Se dio inicio a las reacciones por pasaje del baño de hielo en el que se prepararon las mezclas a baño de agua a 37°C. El método empleado para la detención de las reacciones y continuación del ensayo varió en función del componente a ser analizado, como se explica en las siguientes secciones.

### **3.3.1.2 Determinación de parámetros de activación y control del complemento**

#### **3.3.1.2.1 Estudio del depósito covalente de C4 y C3**

Para los ensayos con SH diluido 1:4 y 1:10, se detuvieron las reacciones (sección 3.3.1) por agregado de 1450  $\mu\text{L}$  de solución fría de NaCl 2 M, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM y posterior pasaje a baño de hielo. Se realizaron tres lavados con la misma solución, con cociente de dilución 1:30 cada uno, y un lavado adicional con Tris/HCl 200 mM pH 8,8 conteniendo NaCl 135 mM y CaCl 0,5 mM (tampón de extracción), restituyéndose finalmente al volumen inicial de 50  $\mu\text{L}$ . Se agregó por tubo 50  $\mu\text{L}$  de solución de hidroxilamina 0,375 M en tampón de extracción y 25  $\mu\text{L}$  de solución de lisozima (Applichem, #A4972) en concentración 1 mg/mL (para que actúe como proteína portadora en la precipitación posterior), y se incubó a 37°C durante 45 minutos. Se agitó y centrifugó a 4°C durante 5 minutos. Se retiraron 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante y se pasaron a otro tubo. A los tubos, ahora conteniendo 25  $\mu\text{L}$  de la suspensión de CL, se les agregaron 100  $\mu\text{L}$  de agua desionizada ultra-pura (milli-Q) y 25  $\mu\text{L}$  de la solución de lisozima, se agitaron y se los volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Se retiraron 100  $\mu\text{L}$ , que se adicionaron a los 100  $\mu\text{L}$  anteriores, obteniéndose entonces 200  $\mu\text{L}$  de sobrenadante por tubo.

Para el caso de los ensayos con SH 1:60, luego de obtener las reacciones como se describió más arriba, se realizaron cinco lavados con la solución previa de NaCl 2 M y CaCl 0,5 mM, con cociente de dilución 1:15 cada uno, y un lavado adicional con tampón de extracción, restituyéndose finalmente al volumen inicial de 150  $\mu\text{L}$ . Se agregó por tubo 150  $\mu\text{L}$  de solución

de hidroxilamina 0,375 M en tampón de extracción y 50  $\mu$ L de la solución de lisozima, y se incubó a 37°C durante 45 minutos. Se agitó y centrifugó a 4°C durante 5 minutos. Se retiraron 250  $\mu$ L de sobrenadante y se pasaron a otro tubo. A los tubos conteniendo 100  $\mu$ L de la suspensión de CL se les agregó 200  $\mu$ L de agua desionizada ultra-pura y 50  $\mu$ L de la solución de lisozima, se agitaron y se los volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Se retiraron 250  $\mu$ L que se adicionaron a los 250  $\mu$ L anteriores, obteniéndose entonces 500  $\mu$ L de sobrenadante por tubo.

Se precipitaron con TCA (sección 3.2.1) las proteínas presentes en los sobrenadantes de las extracciones con hidroxilamina descritas en los párrafos anteriores, y se resuspendieron en 20  $\mu$ L por tubo de solución amortiguadora de muestra 2X de SDS-PAGE. La mitad (10  $\mu$ L) de cada muestra se sembró en un carril de SDS-PAGE. Así un carril corresponde a la cantidad de C4/C3 depositadas sobre 48  $\mu$ g de masa seca de CL en ensayos con SH diluido 1:4 o 1:10, o a 144  $\mu$ g de masa seca de CL en ensayos con SH diluido 1:60.

Se analizaron las muestras obtenidas por *western blot* utilizando anticuerpos contra C4 y C3 humanos. Para el análisis del depósito de C4 se utilizó un anticuerpo policlonal desarrollado en conejo contra C4, amablemente donado por el Dr. Robert Sim (Universidad de Oxford), que se observó que reconocía la principalmente la cadena  $\beta$  del C4, a una dilución de 1/100. En uno de los ensayos de depósito de C4 se analizó la inactivación de C4b a iC4b. En este ensayo se empleó en lugar del anticuerpo contra C4 recién mencionado, un anticuerpo policlonal desarrollado en conejo contra la región C4d de la cadena  $\alpha$  del C4 humano (ProteinTech, #22233-I-AP), a una dilución de 1/500. Ambos anticuerpos contra C4 se incubaron durante toda la noche a 4°C. Para el estudio del depósito de C3 se empleó un anticuerpo policlonal desarrollado en conejo contra la región C3d de la cadena  $\alpha$  de C3 (Dako, #A0063) a una dilución de 1/1500, con incubación durante 2 horas a temperatura ambiente.

#### **3.3.1.2.2 Estudio del depósito no covalente de C5**

Este estudio solo se realizó para ensayos en los que la CL se incubó con SH diluido 1:60. Para el análisis de C5 se utilizaron las muestras de CL remanentes luego del tratamiento con la solución de hidroxilamina detallado en la sección 3.3.1.2.1. Finalizada la extracción de C4/C3 se lavaron los remanentes de CL con 1 mL por tubo del tampón Tris/HCl 20 mM con  $\text{CaCl}_2$  0,5 mM pH 8. Se llevaron los remanentes de cada tubo a 500  $\mu$ L y se congelaron a -80°C. Estas

muestras se liofilizaron para concentrarlas de forma de poder sembrar la totalidad de la muestra en un carril único de SDS-PAGE. Luego de la liofilización, se resuspendieron en tampón de muestra de electroforesis 2X con 40 mM de DTT. Se analizaron las muestras por western blot utilizando un anticuerpo policlonal desarrollado en conejo contra la cadena  $\alpha$  de C5 humano (Thermo Pierce, #PA 5-22183), a una dilución de 1/100, con incubación durante toda la noche a 4°C con agitación.

#### **3.3.1.2.3 Medida de los productos de activación de los componentes C4, C2 y C3 en sobrenadantes**

Estas medidas fueron realizadas solamente para los ensayos con SH diluido 1:60. Luego del paso de la incubación con SH a 37°C se detuvo la reacción por pasaje de los tubos a baño de hielo, se recuperaron rápidamente los sobrenadantes de incubación, se les agregó un volumen igual de tampón de muestra de electroforesis con 40 mM de DTT y se los almacenó a -20°C. Estas muestras se analizaron por western blot, empleándose para el estudio de la activación de C4 y C3 los anticuerpos contra las regiones C4d y C3d, respectivamente, descritos en la sección 3.3.1.2.1. Para el estudio de la activación de C2 se utilizó un anticuerpo monoclonal desarrollado en ratón contra C2 humano que reconoce el fragmento C2b, es decir el de menor tamaño generado durante la activación (Santa Cruz Biotechnology, #sc-373809), a una dilución de 1/500, con incubación con agitación durante toda la noche a 4°C.

#### **3.3.1.2.4 Cuantificación de C5a en sobrenadantes**

Este estudio se aplicó a las reacciones con SH diluido 1:60 (sección 3.3.1.1). Luego del paso de la incubación con SH a 37°C, se detuvieron las reacciones por pasaje de los tubos a baño de hielo y agregado de 120  $\mu$ L por tubo de un tampón PBS conteniendo EDTA, de forma de llevar a una concentración final de EDTA en el tubo de 3,3 mM, y conteniendo cantidad suficiente de un "cocktail" de inhibidores de proteasas en concentración suficiente para alcanzar la concentración final recomendada por el proveedor (Santa Cruz Biotechnology, #sc-29130). Se mezclaron los tubos y se centrifugaron a 4°C, recuperándose 180  $\mu$ L de sobrenadante de cada tubo, que fueron congelados a -20°C hasta su análisis por ELISA para C5a. Los sobrenadantes se mantuvieron a -20°C hasta su análisis. Se cuantificó C5a utilizando el kit de ELISA (del inglés,



*enzyme-linked immunosorbent assay*) comercial de *R&D Systems* (DY 2037) y placas de 96 pocillos Nunc Maxisorp (Thermo, #442404). Brevemente, se incubó la placa con el anticuerpo de captura diluido 1/180 en PBS, durante toda la noche a 4°C. Luego, se bloqueó con una solución de PBS 2% m/v BSA durante al menos 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente, se incubó con la muestra o con una dilución seriada de estándar. Luego, se incubó con el anticuerpo de detección conjugado a biotina diluido 1/180 en PBS con 2% de BSA, y posteriormente con estreptavidina conjugada a la enzima peroxidasa. Finalmente, se reveló agregando 100  $\mu\text{L}$  de una solución de tetrametilbencidina (TMB, Applichem #A3840). El desarrollo de color se detuvo por agregado de 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M. Se midió absorbancia a 450 nm y se corrigió la misma por absorbancia a 560 nm.

### **3.3.2 Estudio de la unión de C1q y C4bp**

Se tomaron muestras de suspensión *stock* de CL equivalentes a 1,5 mg de masa seca y se las sometió a tratamiento con EDTA o no. Además se tomaron 0,5 mg de  $\text{InsP}_6$  cálcico purificado, obtenido de la CL según Casaravilla *et al.* 2006, esta cantidad corresponde a la masa aproximada de  $\text{InsP}_6$  cálcico que por estimaciones previas (Casaravilla 2016) está presente en 1,5 mg de CL. Finalizados los lavados con  $\text{VBS}^{++}$ , a cada una de las muestras se las llevó a un volumen de 245,8  $\mu\text{L}$  con el mismo tampón y se les agregaron 4,2  $\mu\text{L}$  de SHN, alcanzándose de esta manera concentraciones de 6 mg de masa seca de CL por mL y una dilución de SH 1:60. Se incubaron las muestras durante 30 minutos en baño de agua a 37°C con agitación. La reacción se detuvo por pasaje a hielo. Luego las muestras se lavaron cinco veces por decantación con  $\text{VBS}^{++}$  con un cociente de dilución 1/10 en cada paso de lavado. Acabados los lavados, se llevaron los tubos a un volumen de 150  $\mu\text{L}$ . Finalmente se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de solución de lisozima 1 mg/mL (para que actúe como portadora de la precipitación) junto con 600  $\mu\text{L}$  de una solución de NaCl 2M y  $\text{CaCl}_2$  0,5 mM. En otras palabras, se llevó a concentraciones finales de 1,5 M en NaCl para disociar los componentes adsorbidos fuertemente sobre la CL, y 0,4 mM de calcio para preservar los depósitos de  $\text{InsP}_6$  cálcico en aquellas muestras en las que estaban presentes. Se retiraron 650  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de cada muestra y se precipitaron con TCA las proteínas presentes (sección 3.2.1). Cada uno de los precipitados obtenidos se resuspendió en 40  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora de muestra 2X de SDS-PAGE. La mitad de cada muestra (20  $\mu\text{L}$ ) se sembró en un carril de SDS-PAGE y se analizó

por western blot para C1q y C4bp; así, un carril corresponde a lo adsorbido sobre 750 µg de masa seca de CL, o sobre 250 µg de InsP<sub>6</sub> cálcico. Para el estudio de C1q se utilizó un anticuerpo policlonal desarrollado en conejo contra la cadena A de C1q humano (Abcam, #ab155052), a una dilución de 1/500. Para el análisis de C4bp se empleó un anticuerpo policlonal de conejo contra la cadena α de C4bp humano, generosamente cedido por el Dr. Robert Sim (Universidad de Oxford), a una dilución de 1/100. Ambos anticuerpos fueron incubados durante toda la noche a 4°C con agitación.

### **3.4 Procesamiento de los datos obtenidos**

#### **3.4.1 Procesamiento de datos de densitometría de western blot para cantidad de productos de C4, C3 y C5 depositados**

Como en general fue necesario emplear más de un gel (de 15 carriles) para correr las muestras de un ensayo, lo cual acarrea diferencias en intensidad de señal entre membranas de PVDF (causadas por diferencias en la eficiencia de transferencia y/o grado de lavado entre las membranas), se incluyó en cada uno de los geles un carril con una dilución en común de SHN como patrón. Esto permitió normalizar aproximadamente la señal del componente de interés entre muestras corridas en los distintos geles.

Debido a que el C3 depositado se distribuye, en el análisis por western blot empleando anticuerpo contra la cadena α, en varias bandas (como se explica en detalla en la sección Resultados), para calcular el depósito total de C3 se usó la fórmula:

$$C3 \text{ total} = \text{multímeros de } C3 + C3b + iC3b$$

En el caso de C4, como se utilizó un anticuerpo que reconocía la cadena β, cuyo peso molecular no cambia durante la activación y posterior inactivación del componente, la intensidad de dicha banda se tomó como el depósito total de C4.

En algunos experimentos se transformaron los valores de las sumas de los productos de C4 y C3 depositados obtenidos por densitometría (inicialmente en unidades arbitrarias) para obtener estimados de valores absolutos. Para esto, en paralelo a las muestras, se corrieron diluciones seriadas de SHN como estándar aproximado de C4 o C3, estimando la

concentración del componente en la muestra de acuerdo a su concentración promedio conocida (según [34]). Con estas diluciones se construyeron rectas de calibración, que se usaron para estimar los valores por interpolación. Se expresaron los valores como cocientes entre los moles de productos de C4 o C3 depositados y la masa seca de CL.

### **3.4.2 Procesamiento de datos de densitometría de western blot para activación de C4, C2 y C3, e inactivación de C4.**

Para las medidas del grado de activación de C4, C2 y C3 medidos en sobrenadantes, así como para la medida de la inactivación del C4b depositado, no fue necesario realizar una normalización incluyendo en cada membrana estándar de los componentes a ser cuantificados (como se describió en la sección 3.4.1). Esto se debe a que como los cálculos para estos parámetros incluyen cocientes de valores internos a cada carril, existe en ellos una normalización implícita.

A continuación se detallan las formulas empleadas en los cálculos; los datos de las masas moleculares de las bandas mencionadas se detallan en la sección Resultados.

$$\textit{Activación de C4} = \frac{C4b + iC4b}{C4 + C4b + iC4b}$$

$$\textit{Activación de C2} = \frac{C2b}{C2 + C2b}$$

$$\textit{Activación de C3} = \frac{iC3b}{C3 + iC3b}$$

Conceptualmente la fórmula de activación de C3 debería ser igual a la de la activación de C4, sin embargo, como la inactivación de C3b en el sobrenadante parece ser mucho muy rápida que la de C4b, no se logra detectar dicha banda y solo se detecta la forma iC3b.

$$\text{Inactivación de C4} = \frac{iC4b}{iC4b + C4b}$$

En este punto es necesario aclarar que sobre la CL, el C3b depositado también sufre inactivación proteolítica a iC3b. La inactivación de C3b se calcula de la misma manera que para C4b. En esta Tesis no se muestran resultados de la inactivación de C3, porque los mismos no arrojaron datos relevantes para ser presentados.

### **3.4.3 Cuantificación en sobrenadantes del C5a producido.**

Como ya se explicó previamente, para esta cuantificación utilizó un kit comercial de ELISA, en el cual se realizaron diluciones seriadas de estándar de C5a en un rango de concentraciones de 3000 pg/mL hasta 62.5 pg/mL. Los puntos del estándar se sembraron por duplicado, obteniéndose una recta estándar con la cual, por interpolación de valores, se determinó la concentración de C5a presente en cada sobrenadante de reacción.

## **4. Resultados**

Esta sección está dividida en dos partes. En la primera se describirán los resultados obtenidos utilizando hidátides provenientes de infecciones experimentales intraperitoneales en ratón, mientras que en la segunda parte se detallan los resultados obtenidos con material hidático proveniente de infecciones naturales en humanos. Se realizaron la mayoría de los ensayos con hidátides provenientes de ratón por cuatro tipos de razones. La primera es que a pesar de que la infección en este mamífero no es natural, la misma tiene características muy similares a la de las infecciones en los hospederos naturales, como lo son la oveja o el ser humano, en los cuales la inflamación se resuelve [73]. La segunda es que la CL de la hidátide desarrollada en la cavidad peritoneal de ratón se puede separar limpiamente de la capa germinativa y de tejidos del hospedero, que están limitados a una delgada capa de colágeno. En cambio, usualmente las muestras obtenidas de infecciones en humanos suelen obtenerse muy contaminadas con el parénquima proveniente del órgano en donde se encuentran alojadas. La tercera es que la región Fc de los anticuerpos se encuentra altamente conservada en los mamíferos, de tal forma que los anticuerpos de ratón activan la VC del complemento humano [82], [83]. La cuarta es el acceso a las muestras: existía por colaboración con otros investigadores dentro de la Cátedra de Inmunología, la posibilidad de conseguir hidátides de ratón de buena calidad, mientras que suele ser difícil conseguir muestras de hidátides de infecciones en humanos de buena calidad. De hecho, solo se pudieron conseguir una vez avanzada la Tesis, las cuales se utilizaron para re-analizar los aspectos más relevantes analizados en el material de ratón.

### **4.1. Ensayos con material hidático de origen de ratón.**

#### **4.1.1 Estudio de la contribución de la VC a la activación del complemento sobre la CL.**

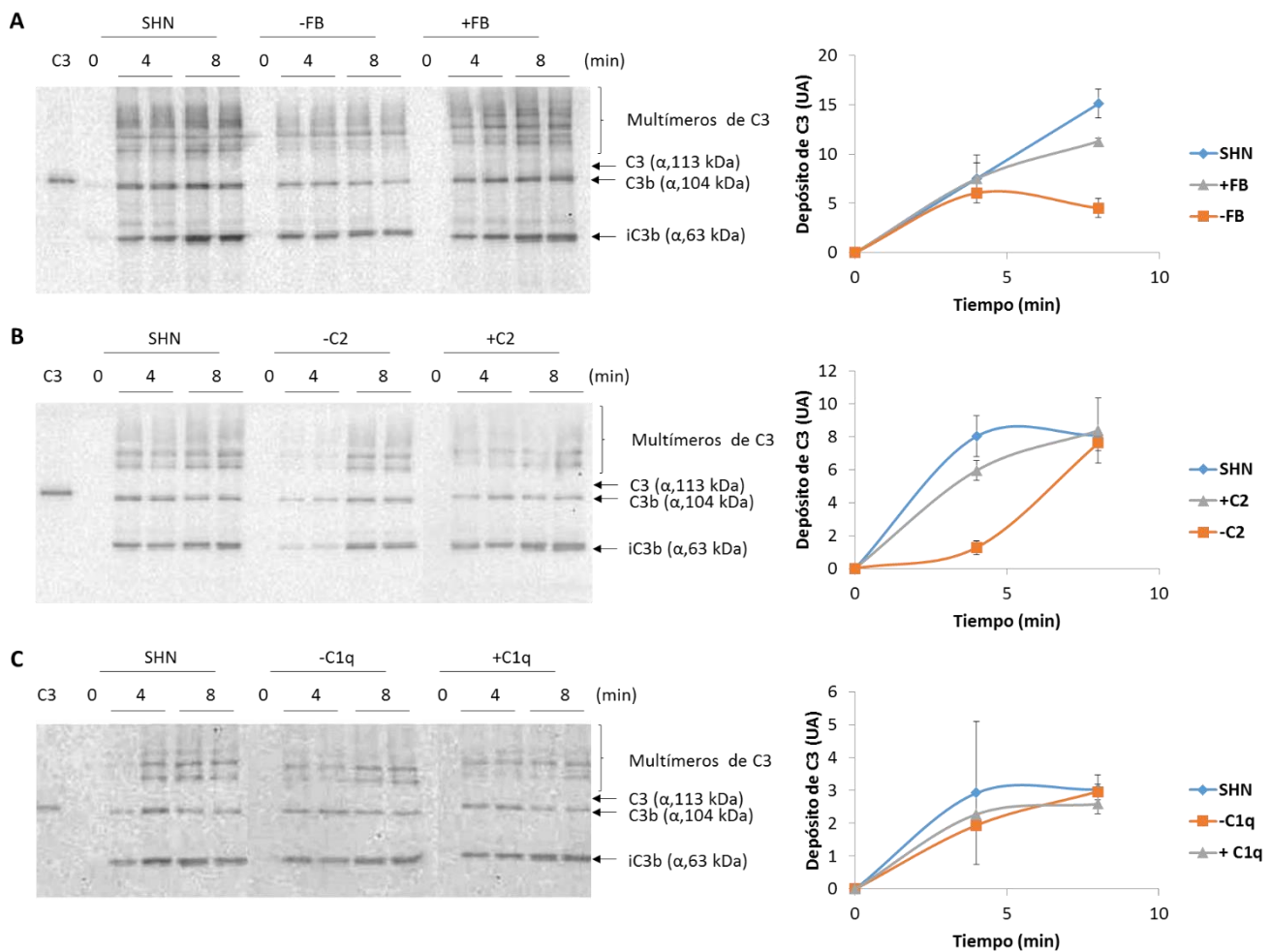
Como se detalla en la Introducción, las tres vías del complemento convergen en el depósito covalente de C3 sobre superficies. Como primera aproximación hacia el estudio de la funcionalidad de la VC sobre la CL, foco de esta Tesis, se estudió la contribución de esta vía al depósito de C3. Para ello se usaron sueros humanos carentes (“depletados”) de diferentes componentes que participan en cada una de las tres vías de activación del complemento.

Como se explica en Materiales y Métodos, se disponía de suero humano (SH) “depletado” de factor B (VA), C2 (VC y VL) y C1q (VC), y de los mismos componentes purificados, de manera de poder reconstituir los sueros con las concentraciones fisiológicas de dichos componentes. Como se describió en la Introducción, el C3b generado por la activación de C3 expone un enlace tioéster altamente reactivo que media la unión covalente a superficies que posean sitios aceptores, principalmente grupos hidroxilo. En este trabajo se extrajo el C3 depositado covalentemente por tratamiento de la CL con hidroxilamina, la cual mediante una reacción de transamidación libera los fragmentos de C3 unidos a través de enlace éster. La activación de C3 a C3b conlleva la disminución de la masa molecular de la cadena  $\alpha$  de 115 kDa a 104 kDa. El C3b depositado luego es procesado proteolíticamente, en presencia de factor H y factor I, a iC3b, (en el cual la cadena  $\alpha$  está dividida en un fragmento N-terminal de 63 kDa que contiene la región C3d y un fragmento C-terminal de 43 kDa). Como el iC3b queda asociado a la superficie, ya que contiene la región del enlace tioéster, luego de la extracción con hidroxilamina y western blot con un anticuerpo contra la región C3d de la cadena  $\alpha$ , se detectan bandas de 104 y 63 kDa, correspondientes a C3b e iC3b, respectivamente. Además se detectan bandas de alta masa molecular, que deben corresponder a especies de C3 unidas covalentemente entre sí por enlaces no sustituidos por el tratamiento con hidroxilamina (“multímeros de C3”).

A fin de evitar contaminación con C3 unido en forma no covalente (adsorbido sobre la CL), se optó por realizar un lavado con alta fuerza iónica previo a la incubación con hidroxilamina. Se debe enfatizar que este lavado implica que no se detecta el C3 que se pueda depositar covalentemente sobre proteínas no estructurales adsorbidas a la CL. Estas proteínas provienen solamente del propio suero usado como fuente de complemento: no hay en el ensayo proteínas adsorbidas a la CL *in vivo* porque también se realiza un lavado en alta fuerza iónica durante la preparación de la CL, como se explicó en la sección 3.1.1. Además se debe señalar que la hidroxilamina no libera posibles moléculas de C3 unidas sobre aceptores amino, que por lo tanto tampoco serán detectadas en nuestro sistema experimental. Por todo lo anterior, en lo que sigue emplearemos la expresión “depósito detectable de C3”.

En la Figura 4.1A se puede apreciar, para una dilución de suero 1:4, que la ausencia de factor B (fB) disminuye el depósito covalente de C3 detectable sobre la CL al tiempo más largo medido, pero no al más corto, lo cual concuerda con la hipótesis de que en estas condiciones habría iniciación por VC y/o VL, y amplificación posterior por la VA. En concordancia, se

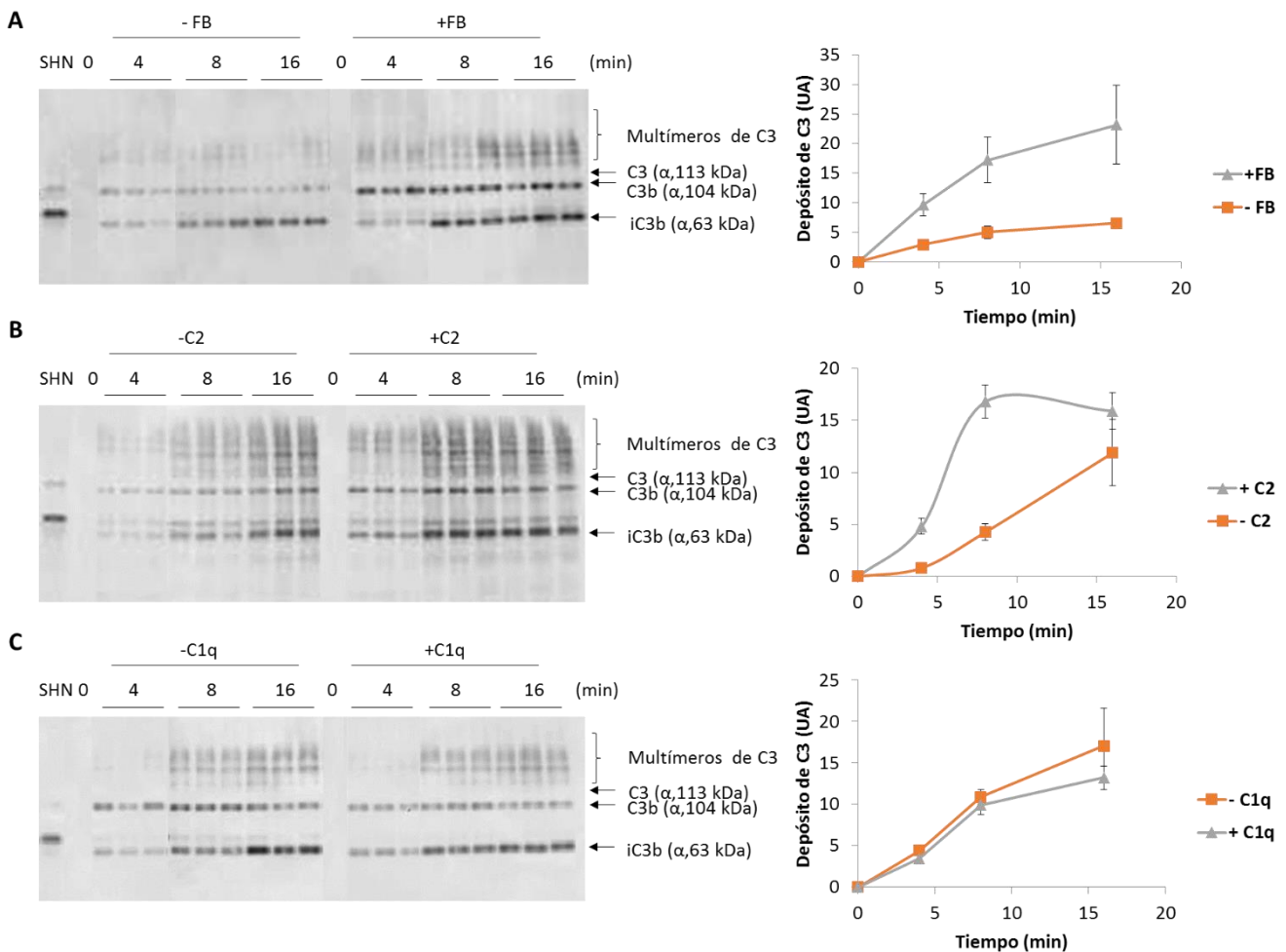
observó también que la ausencia de C2 enlentece significativamente el depósito detectable de C3 sobre la CL. Sin embargo, aún en ausencia de C2 existe depósito, assignable a la VA, y de hecho, al tiempo más largo ensayado, la falta de C2 deja de ser significativa (Figura 4.1B). Al analizar separadamente la VC de la VL (en base a la dependencia de C1q), sorprendentemente no se observó contribución de la primera al depósito detectable de C3. Esto sugirió que la diferencia observada entre los resultados en presencia y ausencia de C2 se debía a la activación de la VL (Figura 4.1C).



Ver leyenda de la Figura 4.1 en la siguiente página.

**Figura 4.1. Análisis de la contribución de las distintas vías de activación del complemento al depósito detectable de C3 sobre la CL, a la dilución de suero 1:4.** Se incubó CL con suero humano normal (SHN, suero sin alteraciones), suero humano (SH) “depletado” (suero comercial) en el componente de interés (“-FB”, “-C2”, “-C1q”) o el mismo suero “depletado” reconstituido con la concentración fisiológica de dicho componente (“+FB”, “+C2”, “+C1q”), durante los tiempos indicados. Se realizaron lavados con solución de NaCl 2M para remover las proteínas adsorbidas y a continuación se trató el remanente de CL con hidroxilamina 0,375 M para extraer las moléculas de C3 depositadas covalentemente. Se concentraron por precipitación las moléculas extraídas y se analizó por western blot utilizando un anticuerpo contra la región C3d de la cadena  $\alpha$  de C3. Se cuantificó mediante densitometría, sumándose las bandas correspondientes a C3b, iC3b y multímeros covalentes de C3. Se muestran en (A) la contribución de la VA (presencia *versus* ausencia de FB), en (B) la contribución de las vías dependientes de C2, es decir VC y VL y en (C) la contribución de la VC (presencia *versus* ausencia de C1q). En cada ensayo, excepto para los tiempos cero, se realizaron y analizaron dos reacciones independientes. En las gráficas a la derecha se representan promedio y desviación estándar de estos duplicados. Las unidades arbitrarias (UA) en que se expresan los datos de las partes (A), (B) y (C) no son las mismas. El primer carril en cada figura corresponde a 15 ng de C3 purificado.

Se realizó un ensayo similar al anterior, pero trabajando con una dilución de SH más alta, 1:10, y se obtuvieron resultados similares a los anteriores (Figura 4.2).

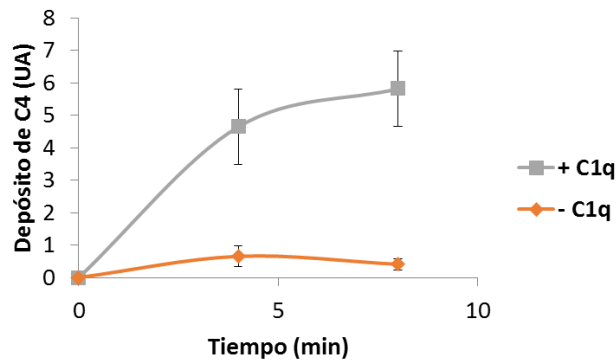
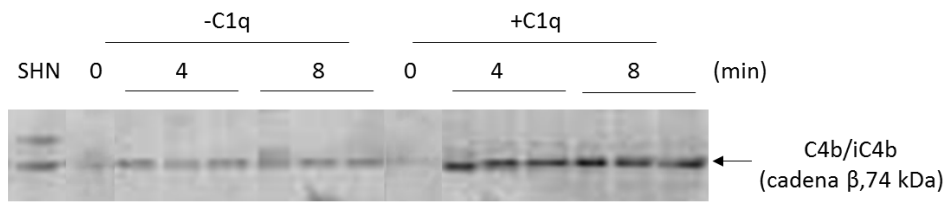


Ver leyenda de la Figura 4.2 en la siguiente página.



**Figura 4.2. Análisis de la contribución de las distintas vías de activación del complemento al depósito detectable de C3 sobre la CL, a la dilución de suero 1:10.** Se repitieron los experimentos mencionados en la Figura 1 pero utilizando SH diluido 1:10. Se muestra en (A) la contribución de la VA (presencia *versus* ausencia de FB), en (B) la contribución de las vías dependientes de C2, es decir VC y VL, y en (C) la contribución de la VC (presencia *versus* ausencia de C1q). En cada ensayo, excepto para los tiempos cero, se realizaron y analizaron dos reacciones independientes. El primer carril en cada figura corresponde a una dilución de SHN, como estándar conteniendo una cantidad aproximada de 26 ng de C3, el C3 presente en esta muestra se había hidrolizado e inactivado en su mayoría, por lo que la banda principal observada corresponde a la cadena  $\alpha$  en iC3 (H<sub>2</sub>O) (74 kDa). Las unidades arbitrarias (UA) en que se expresan los datos de las partes (A), (B) y (C) no son las mismas. Los experimentos mostrados son representativos de dos experimentos independientes.

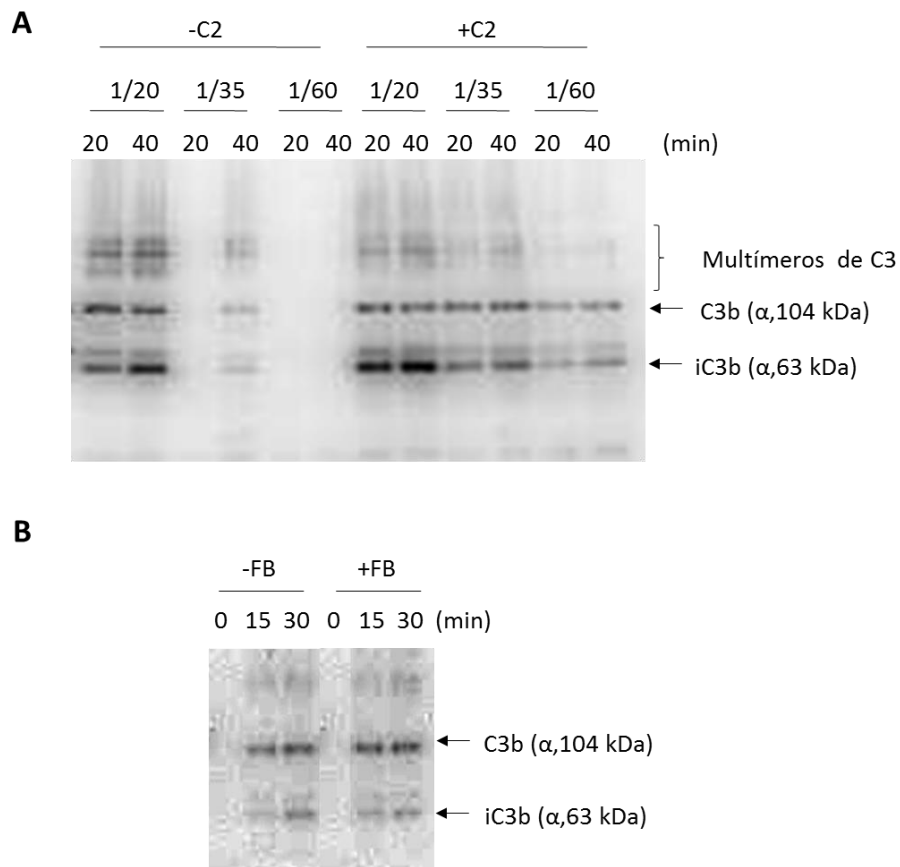
En esta última condición también se estudió el depósito de C4 (Figura 4.3), empleando extracción con hidroxilamina, en forma similar a lo realizado para C3. A la hora de interpretar este tipo de resultados para C4 hay que tener en cuenta que en el ser humano existen dos isoformas de este componente, C4A y C4B, las cuales difieren en el aceptor covalente al que se unen preferentemente. C4A se deposita preferentemente sobre grupos amino (a través de enlace amida), mientras que C4B, cuyas características de unión son más parecidas a las de C3, se une preferentemente a grupos hidroxilo (a través de enlace éster) [42]. Es por este motivo que se debe considerar que la extracción con hidroxilamina no extrae la totalidad del C4 depositado, siendo este problema probablemente más significativo que para el caso de C3. Por lo tanto también hablaremos de “depósito detectable” de C4. Para el estudio del depósito detectable de C4 se empleó en estos estudios iniciales un anticuerpo que reconoce la cadena  $\beta$  de C4, la cual no sufre procesamiento proteolítico durante la activación ni inactivación, por lo que en los *western blots* solo se observa una banda de relevancia por carril. Contrariamente al resultado obtenido para C3, el depósito de C4 detectable resultó depender casi completamente de C1q, es decir de la VC.



**Figura 4.3. Análisis de la contribución de la VC al depósito detectable de C4 sobre la CL, a la dilución de suero 1:10.** Se incubó CL con SH “depletado” de C1q (“-C1q”) o reconstituido con C1q a la concentración fisiológica (“+C1q”). Se procedió con el ensayo de la forma descrita en las Figuras 1 y 2, pero se realizó el análisis por western blot utilizando un anticuerpo contra la cadena  $\beta$  del C4. En cada ensayo, excepto para los tiempos cero, se realizaron y analizaron tres reacciones independientes. En la gráfica inferior se representan promedio y desviación estándar de estos triplicados. El primer carril corresponde a una dilución de suero humano normal (SHN), como estándar conteniendo un estimado de 24 ng de C4. El experimento mostrado es representativo de dos experimentos independientes.

Vistos estos resultados paradójicos, en los cuales el análisis del depósito detectable de C3 sugiere (además de contribución de la VA) contribución de la VL y no de VC, mientras que el análisis del depósito detectable de C4 sugiere lo opuesto, se propuso profundizar en el estudio de estas dos vías. Para esto se buscó una condición de trabajo que permitiera estudiar las contribuciones de la VC y la VL en ausencia de la contribución de la VA, que al actuar como un asa de amplificación del depósito de C3, hace difícil dicho análisis. Ya que la VA depende de la concentración de sus componentes más fuertemente que la VC y VL, se ensayaron diferentes concentraciones de suero carente de C2 y reconstituido con la concentración fisiológica de este componente, en busca de una dilución a la cual el depósito de C3 dependiera completamente de C2. Se encontró que trabajando con SH diluido 1:60, para ensayos de hasta 40 minutos, la VA dejaba de contribuir (Figura 4.4A). Se corroboró la ausencia de contribución

de VA en esta condición, trabajando con SH carente de FB y reconstituido con la concentración fisiológica del componente (Figura 4.4B).



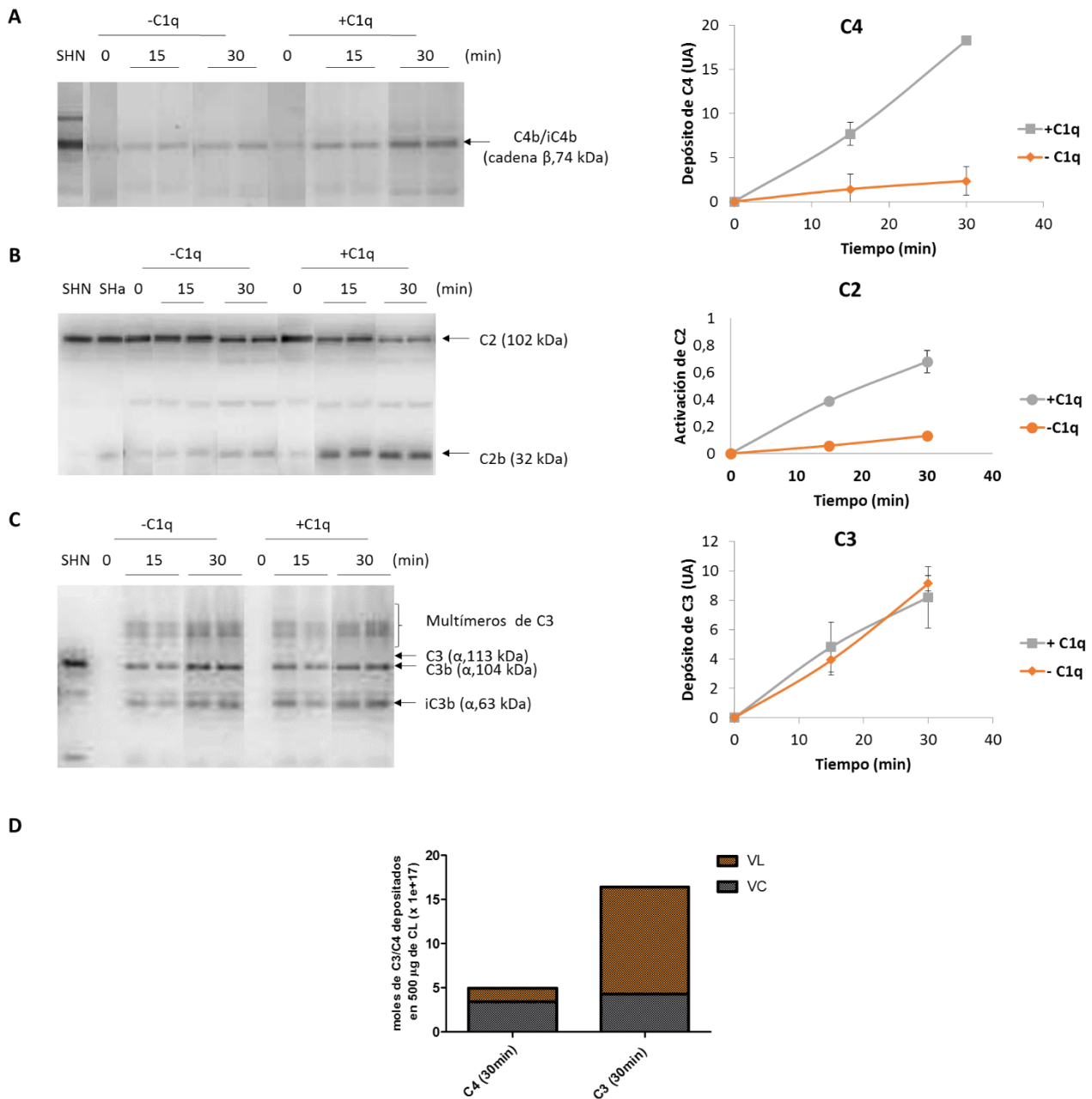
**Figura 4.4 Búsqueda de una condición experimental a la cual la VA no contribuya al depósito detectable de C3 sobre la CL.** (A) Se incubó CL con concentraciones decrecientes (1:20, 1:35 y 1:60) de SH “depletado” en el componente C2 (“-C2”) o el mismo suero reconstituido con la concentración fisiológica del mismo componente (“+C2”). Se realizó el ensayo de la manera descrita en las figuras anteriores. Se observa que para la dilución 1:60 y 40 minutos de reacción no se detecta depósito de C3 independiente de C2. (B) Para la dilución 1:60, se verificó la ausencia de contribución de VA incubando CL con SH “depletado” de FB (“-FB”) o el mismo suero reconstituido con la concentración fisiológica de este componente (“+FB”). Se observa que la presencia de FB no tiene efecto detectable sobre el depósito de C3 en estas condiciones.

A continuación se estudió en estas condiciones primeramente el depósito detectable de C4, realizando ensayos en ausencia y presencia de C1q (Figura 4.5A). Se obtuvieron resultados similares a los obtenidos previamente, es decir que la VC contribuye a casi la totalidad del C4 depositado detectable.

El siguiente paso de la VC corresponde a la activación del componente C2. Como se explicó en la Introducción, el C4b depositado puede unir C2 (102 kDa), permitiendo que este sea activado por acción del complejo C1 a C2a (70 kDa) y C2b (32 kDa), quedando el primero formando parte (transitoriamente) de la convertasa de C3 de la VC y el segundo en fase fluida. En la Figura 5B se muestra una cinética de activación de C2 sobre CL en ausencia y presencia de C1q. Se observa que la activación de C2 siguió un comportamiento similar al del depósito detectable de C4, es decir que también depende casi completamente de la VC.

En contraste con lo observado para C4 y C2, se observó que el depósito detectable de C3, en estas condiciones de ausencia de contribución de VA, no depende de la VC (Figura 4.5C): esto imita los resultados obtenidos con las diluciones más bajas de suero. Se resume la paradoja observada para el depósito detectable de C4 y C3 en la gráfica de la Figura 4.5D.

**Figura 4.5. Estudio de la contribución de la VC al depósito detectable de C4 y C3 sobre la CL, en condiciones de no contribución de la VA.** Se incubó CL con suero humano “depletado” de C1q (“-C1q”) diluido 1:60 o el mismo suero reconstituido con C1q a la concentración fisiológica (“+C1q”). En (A) se muestra el depósito covalente de C4. En (B) se analizaron los sobrenadantes de incubación por western blot utilizando un anticuerpo contra C2a seguido de densitometría. Se grafica el grado de activación de C2 expresado como el cociente entre la banda de C2b (32 kDa) y la suma entre esta banda y la de C2 sin activar (102 kDa). “SHNa” hace referencia a suero humano activado con zymosán (paredes de levaduras) para activar C2. En (C) se muestra el depósito covalente de C3. En (D) se muestra un resumen de la contribución de la VC al depósito de C4 y C3 (extraíbles por hidroxilamina) sobre la CL, a la dilución de suero 1:60. Para obtener estos datos se realizó un experimento como el mostrado en esta Figura, pero incluyendo en los western blot diluciones seriadas de SH para poder cuantificar las cantidades de C4 y C3 presentes en las muestras, como se explica en Materiales y Métodos. Se transformaron los datos para expresarlos en términos de número estimado de moléculas depositadas por residuo glucídico de la CL, como también se explica en Materiales y Métodos. Finalmente, se calcularon las cantidades de C4 y C3 provenientes de la VC (como la diferencia entre el depósito en presencia de C1q menos el depósito en ausencia de C1q) y de la VL (como el depósito en ausencia de C1q). Los valores graficados provienen de un experimento diferente al mostrado en esta Figura. En (A), (B) y (C) se representan promedios y desviaciones estándar de tubos duplicados. Para (A) y (C) los carriles de SHN contienen aproximadamente 26 ng y 21 ng de C4 y C3, respectivamente.



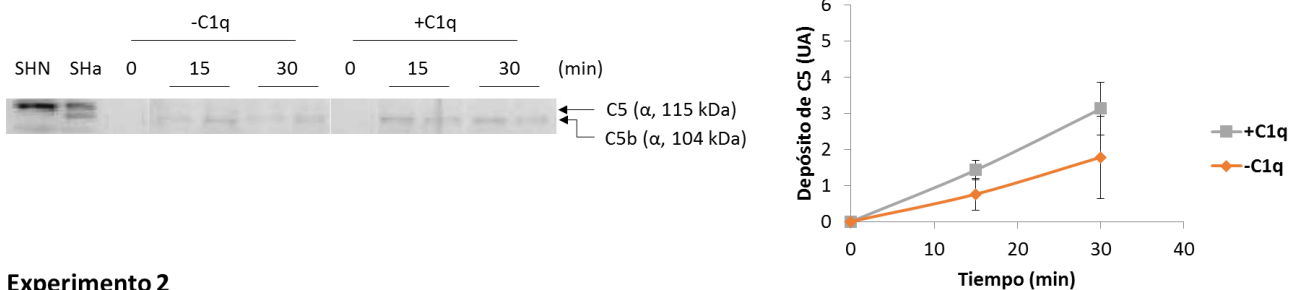
La leyenda de la Figura 4.5 se muestra en la página anterior.

En esta condición también se estudió el depósito, no covalente, de C5 sobre la CL. C5 tiene una estructura similar a la de C3 y C4, pero carece de un enlace tioéster interno, por lo que no puede asociarse covalentemente sobre superficies; sin embargo, al asociarse con otros componentes de la vía terminal puede incluirse en las membranas plasmáticas formando el MAC. En el contexto de la CL, que carece de membranas, C5b no podría formar el MAC, pero presumiblemente, debido a que se asocia con otros componentes (C6, C7, C8 y alguna molécula de C9) formando complejos de alto peso molecular, queda atrapado en la malla de

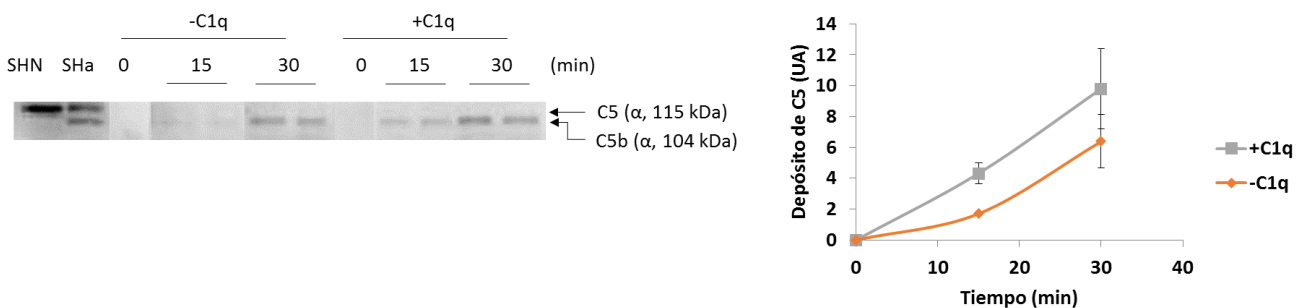
mucinas. Como se detalla en la Introducción, la activación de C5 conlleva el corte de la cadena  $\alpha$  (115 kDa) para generar C5a (11 kDa) y el fragmento mayor de 104 kDa presente en C5b. En nuestro ensayo fue posible discriminar la cadena  $\alpha$  presente en C5 de la  $\alpha'$  presente en C5b, lo que asegura que las moléculas reactivas con el anticuerpo contra C5 asociadas a la CL provienen realmente de la activación (Figura 4.6).

Interesantemente, para C5, contrariamente a lo observado para C3, se observó que la presencia de C1q contribuye en forma reproducible, si bien modesta, al depósito (Figura 4.6).

### Experimento 1



### Experimento 2



**Figura 4.6. Estudio de la contribución de la VC al depósito no covalente de C5 sobre la CL, en condiciones de no contribución de la VA.** Se incubó CL con suero humano “depletado” de C1q (“-C1q”) diluido 1:60 o el mismo suero reconstituido con C1q a la concentración fisiológica (“+C1q”) y se analizó el depósito de C5. El C5b depositado se analizó en la CL total, solubilizada en tampón muestra de electroforesis, empleando un anticuerpo contra la cadena  $\alpha$  del C5. Se muestran los resultados de dos experimentos independientes. Para cada experimento, se representan promedio y desviación estándar de tubos duplicados. “SHNa” hace referencia a suero humano activado con zymosán (paredes de levaduras) para generar C5b. Los carriles de correspondientes a SHNa y SHN contienen aproximadamente 21 ng de C5 cada uno.

En suma, los resultados presentados hasta el momento muestran que en presencia de VA, la contribución de las vías dependientes de C2 (VL y/o VC) es poco significativa, pero se vuelve, como es esperable, dominante a concentraciones bajas de complemento, a las cuales la VA pierde peso. Los resultados muestran también, en lo que hace a la VC y VL, una paradoja en la que tanto el depósito detectable de C4 como la activación de C2 dependen mayoritariamente de la VC, mientras que el depósito detectable de C3 depende casi completamente de la VL. Finalmente, y siempre restringiéndonos a VC y VL, el depósito de C5 parece depender de ambas vías, con mayor contribución de la VL.

A fin de facilitar la comprensión, es conveniente aclarar en este punto que la activación de la VL sobre la que se obtuvo evidencia resultó ser como lo muestran resultados que se describen más adelante (sección 4.1.2), un artefacto del sistema experimental con material de origen de ratón. Esto determinó que la presente Tesis se enfocara sobre la VC, como se refleja en su título.

#### **4.1.2 Estudio de la capacidad de los anticuerpos unidos específicamente a la CL de iniciar a la VC, en ausencia de contribución de la VA.**

Como ya se explicó en la Introducción, la CL contiene anticuerpos unidos *in vivo* que por la clase/subclase a la que pertenecen son en principio blanco de unión para C1q, y por lo tanto podrían dar inicio a la activación de la VC. Teniendo esto en cuenta, se procedió a la eliminación de los mismos previo a la incubación con SH y se estudió nuevamente el depósito de C3 (en ausencia o presencia de C1q). Para eliminar los anticuerpos, se trató la CL con la preparación proteolítica pronasa, que tiene poco efecto sobre las mucinas altamente glicosiladas [10], [28], y que efectivamente eliminó los anticuerpos presentes (Figura 4.7A). Además, previo al tratamiento con pronasa o con el tampón correspondiente como tratamiento control, se eliminaron los gránulos de  $InsP_6$  cálcico por tratamiento con EDTA. Se hizo este tratamiento porque, como se detalla en la siguiente sección, la eliminación de dichos gránulos permite detectar claramente la contribución de la VC al depósito de C3, que como se mencionó anteriormente, era difícil de detectar en la CL nativa (Figuras 4.1, 4.2 y 4.5). En estas condiciones, y siempre en la dilución de SH en la que no contribuye la VA, la eliminación de los anticuerpos dio lugar a una disminución en el depósito detectable de C3 en presencia de C1q (Figura 4.7B). Sin embargo, aún luego de la eliminación completa de los anticuerpos,

existió contribución de la VC al depósito detectable de C3, que se adjudicó tentativamente a la posible presencia en el suero empleado de anticuerpos naturales contra carbohidratos de las mucinas de la CL.

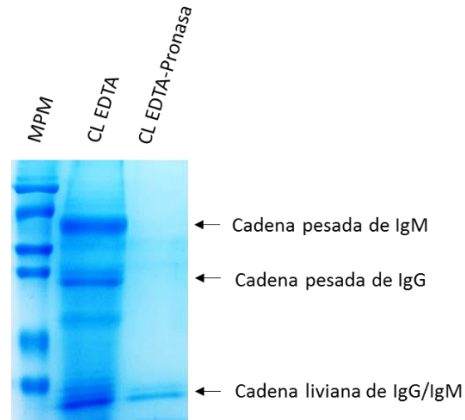
Además, se observó para nuestra sorpresa, que cuando se eliminaban los anticuerpos, la fracción del depósito de C3 que se adjudicó como dependiente de la VL (depósito de C3 en ausencia de C1q) desaparecía. Este resultado llevó a la idea que la activación de la VL que se estaba detectando podría ser un artefacto del sistema experimental (heterólogo), causado por el reconocimiento por lectinas presentes en el SH de motivos glucídicos presentes en los anticuerpos de ratón. Existen antecedentes de la activación de la VL por glicanos inusuales presentes en anticuerpos [83]. Más adelante se obtuvo evidencia adicional a favor de esta hipótesis (ver sección 4.2.1), ya que al trabajar con CL de origen humano e incubarla con SH (sistema homólogo), no se observó contribución de VL al depósito de C3.

Se empleó el agente caotrópico NaSCN como método alternativo de extracción de anticuerpos, obteniéndose resultados similares a los obtenidos empleando pronasa (datos no mostrados).

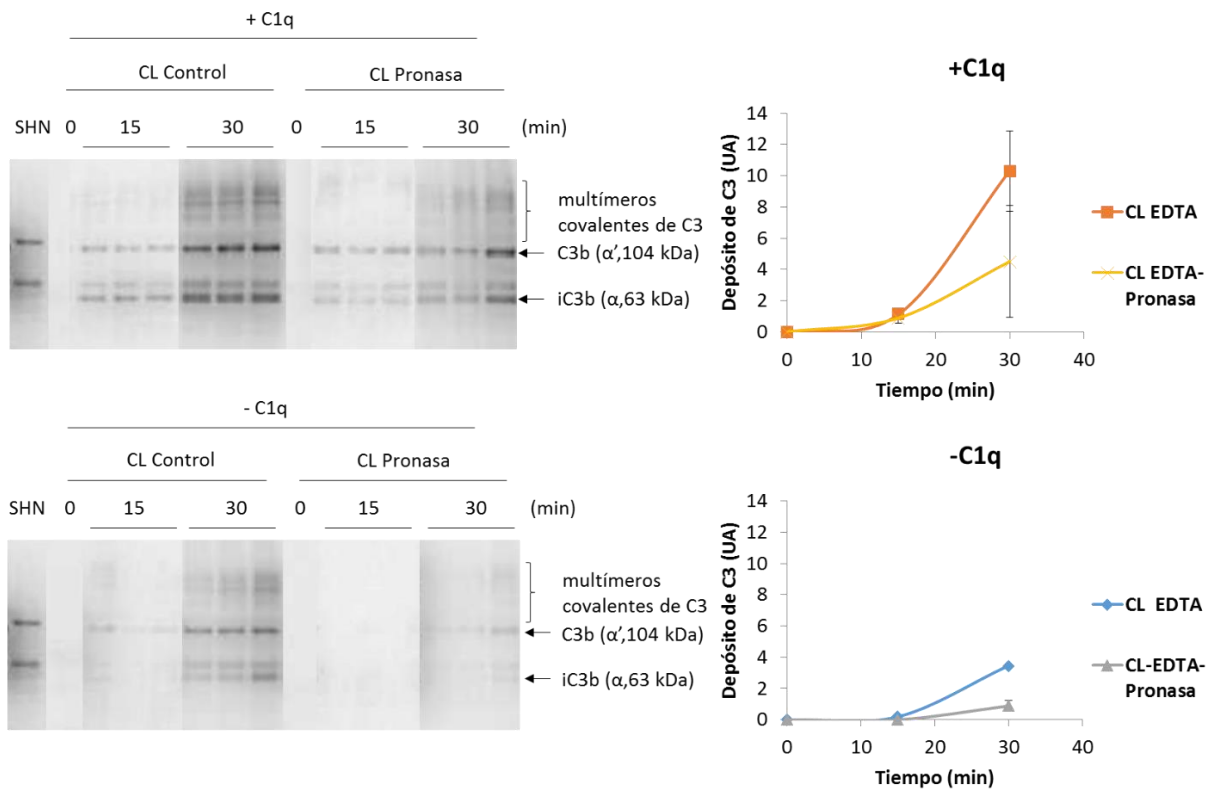
**Figura 4.7. Efecto de la eliminación de los anticuerpos unidos *in vivo* a la CL sobre el depósito de C3 por VC y VL.** (A) SDS-PAGE al 10% p/v de acrilamida en condiciones reductoras de materiales de CL. Se muestra de izquierda a derecha: marcador de peso molecular (MPM), 0,6 mg de masa seca de CL sometida a tratamiento control (CL EDTA) y 0,6 mg de masa seca de CL sometida a tratamiento con la preparación proteolítica pronasa (CL EDTA-Pronasa). (B) Se incubó CL sometida a tratamiento control o CL tratada con la preparación proteolítica pronasa (para eliminar los anticuerpos), ambas previamente tratadas con EDTA para eliminar los depósitos de  $\text{InsP}_6$  cálcico, con SH diluido 1:60, con y sin C1q. Se grafica el depósito de C3 dependiente de VC+VL (“+C1q”) y el depósito dependiente de VL solamente (“-C1q”). El procesamiento de las muestras y expresión de resultados es como en las Figuras 1 a 5. Se grafican promedios y desviaciones estándar de tubos duplicados triplicados. El experimento es representativo de dos experimentos independientes. Los carriles de SHN contienen aproximadamente 26 ng de C3.



**A**



**B**

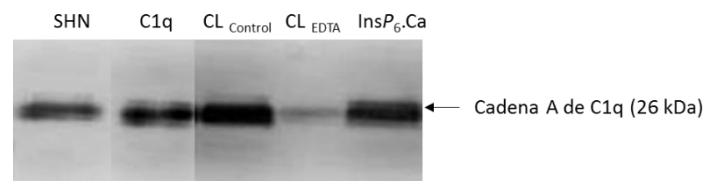


La leyenda de la Figura 4.7 se muestra en la página anterior.

#### 4.1.3 Efecto de los gránulos de $InsP_6$ cálcico sobre la activación de la VC, en ausencia de contribución de la VA.

Teniendo en cuenta el antecedente de que el  $InsP_6$  cálcico purificado retiene selectivamente C1q de SH [76], se propuso evaluar los posibles efectos de esta interacción sobre la VC. Para ello fue necesario generar un material de CL carente de gránulos de  $InsP_6$  cálcico, lo que se hizo por tratamiento con EDTA, como se explicó en las secciones Introducción y Materiales y Métodos.

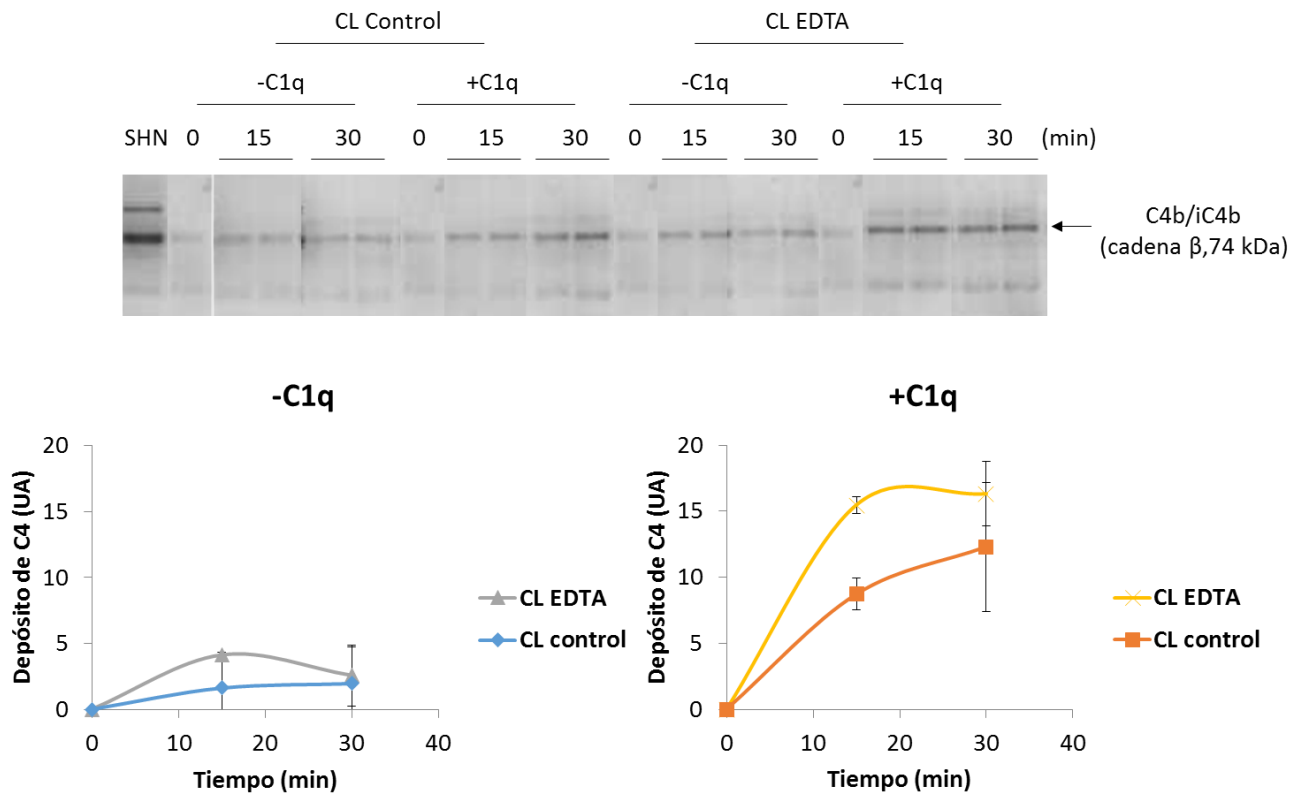
En primer lugar, se verificó que la CL une C1q a partir de SH, y que esta unión es mucho más débil cuando previamente se eliminaron los gránulos de  $\text{InsP}_6$  cálcico (Figura 4.8). Esto implica que los gránulos son los que median la mayoría de la unión de C1q sobre la CL. De todos modos, también se observó que hay un remanente de unión de C1q sobre la CL pre-tratada con EDTA, el cual probablemente se pueda asignar a la interacción con los anticuerpos.



**Figura 4.8. Unión de C1q a la CL.** Se incubó CL control, CL pre-tratada con EDTA para eliminar el  $\text{InsP}_6$  cálcico, o  $\text{InsP}_6$  cálcico purificado, con SHN. Se realizaron varios lavados en tampón veronal salino, para eliminar proteínas no unidas, y se eluyeron las proteínas unidas por incubación con una solución de NaCl 2M. Se concentraron las proteínas eluidas por precipitación con TCA y se analizó por western blot con un anticuerpo contra la cadena A de C1q humano. En los carriles se muestran de izquierda a derecha: dilución de SHN, C1q humano purificado (24 ng), elución de CL control, elución CL pre-tratada con EDTA y elución de  $\text{InsP}_6$  cálcico purificado. El experimento es representativo de cuatro experimentos independientes.

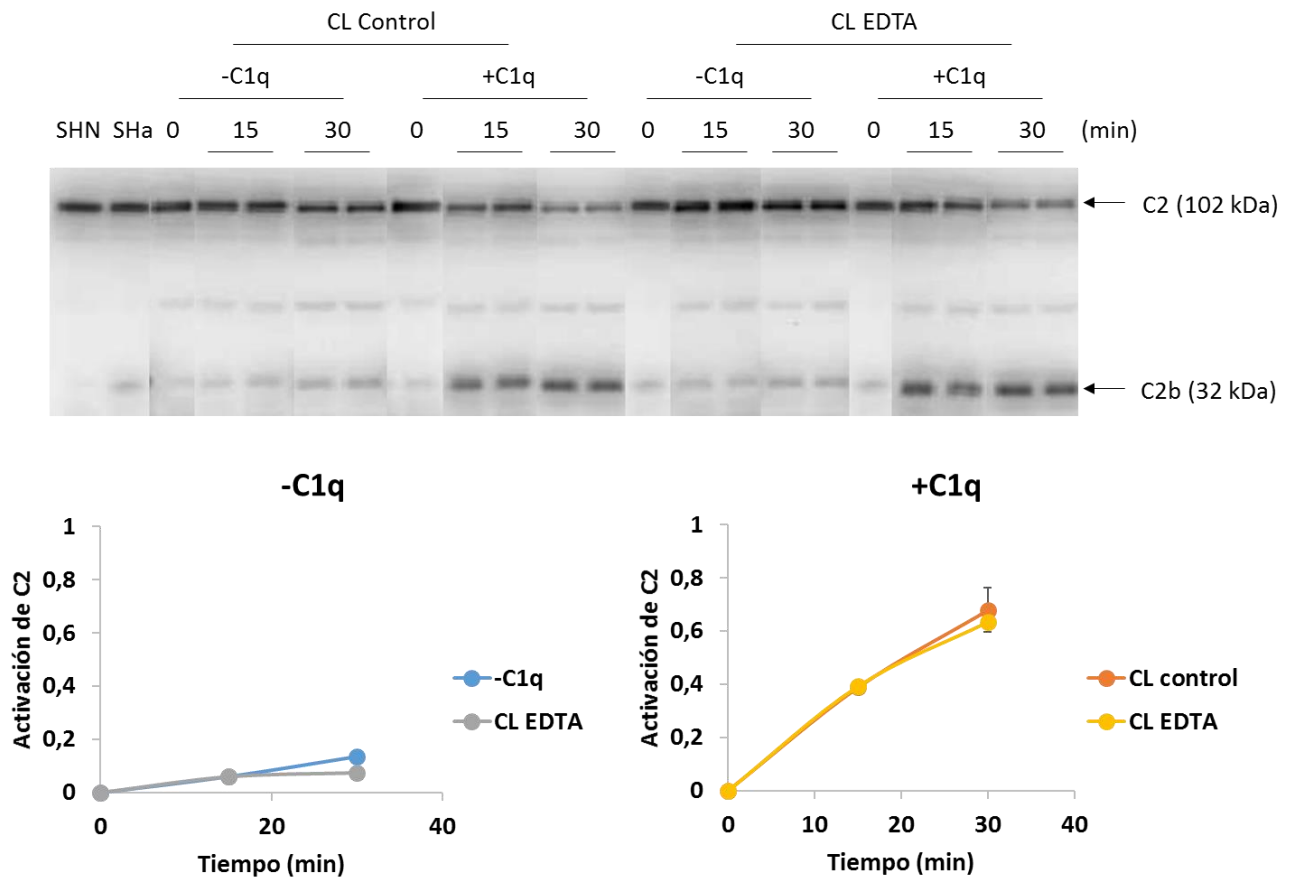
A continuación se evaluó qué es lo que ocurre en términos de activación de la VC, y del complemento en general, sobre CL pre-tratada con EDTA en comparación con material sometido a tratamiento control, trabajando con SH diluido 1:60 “depletado” y reconstituido con C1q a la concentración fisiológica de este componente.

En primer lugar se estudió el depósito covalente detectable de C4. Como se mencionó previamente, en la CL control el depósito de C4 resultó depender mayoritariamente de la VC. La remoción de los gránulos, si bien con variaciones entre repeticiones de los ensayos, tendió a aumentar levemente el depósito de C4 dependiente de VC, sin modificar el depósito proveniente de la VL (es decir, generado en ausencia de C1q) (Figura 4.9).



**Figura 4.9. Influencia de los gránulos de  $InsP_6$  cálcico sobre el depósito detectable de C4 sobre la CL.** Se incubó CL sometida a tratamiento control o CL pre-tratada con EDTA con SH diluido 1:60, en ausencia y presencia de C1q. Se grafica el depósito de C4 dependiente de VL solamente ("-C1q") y dependiente de VL más VC (" +C1q"). El procesamiento de las muestras y expresión de resultados es como para las Figuras 1 a 5. El experimento es representativo de dos experimentos independientes. El carril correspondiente a SHN contiene aproximadamente 36 ng de C4

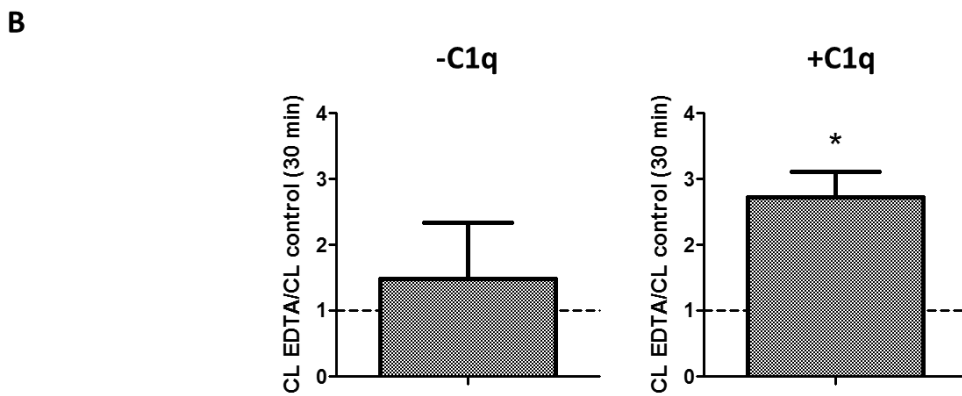
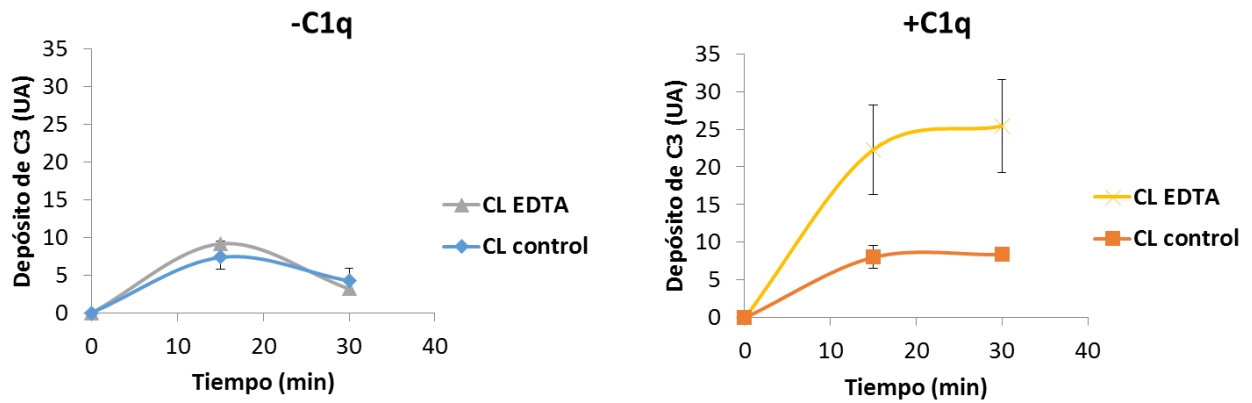
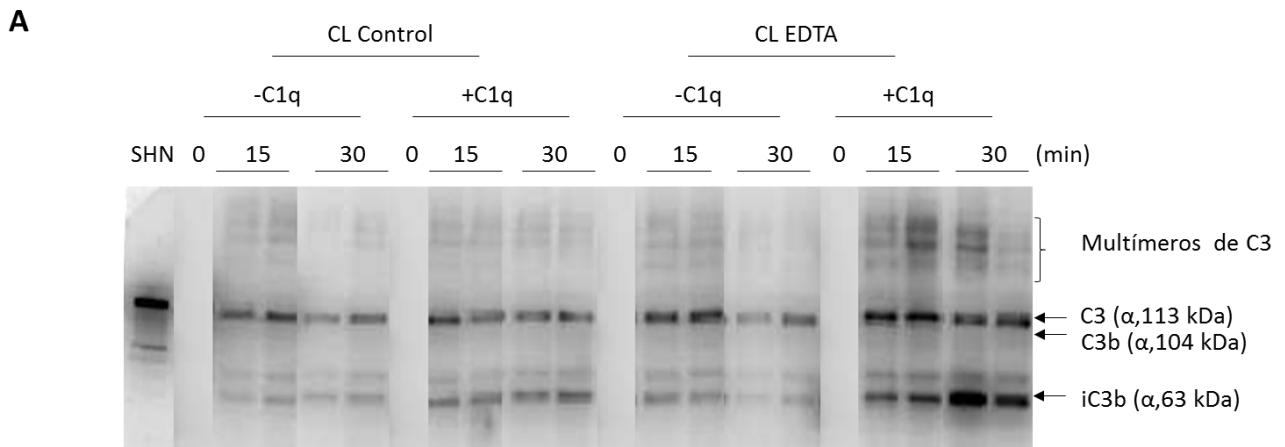
En cuanto a C2, la ausencia de los gránulos no modificó el grado de activación de este componente a los tiempos ensayados, dependiente de VC ni de VL (Figura 4.10).



**Figura 4.10. Influencia de los gránulos de  $InsP_6$  cálcico sobre la activación de C2 sobre la CL.** Se incubó CL sometida a tratamiento control o CL pre-tratada con EDTA (para remover los gránulos de  $InsP_6$  cálcico) con SH diluido 1:60, en ausencia y presencia de C1q. Se analizaron los sobrenadantes de incubación por western blot utilizando un anticuerpo contra C2b seguido de densitometría. Se grafica el grado de activación de C2 expresado como el cociente entre la banda de C2b (32 kDa) y la suma entre esta banda y la de C2 sin activar (102 kDa), en ausencia de C1q y en presencia de C1q, en la misma escala. En cada ensayo, excepto para los tiempos cero, se realizaron y analizaron dos reacciones independientes. Se grafican promedio y desviación estándar de estos tubos duplicados. El experimento mostrado es representativo de tres experimentos independientes. “SHNa” hace referencia a suero humano activado con zymosán (paredes de levaduras) para activar C2.

Con respecto al depósito detectable de C3 (Figura 4.11), se observó que a diferencia de lo que ocurría sobre la CL control, en la CL de la que se había eliminado el  $InsP_6$  cálcico existía una diferencia significativa entre las reacciones en presencia y en ausencia de C1q. En otras palabras, la remoción del  $InsP_6$  cálcico reveló una contribución de la VC al depósito covalente de C3 que estaba oculta en el material de CL control. En forma similar a lo ocurrido para C4, la eliminación de los gránulos no afectó el depósito detectable de C3 proveniente de la VL. En la Figura 4.11B se muestra una cuantificación de la influencia de los gránulos de  $InsP_6$  cálcico

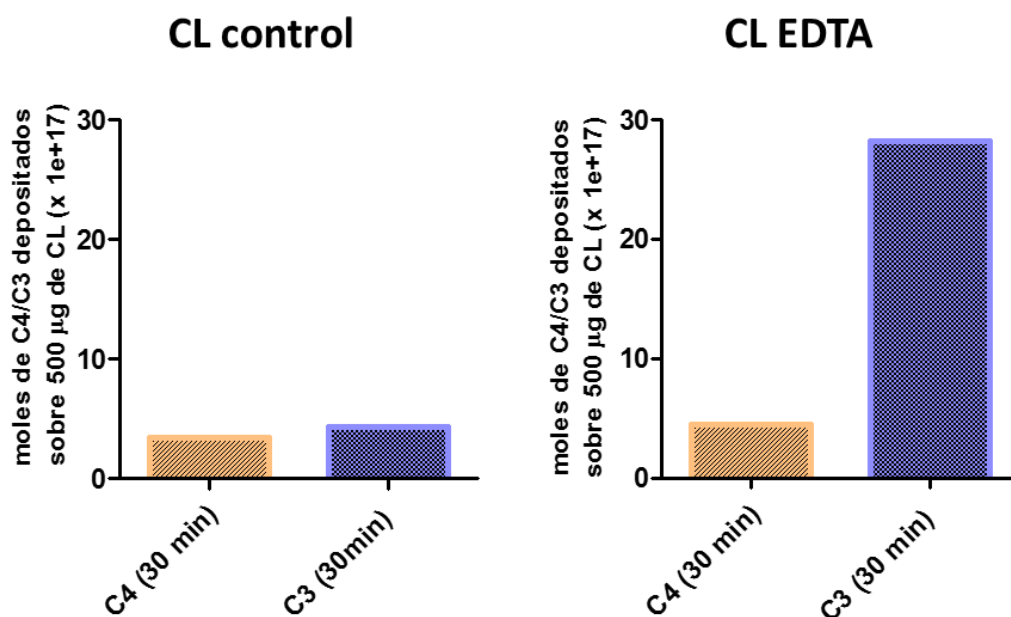
sobre el depósito detectable de C3, observándose claramente el aumento del depósito dependiente de VC una vez que los gránulos son eliminados de la CL.



La leyenda de la Figura 4.11 se muestra en la siguiente página.

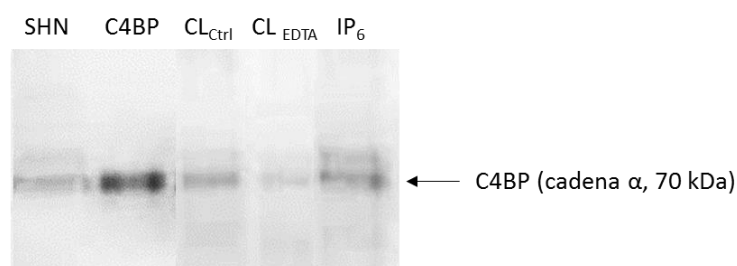
**Figura 4.11. Influencia de los gránulos de *InsP<sub>6</sub>* cálcico sobre el depósito detectable de C3 dependiente de VC sobre la CL.** (A) Se incubó CL control o CL pre-tratada con EDTA con SH diluido 1:60, en ausencia y presencia de C1q. Se grafica en la misma escala el depósito detectable de C3 en presencia solamente de VL (ausencia de C1q) y en presencia de VC y VL (presencia de C1q). El experimento es representativo de cuatro experimentos independientes. (B) Cuantificación de la influencia de los gránulos de *InsP<sub>6</sub>* cálcico sobre el depósito detectable de C3, empleando valores de cuatro experimentos independientes. Para cada experimento, empleando valores correspondientes a los 30 minutos de incubación, se calculó el cociente entre el valor de C3 depositado en la CL pre-tratada con EDTA y el valor correspondiente a la CL control. El asterisco indica significancia ( $p < 0.005$ ) en comparación con la unidad, es decir presencia de efecto del pre-tratamiento con EDTA, por el test t de Student para una muestra. El carril correspondiente a SHN contiene un estimado de 32 ng de C3.

En la Figura 4.12 se resumen los resultados obtenidos con respecto al depósito detectable de C4 y C3 proveniente de la VC para CL control y CL pre-tratada con EDTA.



**Figura 4.12. Resumen de la influencia de los gránulos de *InsP<sub>6</sub>* cálcico sobre el depósito detectable de C3 y C4 dependiente de la VC sobre la CL.** Se realizaron experimentos similares a los mostrados en las Figuras 4.9 y 4.11, pero incluyendo diluciones seriadas de SHN para cuantificación, y se procesaron los datos como se describió en la Figura 4.6. Los valores provienen de experimentos diferentes a los mostrados en las Figuras 4.9 y 4.11.

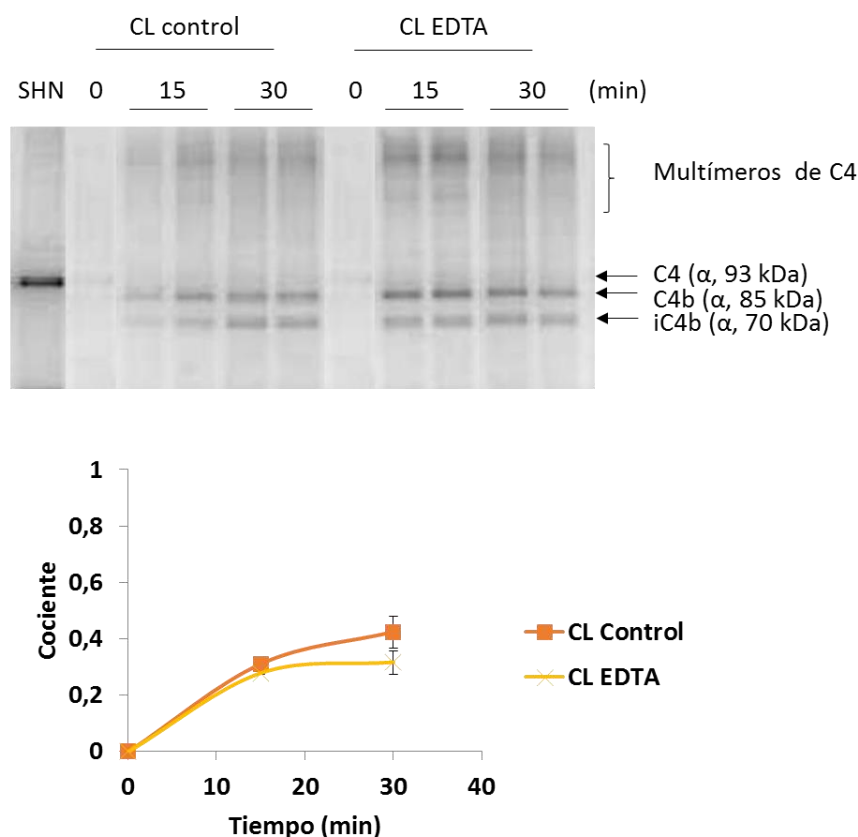
Las observaciones de que la activación de C4 y C2 iniciada por VC sobre la CL control no parece continuarse en términos de depósito detectable de C3, y que la unión de C1q se da preferentemente sobre los gránulos de  $InsP_6$  cálcico, sugerían que dichos gránulos podrían cumplir un papel dual, activando por un lado la VC a través de la unión del complejo C1, y controlando por otro lado a la misma vía a nivel de la activación de C3. A su vez esto último podría deberse al reclutamiento a los propios gránulos de algún inhibidor de la convertasa de C3 de la VC, como podría ser C4bp. En esta hipótesis, los gránulos de  $InsP_6$  darían lugar a una activación de VC “no productiva”, funcionando como sitios de consumo de componentes de la VC (posiblemente de C1 y C2), previniendo la activación de esta vía sobre los anticuerpos. Con esto en mente se estudió si la CL era capaz de unir C4bp. Se observó que efectivamente la CL control une a C4bp partir de SH, y que esta unión es más débil en material del que se han eliminado previamente los gránulos de  $InsP_6$  cálcico. Además se observó unión de C4bp a partir de SHN sobre  $InsP_6$  cálcico purificado (Figura 4.13).



**Figura 4.13. Unión de C4BP a la CL.** Se incubó CL control, CL pre-tratada con EDTA o  $InsP_6$  cálcico purificado con SH en dilución 1:60. Se realizaron varios lavados en tampón veronal salino, y se eluyeron las proteínas unidas con una solución de NaCl 2M. Se concentraron las proteínas eluidas por precipitación con TCA y se analizó mediante western blot con un anticuerpo contra la cadena  $\alpha$  de C4bp humana. En los carriles se muestran de izquierda a derecha: dilución de SHN, C4BP humana purificada (75 ng), elución de CL control, elución CL pre-tratada con EDTA y elución de  $InsP_6$  cálcico. El experimento es representativo de tres experimentos independientes.

Como siguiente paso, se evaluó si la presencia de los gránulos de  $InsP_6$  cálcico se asociaba a mayor velocidad de inactivación de C4b, como se esperaría si la unión de C4bp observada tiene una consecuencia funcional. Como ya se mencionó en presencia de C4bp y de factor I, C4b es inactivado a iC4b (cadena  $\alpha$ , 70 kDa), que también queda unido a la superficie porque

mantiene el sitio del enlace tioéster. En la Figura 4.14 se muestra el resultado obtenido del estudio del grado de inactivación de C4b sobre CL control y CL pre-tratada con EDTA. Se aprecia que la ausencia de gránulos no modifica el grado de inactivación de C4b a cada tiempo, de lo que se deduce que la unión de C4bp probablemente no explica los resultados observados previamente. Más en general, este resultado sugiere que el efecto de los gránulos de  $\text{InsP}_6$  cálcico sobre el depósito de C3 por la VC no se debe a una mayor inactivación de C4b, aún independiente de C4bp.

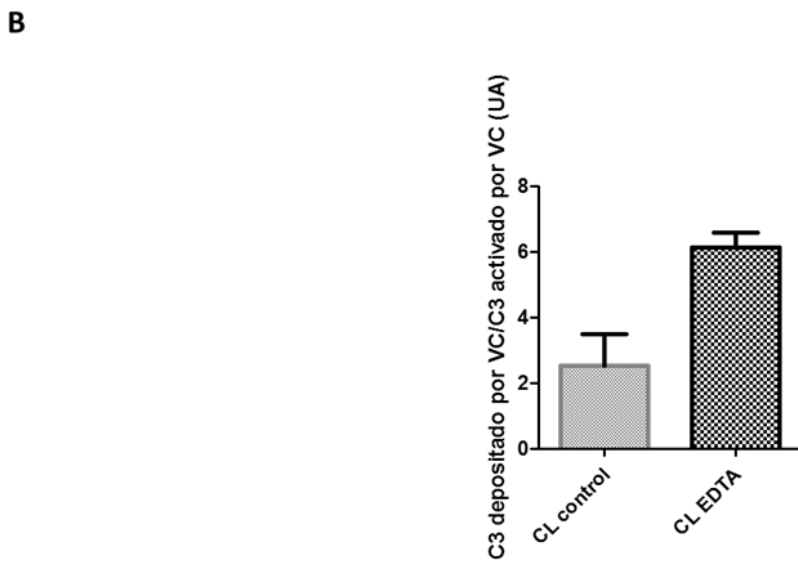
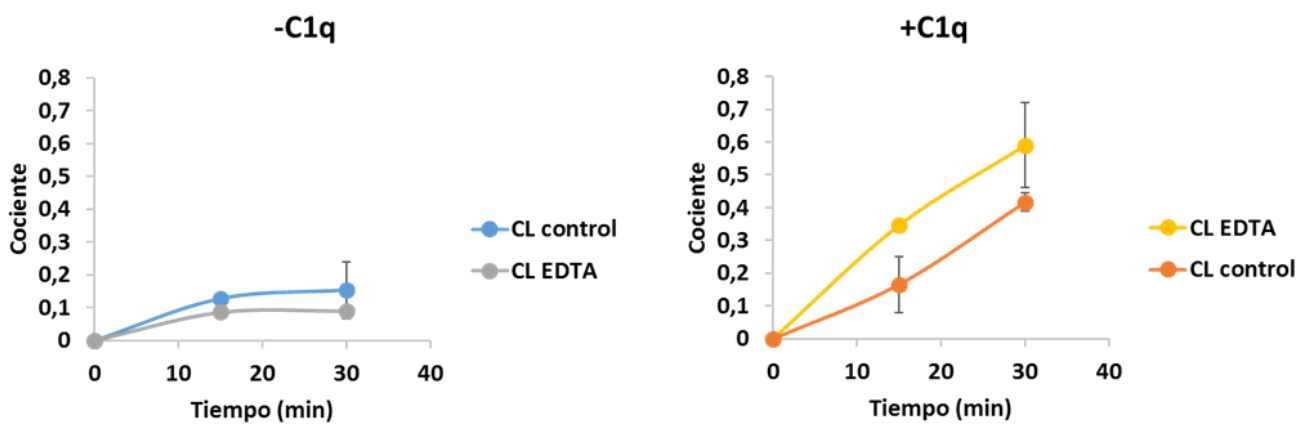
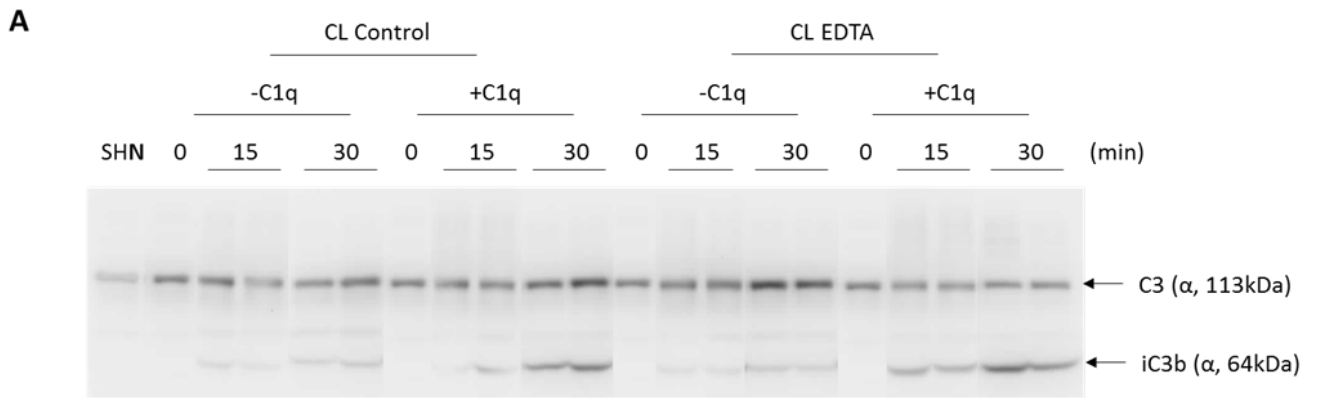


**Figura 4.14. Ausencia de efecto de los gránulos de  $\text{InsP}_6$  cálcico sobre la inactivación de C4b sobre la CL.** Se incubó CL control o pre-tratada con EDTA con SH diluido 1:60 conteniendo C1q y se realizó un ensayo de depósito de C4 como los descritos previamente en las Figuras 5A y 9, pero empleando un anticuerpo contra la región C4d de la cadena  $\alpha$  de C4. Se grafica el grado de inactivación de C4b, calculado como el cociente entre la banda de iC4b y la suma de dicha banda más la correspondiente a C4b, para cada carril. Excepto para el tiempo cero, se realizaron y analizaron dos reacciones independientes, se grafica promedio y desviación estándar de estos duplicados. El experimento es representativo de dos experimentos independientes. El carril correspondiente a SHN contiene aproximadamente 10 ng de C4.



Las observaciones de que, por un lado, los gránulos de  $\text{InsP}_6$  cálcico afectan débilmente el depósito observable de C4b, no afectan la vida media de C4b, y no afectan la activación de C2, y por otro lado casi anulan el depósito detectable de C3b por VC, en conjunto sugirieron un efecto a nivel del depósito covalente (detectable) de C3b. Se debe recordar que el  $\text{InsP}_6$  cálcico carece de grupos nucleófilos capaces de aceptar el tioéster de C3b (o C4b). También se debe recordar que la estrategia experimental usada implica que no todo el C3b (y C4b) covalentemente unido es recuperado para su análisis, y que la fracción recuperada podría ser diferente según el depósito ocurra sobre el  $\text{InsP}_6$  cálcico (o más probablemente, sobre proteínas adsorbidas al mismo) o sobre las mucinas. A fin de evaluar si el efecto observado del  $\text{InsP}_6$  cálcico tenía que ver con la eficiencia de la reacción de depósito covalente, y/o con cambios en la proporción del C3 depositado que es efectivamente detectado en nuestro sistema experimental, se evaluó la cantidad de C3 activado no depositado, es decir presente en los sobrenadantes de reacción. Como se mencionó en la Introducción, durante la activación de C3 sobre superficies, solo una pequeña proporción (menos del 10%) de las moléculas de C3b formadas se deposita covalentemente sobre las mismas; el resto reacciona rápidamente con agua, quedando en la fase fluida. Estas moléculas, al estar desprotegidas de la acción de los reguladores del complemento, son rápidamente inactivadas a iC3b. Es por esto que en la Figura 4.15, en la que se muestra el grado de activación de C3 en el sobrenadante de incubación del mismo ensayo mostrado en la Figura 4.11A, se aprecia solamente la banda de iC3b además de la de C3 nativo. En dicha figura se observa también que hay una contribución importante de la VC a la activación de C3 detectable en la fase fluida en la CL control, contrastando con el resultado anterior obtenido analizando el depósito covalente de C3. De todos modos, se observó que los gránulos de  $\text{InsP}_6$  cálcico tienen un efecto negativo sobre la activación de C3 en sobrenadante dependiente de VC. Sin embargo, dicho efecto no es tan importante como el efecto sobre el C3 depositado. En la parte B de la Figura 4.15 se resume el efecto de los gránulos específicamente sobre el paso de depósito covalente de C3 (detectable) previamente activado por VC. Este efecto se estimó como el cociente entre el C3 depositado detectable y el C3 activado (detectado en sobrenadante), en ambos casos descontando las contribuciones independientes de C1q, para CL control y CL pre-tratada con EDTA. Se deduce de la Figura 4.15B que habría un efecto de los gránulos sobre la eficiencia del depósito del C3 activado por la VC, o al menos sobre la fracción de dicho depósito que resulta detectable en nuestro sistema experimental. Teniendo en cuenta la concentración

promedio de C3 en SH y corriendo en los *western blot* diluciones de SH como estándar de C3, se realizó una estimación, muy aproximada, de la proporción de C3 que se deposita (siempre en forma detectable en nuestro sistema) con respecto a la cantidad de C3 total que se activa sobre la CL. Se estimó que del total del C3 activado sobre la CL control se deposita (en forma detectable) el 1,3%, mientras que este valor aumenta a 3,6% (unas 2,8 veces) cuando se eliminan previamente los gránulos de  $\text{InsP}_6$  cálcico de la CL. Nuevamente, se pone de manifiesto la capacidad de los gránulos de  $\text{InsP}_6$  cálcico de interferir con el depósito detectable de C3 iniciado por VC. También nuevamente, no se observó efecto del  $\text{InsP}_6$  cálcico sobre la activación de C3 iniciada por VL (independiente de C1q) (Figura 4.15A).

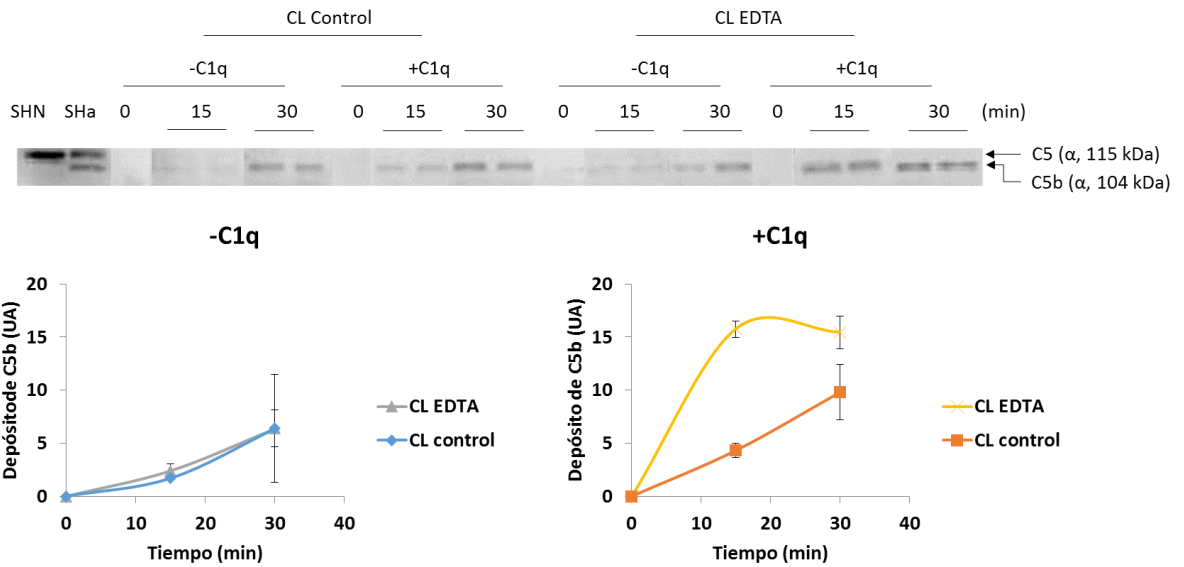


La leyenda de la Figura 4.15 se muestra en la siguiente página.

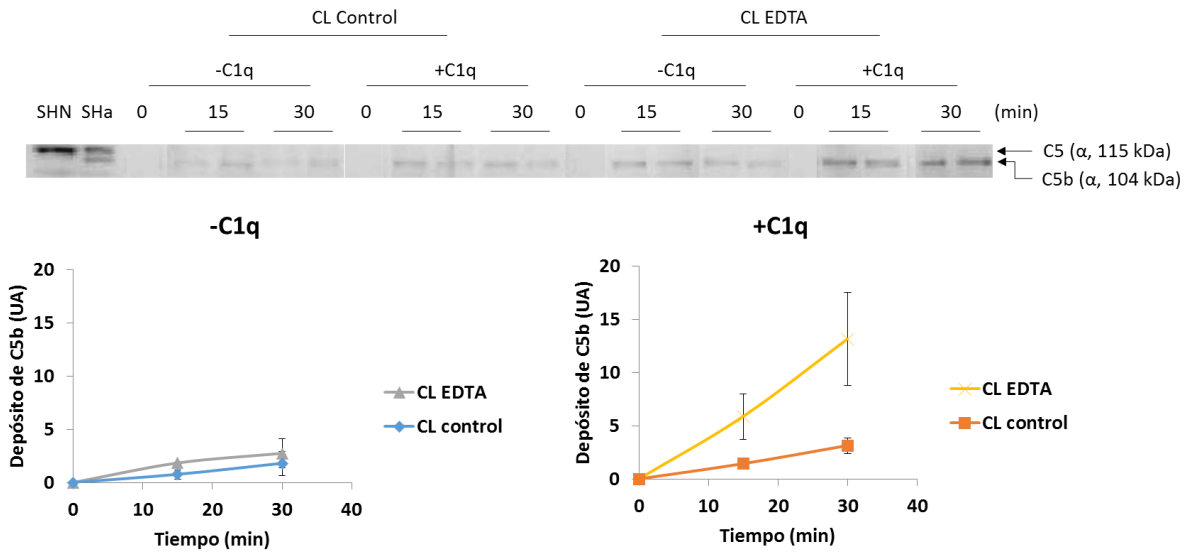
**Figura 4.15. Efecto de los gránulos de  $\text{InsP}_6$  cálcico sobre la activación de C3 dependiente de VC causada por la CL.** (A) Se incubó CL control o CL pre-tratada con EDTA con SH diluido 1:60 en ausencia y presencia de C1q. Se recuperaron los sobrenadantes de incubación y se analizaron por western blot utilizando un anticuerpo contra la región C3d de la cadena  $\alpha$  de C3, seguido de densitometría. Se grafica el grado de activación de C3, calculado como el cociente entre la banda de iC3b y la suma de dicha banda más la correspondiente a C3 no activado en cada carril. En cada ensayo, excepto para los tiempos cero, se realizaron y analizaron dos reacciones independientes; se grafica promedio y desviación estándar de estos duplicados. (B) Estimación del efecto de los gránulos de  $\text{InsP}_6$  cálcico sobre el depósito covalente de C3 activado por la VC, calculado como el cociente entre el C3 depositado detectable sobre la CL (extraíble por incubación de la CL con hidroxilamina) y el C3 activado presente en el sobrenadante de incubación. Los datos de C3 depositado y activado dependientes de VC se calcularon como diferencias entre los correspondientes a presencia de C1q (VL+VC) y los correspondientes a la ausencia de C1q (VL solamente). Los datos usados corresponden al tiempo 30 minutos del experimento mostrado en la Figura 4.11A para el depósito covalente de C3, y del experimento mostrado en esta Figura, parte A, para C3 activado en sobrenadante. UA: unidades arbitrarias.

Finalmente, se estudió el efecto de los gránulos de  $\text{InsP}_6$  cálcico sobre la activación de C5 inducida por la CL en condiciones de no contribución de la VA, evaluándose tanto el depósito no covalente de C5b como la producción de C5a, detectada en la fase fluida. En la Figura 16 se muestran los resultados para el depósito de C5b, obtenidos en dos experimentos independientes. Si bien la cinética de activación es diferente entre ambos experimentos, se puede apreciar que hay un efecto negativo del  $\text{InsP}_6$  cálcico sobre el depósito de C5b dependiente de VC. Este efecto no es tan importante como el observado para el depósito detectable de C3, pero parece ser algo más pronunciado que el observado para la activación de C3.

### Experimento 1

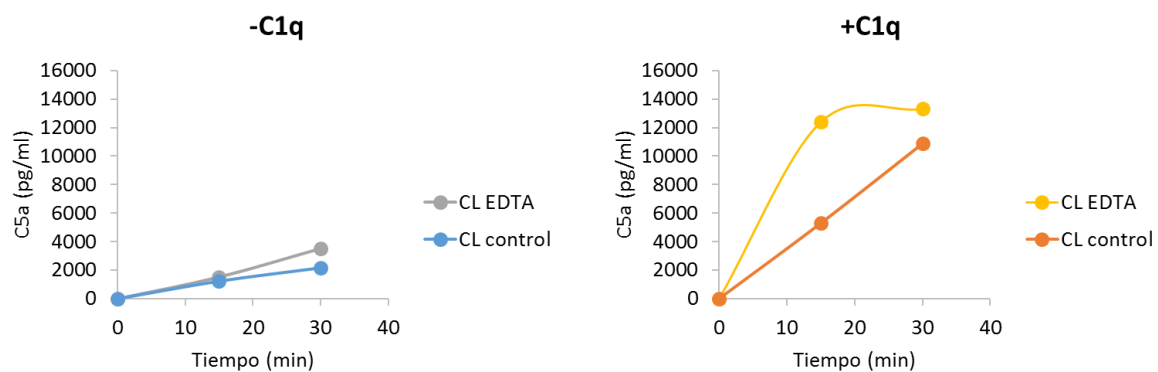


### Experimento 2



**Figura 4.16. Influencia de los gránulos de  $InsP_6$  cálcico sobre el depósito de C5 sobre la CL dependiente de VC.** Se incubó CL control o CL pre-tratada con EDTA con SH diluido 1:60 (en ausencia y presencia de C1q) y se analizó el C5b asociado. Se muestran los resultados de dos experimentos independientes. Para cada experimento, se grafica el depósito de C5 en presencia de VL solamente (“-C1q”) y en presencia de VC y VL (“+C1q”). El procesamiento y análisis de las muestras es como en la Figura 6. Vale aclarar que los resultados de “CL Control” mostrados para ambos experimentos, son los mismos que los mostrados en la Figura 6. “SHNa” hace referencia a suero humano activado con zymosán (paredes de levaduras) para generar C5b. Los carriles correspondientes a SHN y SHNa contienen aproximadamente 21 ng de C5.

Con respecto a la producción de C5a (Figura 4.17), se observó a nivel preliminar que la misma sigue un comportamiento similar al detectado para el depósito de C5b. En efecto, se observa que hay producción de C5a dependiente de la VC en la CL control, y que ésta se acentúa en ausencia de los gránulos de  $\text{InsP}_6$  cálcico. Esto implicaría que, al contrario de lo que ocurre para (la activación y el depósito detectable de) C3, para C5, la influencia del  $\text{InsP}_6$  cálcico sobre la activación del componente es similar a su influencia sobre el depósito del mismo componente. Esto sería así a pesar de que la proporción del C5b formado que se retiene en la CL es baja. Lo último surge de comparar en términos molares (muy aproximados) la cantidad de C5b detectado asociado a la CL y la cantidad de C5a detectado en el sobrenadante de reacción, siendo la última 10 veces mayor que la primera. En forma similar a lo observado para los parámetros de activación de C3 medidos, para el depósito de C5b y para la formación de C5a no existió efecto del  $\text{InsP}_6$  cálcico sobre la contribución de la VL (independiente de C1q) (Figuras 4.16 y 4.17).



**Figura 4.17. Efecto de los gránulos de  $\text{InsP}_6$  cálcico sobre la generación de C5a dependiente de VC, a la dilución de suero 1:60.** Se incubó CL control o CL pre-tratada con EDTA, con SH diluido 1:60, en ausencia y presencia de C1q. Se recuperaron los sobrenadantes de incubación y cuantificó C5a en los mismos. Se grafica la producción de C5a en presencia de VL solamente (“-C1q”) y en presencia de VC y VL (“+C1q”).

Los modelos para el efecto de los gránulos de  $\text{InsP}_6$  cálcico sobre la activación y depósito de complemento iniciado por VC sobre la CL compatibles con los datos se retomarán en la sección Discusión.

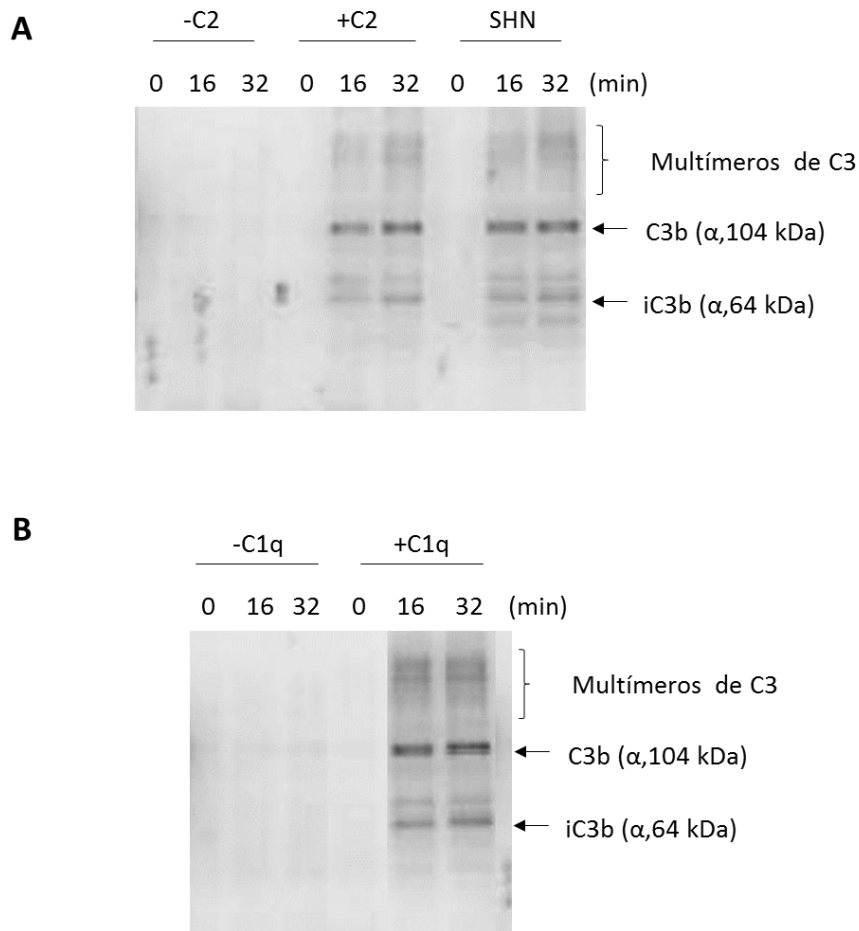
## **4.2. Ensayos con material hidático de origen humano.**

Se realizaron ensayos, menos abarcativos que los descritos previamente, sobre CL de origen de hospedero humano, con la intención de validar los resultados obtenidos con la CL de origen de ratón.

### **4.2.1 Verificación de ausencia de contribución de VA a la dilución de SH 1:60 y observación de ausencia de activación de VL sobre CL de origen humano.**

En primera instancia se quiso corroborar que sobre la CL de origen humano tampoco había contribución de VA al depósito de C3 al trabajar con SH diluido 1:60. Se muestra en la Figura 4.18A que el depósito en las condiciones del ensayo depende solamente de las vías que requieren C2, confirmando entonces, la ausencia de contribución de la VA a dicha dilución de SH.

A continuación se estudió si la contribución de la VL al depósito de C3 que se observó sobre la CL de origen de ratón estaba también presente cuando la CL era de origen humano. Para esto se incubó CL de origen humano con SH “depletado” de C1q y reconstituido a la concentración fisiológica de este componente, y se estudió el depósito de C3. Como se muestra en la Figura 4.18B, sobre CL de origen humano y trabajando con SH diluido 1:60, no existe contribución de la VL, sino que todo el depósito de C3 detectado depende de la VC. Este resultado va a favor de la idea sugerida en la sección 4.1.2 de que la contribución observada de la VL se podría deber al reconocimiento de lectinas humanas de motivos de glicosilación sobre los anticuerpos unidos *in vivo* a las mucinas de la CL de ratón, es decir, que es artefactual.



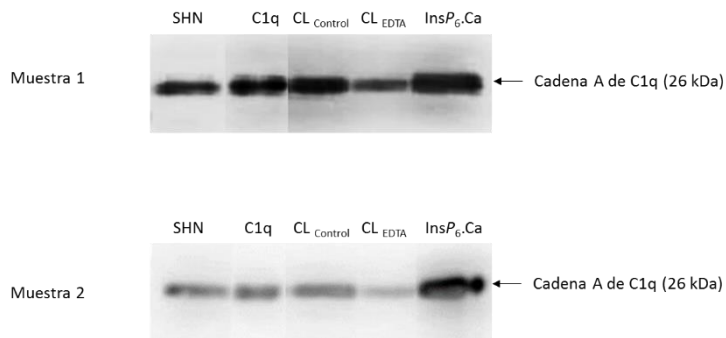
**Figura 4.18. Depósito de C3 dependiente de VC, y ausencia de depósito dependiente de VL, sobre CL de origen humano, a la dilución de suero 1:60.** (A) Se incubó CL de origen humano con SH diluido 1:60 “depletado” de C2 (“-C2”) y reconstituido a la concentración fisiológica de este componente. Se comprueba que a esta dilución de SH tampoco no hay contribución de VA al depósito de C3 sobre CL de origen humano. (B) Se incubó CL de origen humano con SH diluido 1:60 “depletado” de C1q (“-C1q”) y reconstituido a la concentración fisiológica de este componente (“+C1q”). Se observa que no hay depósito de C3 independiente de VC en condiciones de no contribución de VA, es decir no hay activación de VL. El depósito de C3 sobre la CL fue analizado como ya fue explicado para las Figuras 4.1 a 4.5 y 4.9 a 4.11.

#### 4.2.2 Efecto de los gránulos de $InsP_6$ cálcico sobre la activación de la VC sobre CL de origen humano, en ausencia de contribución de la VA

En primera instancia se verificó la capacidad de la CL de origen humano de unir a C1q. Para esto se evaluaron dos muestras diferentes, descritas en la sección Materiales y Métodos. Para



ambas, se observó que la CL de origen humano es capaz de retener a C1q y que dicha unión ocurre principalmente sobre los gránulos de  $\text{InsP}_6$  cálcico, ya que disminuye significativamente al tratar con EDTA la CL previo a la incubación con SH (Figura 4.19).



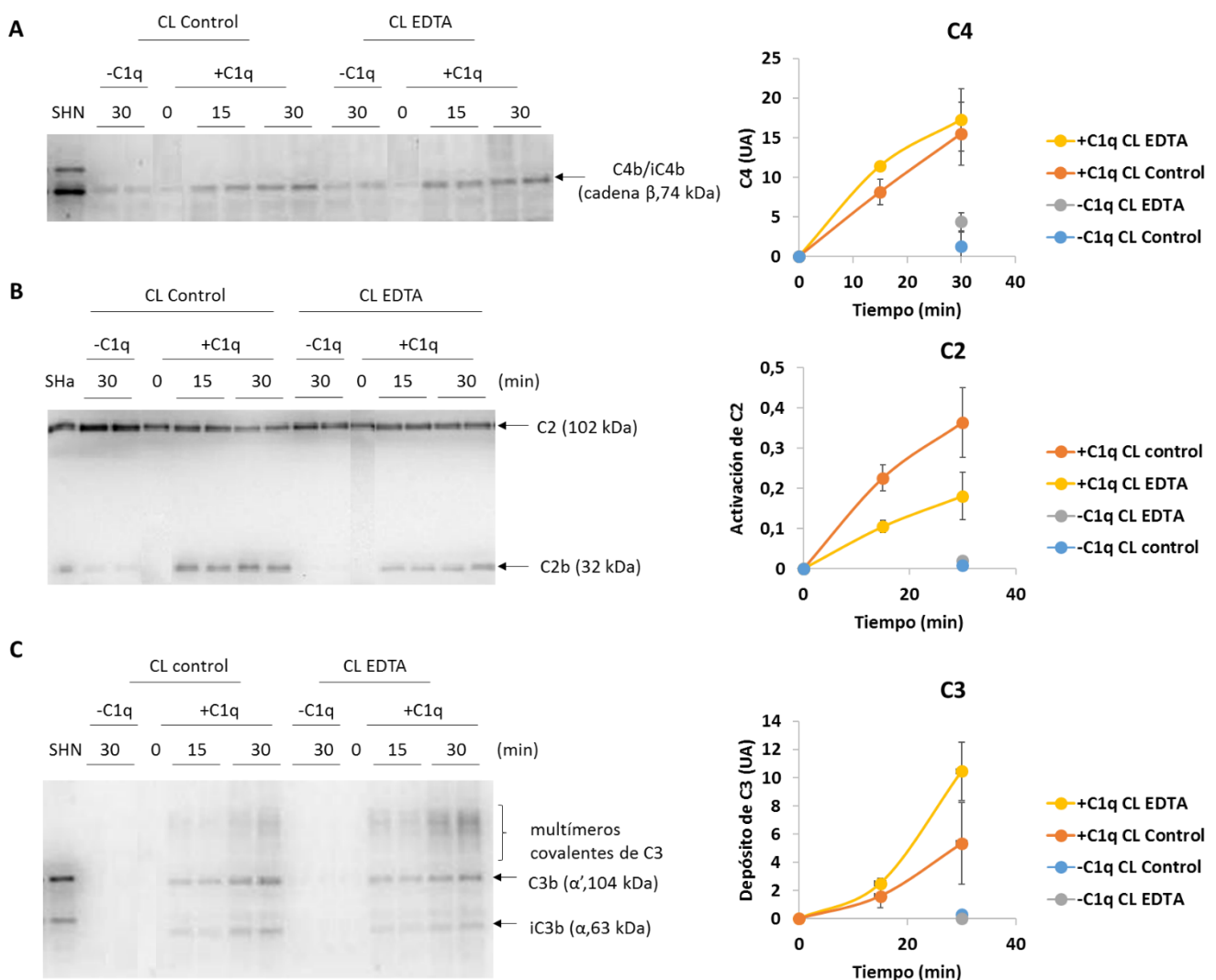
**Figura 4.19. Unión de C1q a CL de origen humano.** Se incubaron con SHN en dilución 1:60 dos muestras de CL de origen humano sometidas a tratamiento control o CL pre-tratada con EDTA, o  $\text{InsP}_6$  cálcico purificado. Las características de las Muestras identificadas como 1 y 2 se detallan en Materiales y Métodos. En los carriles se muestran de izquierda a derecha: dilución de SHN, C1q humano purificado (24 ng), elución de CL control, elución CL pre-tratada con EDTA y elución de  $\text{InsP}_6$  cálcico purificado. Se realizó el experimento de la manera descrita en la Figura 4.8.

A continuación se evaluó qué es lo que ocurre en términos de activación y depósito de complemento, siempre utilizando SH diluido 1:60, “depletado” de C1q y reconstituido con dicho componente a la concentración fisiológica. En primer lugar se estudió el depósito detectable de C4, el cual, como se muestra en la Figura 4.20A resultó depender completamente de la VC, como se esperaba de los datos anteriores. Además se observó que, contrariamente a lo observado con el material de origen de ratón, dicho depósito no se modifica por la eliminación del  $\text{InsP}_6$  cálcico. Cabe destacar que la banda de C4 observada a tiempo “0” de incubación y en ausencia de C1q se debe probablemente a C4 adsorbido sobre la CL, pero no activado. Si se hubiese empleado un anticuerpo contra la cadena  $\alpha$  del C4 en este análisis, se podría discriminar la banda de 93 kDa, correspondiente al C4 no activado, de la de 85 kDa correspondiente a C4b.

A continuación se estudió la activación de C2 (Figura 4.20B). Para este parámetro se observó, a diferencia de lo que se observaba para la CL de origen de ratón, menor activación sobre el material del que se eliminaron los gránulos. Esto sugiere que tanto el  $\text{InsP}_6$  cálcico como los anticuerpos están contribuyendo a la activación de la VC sobre este material. En este punto

hay que recordar que para que haya activación de C2, necesariamente debe haber depósito de C4. Entonces, la aparente ausencia de una contribución de los gránulos al depósito de C4 previamente mencionada sugiere que el procedimiento experimental no permite detectar la totalidad del C4 depositado; este punto será retomado en la Discusión.

Con respecto al depósito de C3 (Figura 4.20C), el mismo parece ser levemente mayor en la CL pre-tratada con EDTA que en la CL control. Este resultado parece contrastar con el obtenido para la activación de C2. Además parece imitar, si bien con un efecto menos contundente del  $InsP_6$  cálcico, lo observado para el depósito de C3 en la CL de origen de ratón.

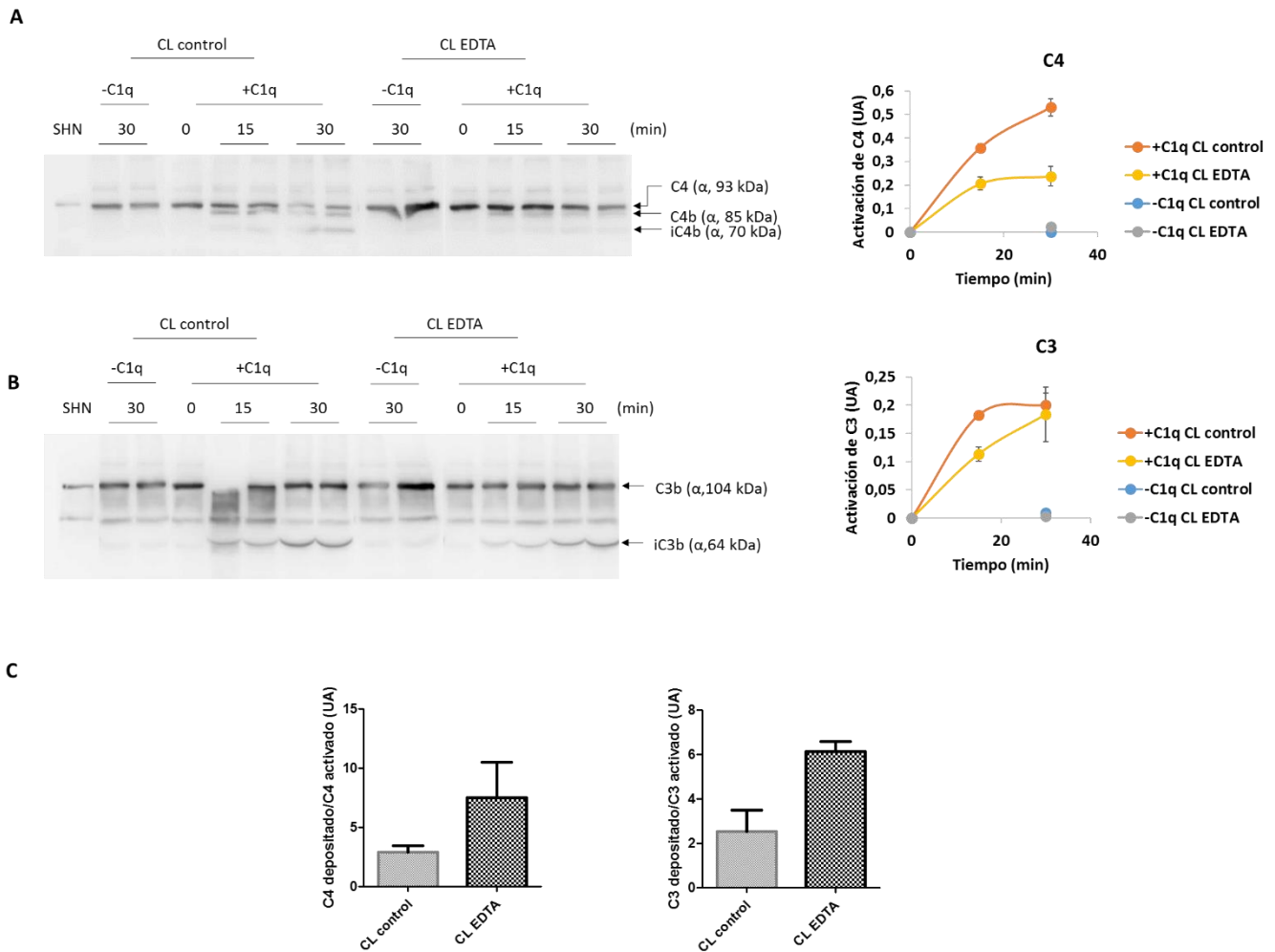


La leyenda de la Figura 4.20 se muestra en la siguiente página.

**Figura 4.20. Efecto de los gránulos de  $\text{InsP}_6$  cálcico sobre el depósito de C4, la activación de C2 y el depósito de C3 sobre la CL de origen humano, en condiciones de ausencia de contribución de la VA.** Se incubó CL control o CL pre-tratada con EDTA (correspondiente a la "Muestra 1") durante los tiempos indicados con SH 1:60 "depletado" de C1q (solo 30 minutos de incubación) ("-C1q") y reconstituido con C1q a la concentración fisiológica ("+C1q"). (A) Depósito de C4, analizado utilizando un anticuerpo contra la cadena  $\beta$  del C4, como se explicó en las Figuras 3, 5 y 9. (B) Activación de C2, analizada como se describió en la Figura 10. (C) Depósito de C3, analizado como se describió en las Figuras 1 a 5. Los carriles de SHN en (A) y (C) corresponden a 18 ng de C4 y 21 ng aproximadamente de C3, respectivamente.

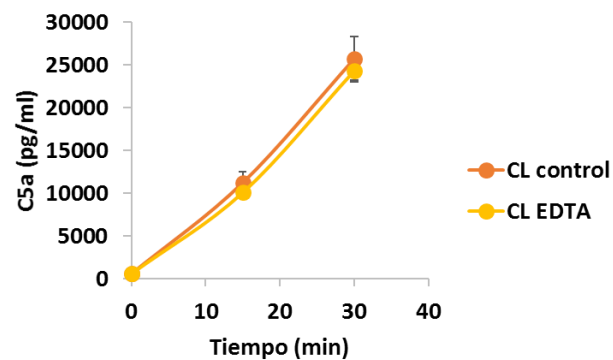
Teniendo en cuenta el posible efecto negativo de los gránulos de  $\text{InsP}_6$  cálcico sobre la eficiencia de depósito detectable de C3 (y posiblemente de C4) evidenciado para la CL de origen de ratón, se estudió también la activación total de estos dos componentes, sobre material de origen humano. Como se muestra en la Figura 4.21A, la activación de C4 sigue el comportamiento de la activación de C2, es decir que hay menor activación en la CL de la que se eliminó el  $\text{InsP}_6$  cálcico. Nuevamente, esto implica que tanto los anticuerpos unidos *in vivo* como el  $\text{InsP}_6$  cálcico están contribuyendo a la activación de la VC en este material. Nuevamente, esto difiere del resultado obtenido para el depósito detectable de C4, el que no se veía afectado por la presencia de los gránulos. El resultado para la activación de C3 también contrasta con el resultado observado para el depósito covalente detectable del mismo componente, observándose una activación de C3 levemente menor (al tiempo más corto ensayado solamente) en la CL tratada con EDTA (Figura 4.21B).

Se realizó un análisis similar al realizado anteriormente para el material de origen de ratón (Figura 4.15), calculando los cocientes entre las cantidades (detectables) de C4 o C3 depositadas covalentemente y las cantidades activadas de estos mismos componentes (Figura 4.21C). Se observa que para ambos componentes, la remoción de los gránulos de  $\text{InsP}_6$  cálcico hace aumentar la relación entre componente depositado y componente activado, en forma muy similar a lo observado (para C3) con el material de origen de ratón.



**Figura 4.21. Efecto de los gránulos de  $InsP_6$  cálcico sobre la activación de C4 y C3 dependiente de VC causada por la CL de origen humano.** Se recuperaron los sobrenadantes de incubación del experimento mostrado en la Figura 20 y se analizaron por western blot seguido de densitometría. Se muestra en (A) el análisis realizado empleando un anticuerpo contra la región C4d de la cadena  $\alpha$  de C4. Se grafica el grado de activación, calculado como el cociente entre la suma de las bandas correspondientes a C4b más iC4b y la suma de las bandas correspondientes a las anteriores más C4 no activado. En (B) se muestra el análisis realizado empleando un anticuerpo contra la región C3d de la cadena  $\alpha$  de C3. Se grafica el grado de activación, calculado como el cociente entre la banda de iC3b y la suma de dicha banda más la correspondiente a C3 no activado en cada carril. En cada ensayo, excepto para los tiempos cero, se realizaron y analizaron dos reacciones independientes; se grafica promedio y desviación estándar de estos duplicados. (C) Estimación del efecto de los gránulos de  $InsP_6$  cálcico sobre el depósito covalente de C4 y C3 activado por la VC, calculado como el cociente entre el C3 o el C4 depositado sobre la CL (extraíble por incubación de la CL con hidroxilamina) y el C4 o C3 activado presente en el sobrenadante de incubación. Los datos usados corresponden al tiempo 30 minutos del experimento mostrado en la Figura 4.20A y C para el depósito covalente de C4 y C3, respectivamente, y del experimento mostrado en esta Figura, partes A y B para C4 y C3 activados en sobrenadante. UA: unidades arbitrarias.

Finalmente se procedió al estudio de la activación de C5. No se logró detectar C5b mediante *western blot*, por lo que se continuó el estudio de la generación C5a en fase fluida por ELISA. Se muestra en la Figura 4.22 que la generación de C5a inducida por la CL de origen humano no se ve modificada por la ausencia de  $\text{InsP}_6$  cálcico. Es necesario aclarar en este punto que los experimentos mostrados en las Figuras 4.18, 4.20 y 4.21 fueron realizados con SH comercial “depletado” y reconstituido a la concentración fisiológica de C1q, mientras que el estudio de la generación de C5a fue realizado con SHN obtenido en el Laboratorio. Estos sueros podrían comportarse en formas diferentes, por lo que sería importante repetir el análisis de la producción de C5a utilizando el SH comercial.



**Figura 4.22. Efecto de los gránulos de  $\text{InsP}_6$  cálcico sobre la generación de C5a inducida por la CL de origen humano, en condiciones de ausencia de contribución de VA.** Se incubó CL control o CL pre-tratada con EDTA, con SHN diluido 1:60, se recuperaron los sobrenadantes de incubación y cuantificó C5a en los mismos. Para cada tiempo de incubación se realizaron y analizaron dos reacciones independientes. Se representan promedio y desviaciones estándar de los duplicados.

En suma, los gránulos de  $\text{InsP}_6$  cálcico parecen tener efectos contrapuestos sobre la activación de C3 dependiente de VC en los dos materiales de CL estudiados, siendo este efecto ligeramente negativo para el material de ratón (Figura 4.15) y levemente positivo para el material humano (Figura 4.21). El efecto de los gránulos sobre la activación de C5 dependiente de VC también difiere entre los dos materiales, siendo negativo para el material de origen de ratón y neutro para el de origen humano. Finalmente, y pese a lo anterior, la presencia de los gránulos hace disminuir en ambos materiales en forma similar el cociente entre C3 detectable depositado por la VC y el C3 activado por dicha vía. Esto sugiere fuertemente que en presencia del  $\text{InsP}_6$  cálcico, parte de la activación de la VC sobre los anticuerpos es re-dirigida sobre dicho

compuesto, y que esta modalidad de activación conlleva una menor eficiencia del depósito covalente de C3/C4, y/o formas de depósito que no son bien detectadas en nuestro sistema experimental.

Como ya se dijo previamente, los modelos para el efecto de los gránulos de  $\text{InsP}_6$  cálcico sobre la activación de la VC en ambos materiales de CL se retomarán en la sección Discusión.

## 5. Discusión

El planteo de esta Tesis surgió en el contexto de resultados previos del grupo, fragmentarios, que habían llevado a la hipótesis que la unión del subcomponente C1q a los gránulos de  $\text{InsP}_6$  cálcico daba lugar a iniciación de la VC, la cual podría luego expandirse a las mucinas. En la Tesis se obtuvieron resultados globalmente compatibles con esta hipótesis, si bien en forma en parte indirecta. Esto se debió a que buena parte del trabajo se dedicó a ensayar una variable de la hipótesis recién mencionada, que era que el  $\text{InsP}_6$  cálcico inhibiera la activación de la VC, por un mecanismo de iniciación abortiva (unión de C1q y de C4bp simultánea) y consiguiente consumo de los componentes de la vía. A la postre, esta variante de la hipótesis no resultó cierta, y en cambio se obtuvo evidencia de que si bien la iniciación sobre el  $\text{InsP}_6$  cálcico no es exactamente abortiva, sí es altamente ineficiente.

Debido a lo anterior, los resultados obtenidos son difíciles de interpretar, faltando aún realizar algunos experimentos que permitan explicar los datos en su conjunto. Aún así, es posible plantear un modelo conciliador que permite comprender los resultados obtenidos, así como los experimentos para poner dicho modelo a prueba.

### 5.1 Interacción entre los gránulos de $\text{InsP}_6$ cálcico y el sistema complemento en ausencia de VA

Debido a la gran capacidad amplificadora de la VA, para facilitar el estudio de la VC se realizaron la mayoría de los experimentos a una dilución de SH alta en la que la VA no participa. En este sistema, la primera observación global a destacar es que el  $\text{InsP}_6$  cálcico afecta el grado de activación del complemento sobre la CL en forma dependiente de la presencia de C1q. La segunda observación global es que la remoción del  $\text{InsP}_6$  cálcico da lugar a un aumento en la proporción del C4 y C3 activados que efectivamente se depositan sobre la CL en forma liberable por hidroxilamina. Esta observación junto con la anterior sugiere que existe iniciación de la VC sobre el  $\text{InsP}_6$  cálcico, cuya propagación es ineficiente, en particular a nivel de los pasos que implican depósito covalente de las proteínas con tioéster.

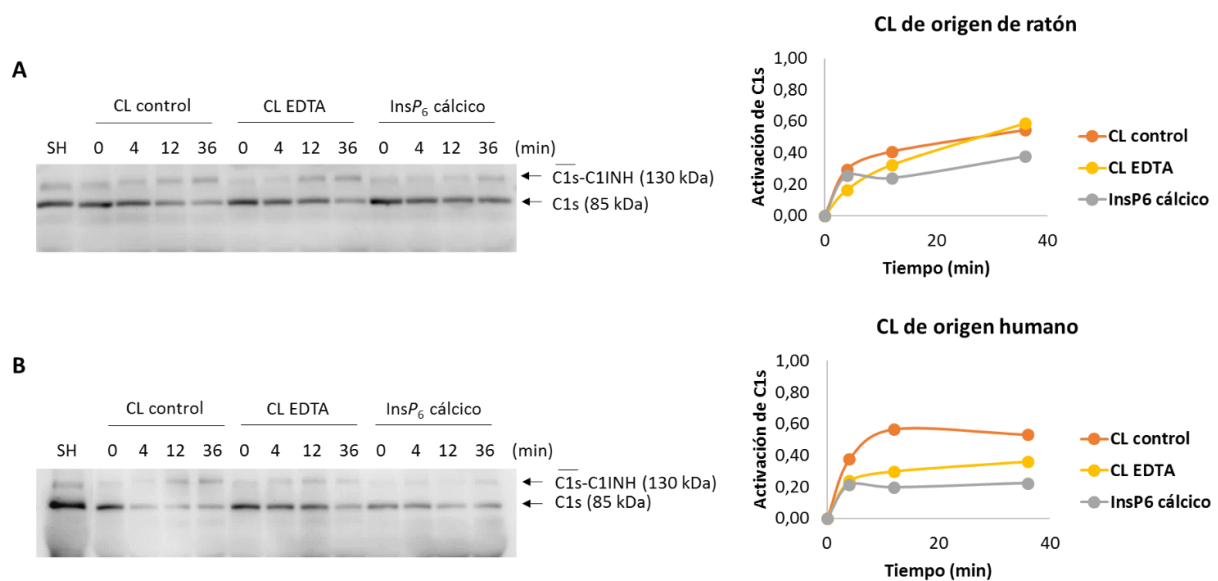
A continuación se desglosa el modelo propuesto de acuerdo a los resultados obtenidos, y los posibles experimentos a realizar para validar dicho modelo, dividiendo a la parte relevante de

la cascada del SC en tres etapas: iniciación de la VC, formación y actividad de convertasas de la VC, y activación de la vía terminal.

### 3.1.1 Iniciación de la VC

En este trabajo se evidenció la unión de C1q a los gránulos de  $InsP_6$  cálcico, previamente observada empleando  $InsP_6$  sintético, en el contexto de la CL. Tanto para la CL de origen de ratón como para la de origen humano, se observó unión de C1q del SH a la CL, que en su mayoría fue sobre los gránulos de  $InsP_6$  cálcico (Figuras 4.8 y 4.19).

La idea antes mencionada de que la unión de C1q al  $InsP_6$  cálcico lleva a la activación de la VC implica que tras la unión se debe producir la activación de las proteasas del complejo C1, C1r y C1s. Sobre este punto es que la estudiante Leticia Grezzi realizó su trabajo experimental de Tesina de grado, llevado a cabo en paralelo a esta Tesis y co-dirigido por la tesista. En la Figura 5.1 se muestran resultados obtenidos en dicho trabajo.



La leyenda de la Figura 5.1 se muestra en la siguiente página.



**Figura 5.1. La remoción de  $\text{InsP}_6$  cálcico no modifica la activación de C1s sobre CL de origen de ratón, pero disminuye la activación de C1s la CL de origen humano; el  $\text{InsP}_6$  cálcico puro puede activar al complejo C1.** Se muestra en (A) la activación de C1s sobre CL de origen de ratón y en (B) la activación sobre CL de origen humano. Se incubó CL control, CL pre-tratada con EDTA o  $\text{InsP}_6$  cálcico purificado con SH diluido 1:60 durante los tiempos indicados. Se detuvo la reacción por pasaje de los tubos de reacción a baño de hielo y posterior agregado de tampón de muestra de electroforesis 6X con 40 mM de DTT. Las muestras así obtenidas se analizaron para estudiar la activación del complejo C1 mediante western blot empleando un anticuerpo contra C1s humano, seguido de densitometría. La activación de C1s conlleva su corte proteolítico por acción de C1r a fragmentos de 58 kDa y 28 kDa, que se mantienen unidos por un puente disulfuro. Tras su activación, se une covalentemente el C1-INH al sitio activo de C1s activado, presente en el fragmento de 28 kDa (correspondiente al dominio serina proteasa). Como las muestras fueron corridas en condiciones reductoras, se observan la banda de la enzima sin activar (85 kDa) y la banda del complejo covalente entre el C1-INH y el fragmento menor de la enzima activada (130 kDa). Se realizó un solo tubo de reacción por tiempo. A la derecha se grafica la activación de las proteasas, calculada como el cociente entre el complejo del fragmento pequeño de C1s activado con el C1-INH, y la suma de este complejo más la banda de la proteasa sin activar.

En particular se muestra un ensayo en el que se evaluó la activación de C1s sobre CL control o pre-tratada con EDTA, tanto de origen de ratón como humano, así como sobre  $\text{InsP}_6$  cálcico purificado. Estos datos corresponden a un único experimento, en los que cada tiempo de incubación fue realizado sin duplicado, por lo que los resultados deben ser considerados con precaución. Más allá de esto, los resultados sugieren, en primer lugar, que efectivamente existe cierto nivel de activación de C1 por unión al  $\text{InsP}_6$  cálcico. Esto surge por un lado (preliminarmente) de los resultados con  $\text{InsP}_6$  cálcico purificado, si bien al experimento formalmente le falta un control de activación espontánea (SH incubado con tampón solamente), y además el  $\text{InsP}_6$  cálcico purificado puede no imitar al  $\text{InsP}_6$  cálcico en la CL, por tamaño de partícula [25], y por accesibilidad a macromoléculas, que podría estar restringida por la red de mucinas de la CL. La misma idea surge de la observación que en el material de CL de origen humano, la activación total de C1s es mayor en CL control que en material del que se eliminó el  $\text{InsP}_6$  cálcico. En segundo lugar, los resultados sugieren que la capacidad de unión de C1q que poseen los gránulos de  $\text{InsP}_6$  cálcico, no se ve reflejada en una capacidad acorde de activación del complejo C1 (comparar, para CL de origen de ratón la Figura 4.8 con la 5.1A; comparar para CL de origen humano la Figura 4.19 con la 5.1B). En este punto es necesario aclarar que el grado de activación de C1s se estudió indirectamente, a partir de la formación del complejo C1s-C1INH, por lo que estrictamente se debería de hablar de “inactivación”. Sin embargo, dado que para que ocurra dicha inactivación debe de ocurrir una activación previa de la proteasa, es posible correlacionar el grado de inactivación con el grado

de activación. En tercer lugar, los resultados sugieren que, nuevamente, existen diferencias entre los materiales de diferentes orígenes de hospedero: el  $\text{InsP}_6$  cálcico no modifica la capacidad global de la activación de C1 en el material de origen de ratón, y en cambio contribuye positivamente a dicha capacidad en el material humano (comparar las partes A y B de la Figura 5). Esto es similar a lo que se observó al comparar la activación de C2 entre los materiales de los dos orígenes (Figuras 4.10 y 4.20). En cuarto lugar, los resultados sugieren que la suma de la activación de C1 atribuible a los anticuerpos (medida como la activación en CL pre-tratada con EDTA), y la activación atribuible al  $\text{InsP}_6$  cálcico (estimada groseramente a partir del resultado con el  $\text{InsP}_6$  cálcico purificado) **puede ser menor que la activación total de C1**, es decir la activación sobre la CL control. Esto a su vez sugiere que la unión y activación de C1 sobre el  $\text{InsP}_6$  cálcico y sobre los anticuerpos probablemente no son independientes. En otras palabras, los gránulos de  $\text{InsP}_6$  cálcico al unir grandes cantidades de C1, competirían con la unión de este componente sobre los anticuerpos. Además, y como componente del modelo necesario para explicar los resultados, los gránulos no serían tan buenos activadores de C1 como los anticuerpos, por lo que se estaría secuestrando C1 sobre una superficie que no es eficientemente activadora. Esta competencia (con activación ineficiente) funcionaría a mayor grado en el caso de la CL de origen de ratón, por una interacción no tan afín entre C1q humano y los anticuerpos de ratón, como se puede esperar de una interacción heteróloga. Esto explicaría porqué, para el material de CL de origen humano, tanto los gránulos como los anticuerpos parecen contribuir a la activación de la VC, mientras que para el material de origen de ratón los gránulos inhiben ciertos parámetros de la activación.

En suma, si bien los resultados para la activación de C1 son diferentes entre la CL de origen humano y la de ratón, en su conjunto podrían ser explicados por un modelo que cumpliera las siguientes condiciones:

- i. Sobre la CL de ratón habría mayor cantidad de anticuerpos capaces de unir C1 que sobre la CL humana. Esta condición es necesaria para explicar porqué (aún eliminando el  $\text{InsP}_6$  cálcico) la activación de C1 no es más rápida en la CL de origen humano que en la de origen de ratón (Figura 5), pese a tratarse de un sistema homólogo. Reforzando esta idea, resultados obtenidos por S. Miles y G. Mourglia-Ettlin muestran que existe una relación cercana a 10:1 en cuanto a cantidades totales de isotipos de anticuerpos con capacidad activadora de SC en CL de origen de ratón (IgM e **IgG2a**) *versus* CL de origen humano (IgG1 e IgG2), en las muestras usadas en esta Tesis.

- ii. El C1q humano tiene mayor avidéz por anticuerpos humanos que por anticuerpos de ratón y que por  $\text{InsP}_6$  cálcico. Es lógico pensar que el C1q humano es capaz de reconocer más eficientemente a la región Fc de isotipos de anticuerpos humanos que a las regiones análogas heterólogas. Una baja avidéz por  $\text{InsP}_6$  cálcico en comparación con anticuerpos humanos explicaría que la inhibición de VC, por competencia, que parece ocurrir en el material de origen de ratón no ocurra (al menos al mismo grado) en el material humano.
- iii. A igual nivel de unión, la eficiencia de activación de C1 por unión a anticuerpos es mucho mayor que la generada por la unión al  $\text{InsP}_6$  cálcico.

La tercera condición está de acuerdo a los antecedentes disponibles, si se considera que la unión de C1q al  $\text{InsP}_6$  cálcico es probablemente similar a la unión a polianiones como heparina y ADN. En relación a este punto, otros datos no mostrados obtenidos por la estudiante L. Grezzi demostraron, en experimentos de unión y activación de C1 sobre CL empleando C1 purificado, que la unión de C1q al  $\text{InsP}_6$  cálcico no requiere de otras proteínas séricas, o sea que es directa. Se sabe que la unión de C1q a polianiones ocurre en la cara interna de las cabezas globulares. El reconocimiento de ligandos en esta región de C1q conduce a una activación ineficiente del complejo C1, en comparación con la fuerte activación generada tras el reconocimiento de inmunocomplejos [38].

A continuación se describen posibles experimentos a realizar para poner a prueba características del modelo planteado con respecto a la activación de C1 sobre la CL.

Como se mencionó, los datos sugieren un fenómeno de competencia por la unión de C1 entre el  $\text{InsP}_6$  y los anticuerpos. Para demostrar en forma directa esta posible competencia, se podrían realizar experimentos para determinar cómo es la distribución de la unión de C1q en la CL. Para esto, habría que incubar CL control o pre-tratada con EDTA con SH, hacer lavados con fuerza iónica fisiológica (con  $\text{VBS}^{++}$ ) y realizar extracciones diferenciales secuenciales del C1q unido (en lugar de la extracción única utilizada en las Figuras 4.8 y 4.19). Estas extracciones diferenciales serían primero con EDTA, para disolver a los gránulos con su C1q asociado, y luego con alta fuerza iónica, para recuperar el C1q unido a los anticuerpos. De existir un fenómeno de competencia por la unión de C1q sobre la CL, la cantidad de C1q no extraíble por EDTA pero sí por alta fuerza iónica (o sea presumiblemente unida a los anticuerpos) debe ser mayor para la CL pre-tratada con EDTA (sin  $\text{InsP}_6$  cálcico) que para la CL

control. Además, en la CL control (pero no en la CL pre-tratada con EDTA) debe haber una cantidad importante de C1q extraíble por EDTA.

En segundo lugar habría que demostrar directamente que el  $\text{InsP}_6$  cálcico, en el contexto de la CL, puede activar a la VC. Para esto se necesita, por un lado, generar una suspensión de CL sin anticuerpos (por tratamiento con pronasa sección 3.1.2.2), pero además también se necesita SH que no posea anticuerpos naturales, ya que el SHN probablemente sí los posee (Figura 4.7) y dichos anticuerpos interfieren en este análisis. Este reactivo se puede generar por adsorción de SH carente de C1q con CL a 4°C, y posterior reconstitución con C1q (para evitar la pérdida del C1 durante el paso de adsorción). Obtenidos estos materiales, primero se podría medir el grado de activación de C1 (y/o C2) generado por el  $\text{InsP}_6$  cálcico como único iniciador en el contexto de la CL. En estos ensayos se deben incluir controles para verificar que no hay activación espontánea (SH incubado con tampón).

En un tercer paso, combinando el tipo de experimento descrito en el párrafo anterior con pre-tratamiento con EDTA y con CL pre-tratada con pronasa, se podría medir la capacidad de iniciación de VC del  $\text{InsP}_6$  cálcico, de los anticuerpos, y de ambos iniciadores juntos. En estos experimentos se espera que la suma de la activación generada por cada iniciador individual (o sea de la activación observada en CL sin  $\text{InsP}_6$  cálcico y observada en CL sin anticuerpos) sea mayor que la activación global sobre la CL control. Esto daría apoyo a la idea de competencia entre los mecanismos de iniciación.

El cuarto aspecto sería analizar si realmente el  $\text{InsP}_6$  cálcico es un iniciador ineficiente. Para ello se podría combinar los ensayos descritos en los dos párrafos anteriores con ensayos de unión de C1. Esto permitiría evaluar el cociente entre la unión de C1q y la activación de C1, y por lo tanto comparar la eficiencia de la activación, sobre los anticuerpos y sobre el  $\text{InsP}_6$  cálcico como iniciadores de la VC. Se espera que dicho cociente sea mayor para la CL que sólo posee  $\text{InsP}_6$  cálcico como iniciador que para la CL que posee solo anticuerpos como iniciadores.

### **5.1.2 Formación y actividad de la convertasa de C3 de la VC y depósito de C3 consiguiente**

El modelo planteado en la sección anterior incluye centralmente que en presencia de  $\text{InsP}_6$  cálcico, parte de la activación de la VC que podría ocurrir sobre los anticuerpos es re-dirigida (por competencia por el complejo C1) hacia los gránulos. En forma coherente con dicho

modelo, a nivel de la activación de C4, depósito de C4, activación de C2, activación de C3 y depósito de C3, aquellos cambios que se observan cuando se elimina previamente el  $\text{InsP}_6$  cálcico aparecen solo cuando el SH contiene C1q (Figuras 4.9, 4.11, 4.15, 4.16, 4.17, 4.20 y 4.21). También coherente con ideas discutidas en la sección anterior, en estos pasos de la activación de la VC, los efectos del  $\text{InsP}_6$  cálcico parecen ser diferentes según el origen del hospedero del material de CL analizado. Esto se ve más claramente para la activación de C2, parámetro sobre el cual la presencia del  $\text{InsP}_6$  no tiene efecto en el caso de la CL de origen de ratón, y en cambio ejerce un efecto positivo cuando el material es de origen humano, es decir que sigue el patrón observado para la activación de C1. Con respecto a la activación y depósito de C4, la situación es algo más compleja. Tiene que haber una proporción del C4 depositado, activado sobre los gránulos de  $\text{InsP}_6$  cálcico, que no se logra detectar en las condiciones del ensayo. De lo contrario no se puede explicar porqué en la CL de origen humano, el  $\text{InsP}_6$  cálcico contribuye positivamente a la activación de C2 (que depende necesariamente del depósito de C4b previo), pero no al depósito de C4 detectable. Este C4 depositado no detectado probablemente esté unido a proteínas adsorbidas en el curso del ensayo sobre el  $\text{InsP}_6$  cálcico, que son eliminadas durante los lavados con alta fuerza iónica previos al tratamiento con hidroxilamina.

Una vez activados C4 y C2 se forma la convertasa de C3, que activa a C3. Se observó que en la CL de origen de ratón, los gránulos ejercen un efecto significativamente negativo sobre el depósito de C3 dependiente de VC. Un efecto negativo más débil se observó en la CL de origen humano. Ya que el efecto negativo del  $\text{InsP}_6$  cálcico resultó ser independiente de la inactivación de C4b, y que el  $\text{InsP}_6$  cálcico como molécula no es aceptor covalente, se exploró la posibilidad de que exista un efecto a nivel de la unión covalente del C3b. Para ello, se analizó la activación total de C3, medida en el sobrenadante de incubación. Este análisis mostró que la activación y depósito detectable de C3 no tenían comportamientos paralelos, y que concretamente los gránulos ejercían un efecto negativo sobre la proporción del C3 activado que resultaba depositado en forma detectable en nuestro sistema (Figuras 4.15 y 4.21). Algo similar se observó para C4, usando CL de origen humano. Así, los resultados sugieren que el C3/C4 activados sobre el  $\text{InsP}_6$  cálcico seguramente sean hidrolizados en mayor proporción que los activados sobre los anticuerpos unidos a las mucinas, así como también reaccionen con proteínas adsorbidas que se pierden en los lavados con alta fuerza iónica previos al tratamiento con hidroxilamina, escapando a la detección en el sistema experimental usado.

El estudio de la activación de C3 en sobrenadante permitió además observar que el efecto del  $\text{InsP}_6$  cálcico sobre la activación de C2 no se corresponde con el efecto sobre la activación de C3 (comparar las Figuras 4.10 con 4.15 para CL de origen de ratón, y comparar las Figuras 4.20B con 4.21B para CL de origen humano). Descartada la posibilidad de inactivación de C4b más rápida en presencia del  $\text{InsP}_6$  cálcico que en su ausencia (Figura 4.14), estos resultados igualmente podrían explicarse proponiendo que las convertasas que se forman sobre el  $\text{InsP}_6$  cálcico tienen menor vida media efectiva: si están unidas covalentemente a proteínas que están adsorbidas al  $\text{InsP}_6$  cálcico, podrían perderse de la superficie por desorción de esas proteínas durante el propio ensayo.

Las ideas recién expuestas se podrían ensayar experimentalmente realizando experimentos de depósito de C4/C3, sobre CL control y CL pre-tratada con EDTA, pero con algunas diferencias con respecto a los realizados en esta Tesis. Luego de la incubación de la CL con SH, se realizarían lavados con baja fuerza iónica, de manera de minimizar la pérdida de proteínas adsorbidas que hayan podido actuar como aceptores covalentes, luego se trataría con EDTA para disolver a los gránulos con sus proteínas adsorbidas (que como se dijo son posibles sitios aceptores), y finalmente se trataría tanto al extracto de EDTA como al remanente insoluble con hidroxilamina. De esta manera se optimizaría la detección del depósito de C4 y C3, recuperándose diferencialmente los componentes depositados sobre el  $\text{InsP}_6$  cálcico y sobre la malla de mucinas. De ser correcto el modelo de re-direccionamiento de la activación desde los anticuerpos hacia el  $\text{InsP}_6$  cálcico, se debería observar que el depósito de C4/C3 no disociable por EDTA es mayor en la CL pre-tratada con EDTA que en la CL control; esto es similar a lo que se espera de los estudios propuestos sobre la competencia por la unión de C1. Ya que la hidroxilamina no sustituye enlaces amida, y por lo tanto en los ensayos que usan esta herramienta siempre es posible perder parte del C4/C3 depositados, el análisis recién mencionado debe complementarse con experimentos que no dependan de extracción con hidroxilamina. Para ello, se podría usar un formato de *dot blot* para detección de C3 y C4, aplicado al extracto de EDTA mencionado así como al remanente insoluble (mucínico) solubilizado por sonicación [10].

Es importante aclarar que aunque el reclutamiento de C4bp sobre los gránulos de  $\text{InsP}_6$  cálcico no mostró tener una consecuencia funcional (al menos en términos de inactivación del C4b detectable), no es posible descartar que este regulador pueda controlar globalmente la activación de la VC sobre la CL, independientemente del  $\text{InsP}_6$  cálcico. En efecto, C4bp podría

ser reclutada sobre las mucinas, de forma análoga a como se cree ocurre con fH [76]. Esa conclusión surge en parte de la observación que la inactivación de C3b sobre la CL no se hace más lenta al remover los gránulos de  $\text{InsP}_6$  cálcico [76], o sea una observación análoga a la que se hizo en esta Tesis para C4b. Para explorar esta posibilidad se podrían realizar experimentos en los que se comparara la velocidad de inactivación del C4b depositado sobre la CL y sobre una superficie activadora de la VC que no reclute ni posea actividad tipo C4bp (por ejemplo paredes de *S. cerevisiae* opsonizadas). De ser cierta esta posibilidad, se debería observar que sobre la CL, el C4b se inactiva mucho más rápido que sobre la otra superficie.

Finalmente, los resultados paradójicos observados al inicio de este trabajo en ensayos en los que estaba presente la VL (sobre la CL de origen de ratón, y que resultó ser artefactual) pueden ser explicados, al menos en parte, por el modelo propuesto en esta sección. En efecto, la mayor capacidad de amplificación de la VL con respecto a la VC, en particular en términos de depósito detectable de C3, podría deberse a la baja eficiencia en el depósito de C3, así como a la posible no detección de parte del C3 depositado, cuando la VC se inicia sobre el  $\text{InsP}_6$  cálcico.

### **5.1.3 Activación de la vía terminal**

En la presente Tesis se estudió el primer paso de la vía terminal, es decir la activación del componente C5, analizando sus fragmentos C5a y C5b. Nuevamente se cumplió que la presencia del  $\text{InsP}_6$  cálcico tiene efectos sobre la activación del SC sobre la CL solamente si está presente el C1q (Figuras 4.16 y 4.17). También nuevamente, el signo y/o magnitud de dichos efectos difieren según el origen de hospedero del material de CL. Para el material de origen de ratón, en línea con lo observado para el depósito de C3, la presencia del  $\text{InsP}_6$  cálcico tiene un efecto negativo sobre el depósito de C5b y la generación de C5a dependientes de VC. Siguiendo con este material, los efectos sobre C5 son cuantitativamente menores que el efecto sobre el depósito de C3. Esto puede ser explicado si, sobre el  $\text{InsP}_6$  cálcico, existe depósito de C3 que contribuye a la formación de la convertasa de C5, pero que no es detectado en las condiciones experimentales usadas, como ya fue propuesto. Para el material de origen humano, se observó que la generación de C5a no se vio modificada por la ausencia del  $\text{InsP}_6$  cálcico (Figura 22), contrastando hasta cierto punto con un aumento (si bien débil) observado en el depósito detectable de C3 en la misma condición (Figura 20C). Como se propuso antes para el material de origen de ratón, parece probable que la diferencia entre el

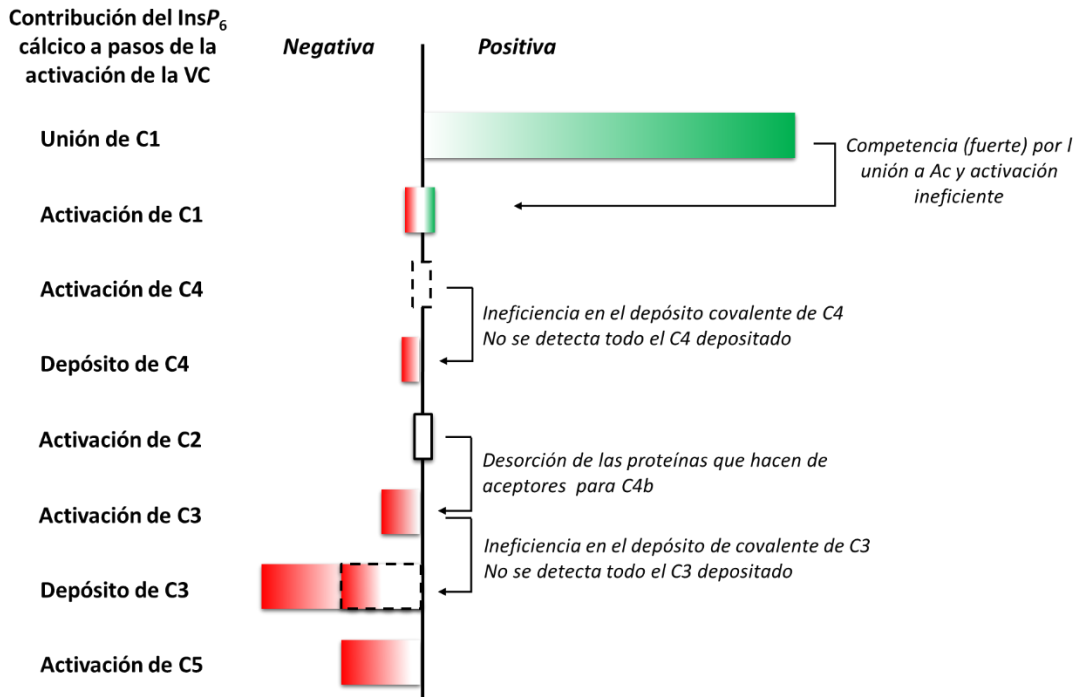
efecto del  $\text{InsP}_6$  cálcico sobre el depósito de C3 y la activación de C5 se deba a que no todo el C3 depositado en presencia de dicho compuesto es detectable. En otras palabras, en presencia de  $\text{InsP}_6$  cálcico la cantidad de depósito de C3 probablemente resulte subestimada, de modo que los efectos de este compuesto sobre el depósito de C3 total estén mejor reflejados en lo que se observa a nivel de activación de C5 que en los resultados de depósito “detectable” de C3.

#### **5.1.4 Modelo global propuesto para la interacción entre el $\text{InsP}_6$ cálcico y la VC, en ausencia de VA**

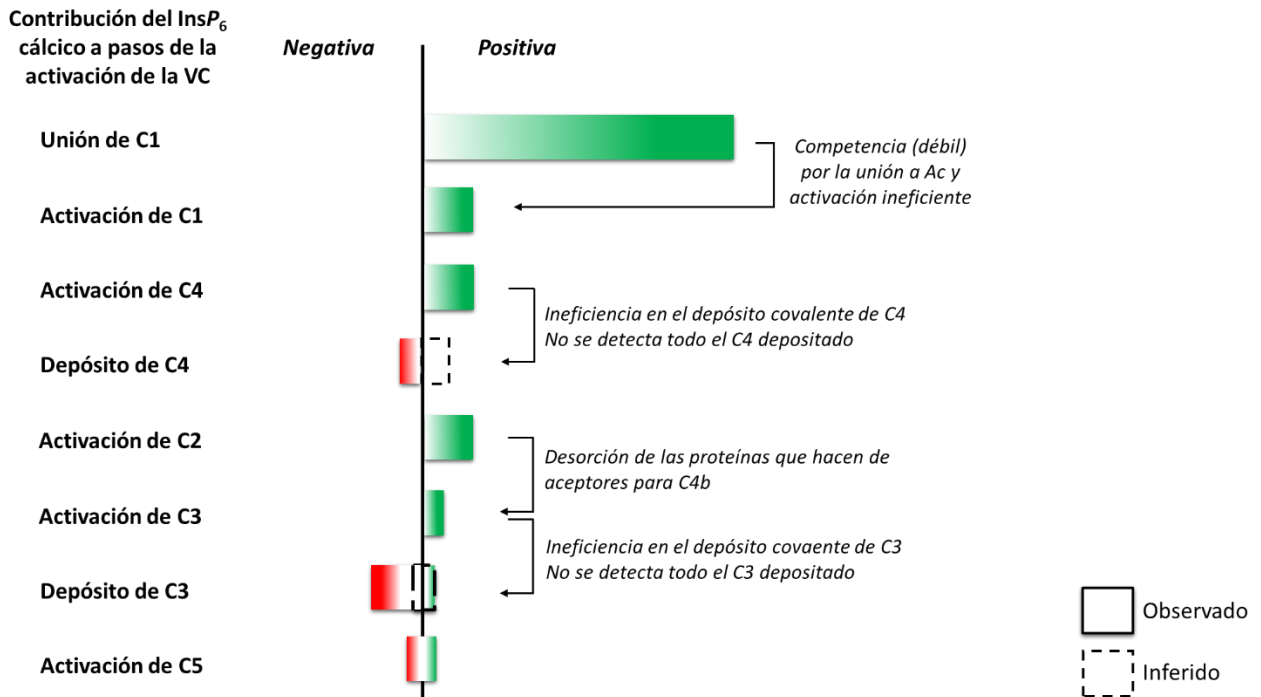
En la Figura 5.2 se resume un modelo que podría explicar los efectos del  $\text{InsP}_6$  cálcico a nivel de los distintos pasos de la activación de la VC, explicitando diferencias entre los materiales de CL de los dos orígenes empleados. Se destaca en el modelo la idea de iniciación de la VC sobre el  $\text{InsP}_6$  cálcico (compitiendo con la iniciación sobre los anticuerpos unidos a las mucinas), cuya propagación es ineficiente en varios pasos. Se proponen pasos ineficientes a nivel de activación del complejo C1 que resulta unido, a nivel de unión covalente de C4 y C3 activados, y quizás también a nivel de la permanencia de las convertasas sobre la superficie. La suma de estos pasos ineficientes determina que la capacidad global de generación de C5a, mediador que como se mencionó podría ser perjudicial para la hidátide, no se ve alterada por la presencia de los gránulos (en el sistema homólogo en particular). En otras palabras, el  $\text{InsP}_6$  cálcico no contribuye ni interfiere con la producción de C5a en el sistema homólogo, relevante, al menos a bajas concentraciones de complemento.



## CL de origen de ratón



## CL de origen de humano



La leyenda de la Figura 5.2 se muestra en la siguiente página.

**Figura 5.2. Modelo que intenta explicar las observaciones sobre influencia de los gránulos de  $\text{InsP}_6$  cálcico sobre los diferentes pasos de la activación de la VC sobre CL de origen de hospedero ratón y humano.** Los tamaños de las barras pretenden indicar intensidades de los efectos, pero son por supuesto arbitrarios. Las líneas punteadas representan variables deducidas, pero no medidas. Los efectos «no se detecta todo el C4 depositado» y «no se detecta todo el C3 depositado» obviamente afectan al depósito total de los componentes respectivos (deducido, y por lo tanto en línea punteada), y no al depósito observado de cada uno. Los detalles del modelo se explican el texto principal de la sección 5.1.

## **5.2 Interacción entre los gránulos de $\text{InsP}_6$ cálcico y el sistema complemento en presencia de VA y/o a concentraciones altas de complemento**

En comparación con el trabajo previo del grupo [76], en la presente Tesis se trabajó a diluciones de suero más altas, que por un lado son más relevantes biológicamente y por otro permiten eliminar los efectos de la VA. El cambio de concentración de suero hace que el signo del efecto del  $\text{InsP}_6$  cálcico sobre el depósito detectable de C3 sobre material de CL de origen de ratón cambie: es negativo para concentraciones bajas como ya se mencionó, y es neutro o positivo a concentraciones altas ([76]; datos no mostrados, obtenidos en el correr de esta Tesis). Las razones para ese cambio de signo podrían ser:

- i. Que a mayores concentraciones de suero, y por lo tanto de C1q, no exista competencia por este componente entre el  $\text{InsP}_6$  cálcico y los anticuerpos, de forma que la activación, aún ineficiente sobre los gránulos, sume a la activación total.
- ii. Que en condiciones de presencia de la VA, la VC iniciada sobre el  $\text{InsP}_6$  cálcico termine siendo amplificada en forma más eficiente, incluyendo una posible propagación a la red mucínica.
- iii. Un cambio en el sistema experimental debido a la mayor adsorción de proteínas séricas sobre las superficies de la CL durante el ensayo, conduciendo a que el  $\text{InsP}_6$  cálcico esté más cubierto de proteínas y por lo tanto resulte mejor como aceptador covalente de C3 y C4.
- iv. Un posible efecto directo positivo del  $\text{InsP}_6$  cálcico sobre la VA, por ejemplo por unión de properdina e iniciación de dicha vía, como ha sido propuesto para ADN expuesto por células necróticas y apoptóticas tardíos [84].

No se puede descartar la posibilidad que las posibles razones recién mencionadas actúen de forma combinada.

Para estudiar estas posibilidades, se podría:

- Analizar cómo es la activación de C1 y C2, y la eficiencia de depósito de C4 y C3, en ensayos con SH diluido 1:60 carente de C1q y reconstituido con concentraciones crecientes de este componente, en combinación con pre-tratamiento con EDTA de la CL.
- Analizar la activación de C3 y/o C5 sobre CL control y pre-tratada con EDTA, con SH a concentraciones medias y altas (1:10, 1:4) carente de factor B y reconstituido con el componente a la concentración fisiológica.
- Realizar experimentos en los que se pre-adsorba la CL con altas concentraciones de SH (a 4°C) o con una proteína irrelevante, y luego se la enfrente al complemento
- Estudiar la posible unión de properdina sobre los gránulos de *InsP<sub>6</sub>* cálcico.

En estos experimentos es importante incluir al sistema homólogo (anticuerpos humanos-complemento humano), que no ha sido analizado en condiciones de presencia de VA.

### **5.3 Significado biológico de los resultados obtenidos**

Si bien los resultados iniciales de esta Tesis parecían sugerir un posible mecanismo de evasión de la activación de la VC por la larva de *E. granulosus* a través del *InsP<sub>6</sub>* cálcico, esa idea no fue apoyada por los resultados tomados globalmente. En particular, no se observó un efecto negativo del *InsP<sub>6</sub>* cálcico sobre la activación de la VC en el sistema homólogo, relevante (CL de origen humano y complemento humano). De todos modos, no se puede descartar que en alguna condición o etapa de la infección ocurra el mecanismo de inhibición por competencia por unión de C1 descrito en este trabajo. Esta posibilidad depende seguramente del tipo, cantidad y distribución de anticuerpos presentes en la CL, los que durante el curso de la infección probablemente cambien. Es importante destacar que ni bien se comienza a formar la CL, aparecen depósitos granulares [7], asimilables al *InsP<sub>6</sub>* cálcico. Esto abre la posibilidad de un papel del mecanismo de competencia por C1q en las etapas muy iniciales de la infección, cuando presumiblemente la carga de anticuerpos sobre la CL es baja. La posibilidad de que

exista competencia efectiva por C1q depende además, crucialmente, de las concentraciones locales del componente. Dado que la síntesis de C1q, a diferencia de lo que ocurre para la mayoría de los componentes del SC, no es hepática sino que proviene de células del linaje monocítico [85], posiblemente el nivel de síntesis local pueda ser un factor a tener en cuenta. Pese a que no es probable que conlleve una inhibición de la VC, igualmente es muy llamativa la capacidad de los gránulos de unir grandes cantidades de C1q sin contribuir a la activación global del SC sobre la superficie (al menos concentraciones bajas de complemento). C1q es una molécula muy versátil, ya que participa en diversos procesos biológicos aparte de ser protagonista en la activación del SC. C1q posee propiedades inmuno-reguladoras sobre las dos ramas del sistema inmune. A nivel de la respuesta innata puede inducir la polarización de macrófagos hacia un fenotipo no inflamatorio, de tipo M2, así como puede limitar la activación del inflammasoma en macrófagos humanos [86]. Adicionalmente actúa como un cofactor para la proliferación de macrófagos peritoneales inducida por IL-4 (Judith E. Allen y Carlos Minutti, Universidad de Manchester y Universidad de Edimburgo, comunicación personal). Además puede afectar la maduración de las células dendríticas [87]. A nivel de la respuesta adaptativa, C1q se une en la superficie de linfocitos T al receptor para sus cabezas globulares, y actúa como una señal anti-proliferativa [88]. En suma, estas evidencias plantean la posibilidad de que quizás la importante retención de este componente sobre los gránulos de *InsP<sub>6</sub>* cálcico esté relacionado a una modulación de las células del sistema inmune presentes en la vecindad de la hidátide. C1q podría ser secuestrado por la hidátide, evitando de esta manera posibles efectos negativos para el parásito (por ejemplo la proliferación de macrófagos) desencadenados por la interacción de este componente con células del sistema inmune. Como posibilidad alternativa, la presentación multivalente de C1q sobre los gránulos de *InsP<sub>6</sub>* cálcico podría potenciar interacciones con células de la inmunidad favorables para el parásito, es decir de tipo anti-inflamatorio. C1q induce sus efectos sobre células del sistema inmune por interacciones tanto a través de su tallo de colágeno como a través de sus cabezas globulares [40]. La conclusión que el *InsP<sub>6</sub>* cálcico causa activación del complejo C1 implicaría que se une a C1q a través de las cabezas globulares, y por lo tanto serían los tallos de colágeno que estarían disponible para la interacción con receptores celulares. Sin embargo, este punto debe ser analizado experimentalmente, así como deben ser estudiados los posibles efectos sobre células del sistema inmune del C1q presentado sobre el *InsP<sub>6</sub>* cálcico.

## 6. Conclusiones

En la presente Tesis se demostró que hay activación de la VC sobre la CL. Esto fue evidenciado más claramente en términos de la activación de los componentes C2 y C5, resultados a los que se les suman los luego obtenidos por la estudiante de Tesina L. Grezzi con respecto a la activación de C1.

En este trabajo también se evidenció, si bien de manera indirecta, que además de los anticuerpos, el  $\text{InsP}_6$  cálcico es capaz de activar a la VC sobre la CL. Sin embargo, la gran capacidad de unión de C1q de este compuesto no se ve reflejada en un nivel acorde de activación de C1 y C2. Los resultados sugieren que sobre el  $\text{InsP}_6$  cálcico ocurre una activación de la VC que es ineficiente y que puede competir, al menos a concentraciones bajas de complemento, con la posibilidad de activación sobre los anticuerpos unidos a la red mucínica. Además se determinó que en presencia del  $\text{InsP}_6$  cálcico la continuación de la activación de la VC es menos eficiente que en su ausencia, probablemente en parte por menor eficiencia en los pasos de depósito covalente de C4 y C3, coherente con la falta de grupos capaces de reaccionar con el tioéster en el compuesto. La combinación de competencia por C1, e iniciación y amplificación ineficientes en los pasos posteriores hace que la presencia del  $\text{InsP}_6$  cálcico resulte irrelevante para la capacidad global de la CL de activar C5, en el sistema homólogo (CL de origen humano-complemento humano) y a concentraciones bajas de complemento.

## 7. Bibliografía

- [1] M. Nakao, A. Lavikainen, T. Yanagida, and A. Ito, "Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae)," *Int. J. Parasitol.*, vol. 43, no. 12–13, pp. 1017–1029, 2013.
- [2] M. A. Cucher *et al.*, "Cystic echinococcosis in South America: Systematic review of species and genotypes of *Echinococcus granulosus sensu lato* in humans and natural domestic hosts," *Trop. Med. Int. Heal.*, vol. 21, no. 2, pp. 166–175, 2015.
- [3] P. Moro and P. M. Schantz, "Echinococcosis: a review," *Int. J. Infect. Dis.*, vol. 13, no. 2, pp. 125–133, 2009.
- [4] E. Brunetti, P. Kern, and D. A. Vuitton, "Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans," *Acta Trop.*, vol. 114, no. 1, pp. 1–16, 2010.
- [5] H. J. McSorley and R. M. Maizels, "Helminth infections and host immune regulation," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 25, no. 4, pp. 585–608, 2012.
- [6] G. Bortoletti and G. Ferretti, "Aspects of fertile and sterile cysts of *Echinococcus granulosus* developed in host of different species," *Int. J. Parasitol.*, vol. 8, pp. 421–431, 1978.
- [7] A. Díaz, C. Casaravilla, J. E. Allen, R. B. Sim, and A. M. Ferreira, "Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* II: structure," *Trends Parasitol.*, vol. 27, no. 6, pp. 264–273, 2011.
- [8] M. Elissondo *et al.*, "In vitro and in vivo effects of flubendazole on *Echinococcus granulosus* metacestodes," *Parasitol. Res.*, vol. 100, no. 5, pp. 1003–1009, 2007.
- [9] Á. Díaz, C. Fernández, Á. Pittini, P. I. Seoane, J. E. Allen, and C. Casaravilla, "The laminated layer: Recent advances and insights into *Echinococcus* biology and evolution," *Exp. Parasitol.*, vol. 158, pp. 23–30, 2015.
- [10] C. Casaravilla and A. Díaz, "Studies on the structural mucins of the *Echinococcus granulosus* laminated layer," *Mol. Biochem. Parasitol.*, vol. 174, no. 2, pp. 132–136, 2010.
- [11] A. Díaz *et al.*, "The major surface carbohydrates of the *Echinococcus granulosus* cyst: Mucin-type O-glycans decorated by novel galactose-based structures," *Biochemistry*,

- vol. 48, no. 49, pp. 11678–11691, 2009.
- [12] G. Lin *et al.*, “Further structural characterization of the *Echinococcus granulosus* laminated layer carbohydrates: The blood-antigen P1-motif gives rise to branches at different points of the O-glycan chains,” *Glycobiology*, vol. 23, no. 4, pp. 438–452, 2013.
- [13] P. Gros, F. J. Milder, and B. J. C. Janssen, “Complement driven by conformational changes,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 8, no. 1, pp. 48–58, 2008.
- [14] J. Parkinson *et al.*, “A Transcriptomic Analysis of *Echinococcus granulosus* Larval Stages: Implications for Parasite Biology and Host Adaptation,” *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 6, no. 11, 2012.
- [15] I. Tsai, M. Zarowiecki, and N. Holroyd, “The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism,” *Nature*, vol. 496, no. 7443, pp. 57–63, 2013.
- [16] B. S. Szwegold, R. A. Graham, and T. R. Brown, “Observation of inositol pentakis- and hexakis-phosphates in mammalian tissues by <sup>31</sup>P NMR,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 149, no. 3, pp. 874–881, 1987.
- [17] D. Pittet, D. P. Lew, G. W. Mayr, A. Monod, and W. Schlegel, “Chemoattractant receptor promotion of Ca<sup>2+</sup> influx across the plasma membrane of HL-60 cells,” *J. Biol. Chem.*, vol. 264, pp. 7251–7261, 1989.
- [18] J. Torres *et al.*, “Solution behaviour of myo-inositol hexakisphosphate in the presence of multivalent cations. Prediction of a neutral pentamagnesium species under cytosolic/nuclear conditions,” *J. Inorg. Biochem.*, vol. 99, no. 3, pp. 828–840, 2005.
- [19] N. Veiga *et al.*, “The behaviour of myo-inositol hexakisphosphate in the presence of magnesium(II) and calcium(II): Protein-free soluble InsP6 is limited to 49 μM under cytosolic/nuclear conditions,” *J. Inorg. Biochem.*, vol. 100, no. 11, pp. 1800–1810, 2006.
- [20] M. S. Otegui, “Developing Seeds of *Arabidopsis* Store Different Minerals in Two Types of Vacuoles and in the Endoplasmic Reticulum,” *Plant Cell Online*, vol. 14, no. 6, pp. 1311–1327, 2002.
- [21] E. Lapan, “MAGNESIUM IN DISPERSAL DEPOSITS Dicyemid mesozoans are morphologically simple multicellular animals that seem to be related to the ciliate protozoans [ 11 . Several authors , beginning with van Beneden [ 2 ] and including Hyman [ 3 ], suggested that these,” *Exp. Cell Res.*, vol. 94, pp. 277–282, 1975.
- [22] S. B. Shears, “Assessing the omnipotence of inositol hexakisphosphate,” *Cell. Signal.*, vol. 13, no. 3, pp. 151–158, 2001.

- [23] A. W. Folkmann, T. R. Dawson, and S. R. Wentz, "Insights into mRNA export-linked molecular mechanisms of human disease through a Gle1 structure-function analysis," *Adv. Biol. Regul.*, vol. 54, no. 1, pp. 74–91, 2014.
- [24] M. S. C. Wilson, T. M. Livermore, and A. Saiardi, "Inositol pyrophosphates: between signalling and metabolism.," *Biochem. J.*, vol. 452, no. 3, pp. 369–79, 2013.
- [25] C. Casaravilla *et al.*, "Characterization of myo-inositol hexakisphosphate deposits from larval *Echinococcus granulosus*," *FEBS J.*, vol. 273, no. 14, pp. 3192–3203, 2006.
- [26] F. Irigoín, C. Casaravilla, F. Iborra, R. B. Sim, F. Ferreira, and A. Díaz, "Unique precipitation and exocytosis of a calcium salt of myo-inositol hexakisphosphate in larval *Echinococcus granulosus*," *J. Cell. Biochem.*, vol. 93, no. 6, pp. 1272–1281, 2004.
- [27] A. Díaz, C. Casaravilla, J. E. Allen, R. B. Sim, and A. M. Ferreira, "Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* II: Immunology," *Trends Parasitol.*, vol. 27, no. 6, pp. 264–273, 2011.
- [28] C. Casaravilla *et al.*, "Unconventional maturation of dendritic cells induced by particles from the laminated layer of larval *Echinococcus granulosus*," *Infect. Immun.*, vol. 82, no. 8, pp. 3164–3176, 2014.
- [29] I. Soufli *et al.*, "Crude extract of hydatid laminated layer from *Echinococcus granulosus* cyst attenuates mucosal intestinal damage and inflammatory responses in Dextran Sulfate Sodium induced colitis in mice," *J Inflamm*, vol. 12, p. 19, 2015.
- [30] E. A. Coltorti and V. M. Varela-Diaz, "Penetration of host IgG molecules into hydatid cysts," *Zeitschrift fur Parasitenkd.*, vol. 48, no. 1, pp. 47–51, 1975.
- [31] D. Ricklin, G. Hajishengallis, K. Yang, and J. D. Lambris, "Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis.," *Nat. Immunol.*, vol. 11, no. 9, pp. 785–97, 2010.
- [32] S. Freeley, C. Kemper, and G. Le Fré, "The ins and outs of complement-driven immune responses," *Immunol. Rev.*, vol. 274, no. 1, pp. 16–32, 2016.
- [33] K. Murphy, *Janeway's Immunology Biology*, 8th Editio. 2012.
- [34] A. Dodds and R. Sim, *Complement A practical approach*. Oxford University, 1997.
- [35] U. Kishore *et al.*, "Structural and functional anatomy of the globular domain of complement C1q," *Immunol. Lett.*, vol. 257, no. 5, pp. 2432–2437, 2005.
- [36] C. A. Diebolder *et al.*, "Complement Is Activated by IgG Hexamers Assembled at the Cell Surface," *Science (80-. )*, vol. 343, no. 6176, pp. 1260–1263, 2014.



- [37] C. Farrera and B. Fadeel, "Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process," *J Immunol*, vol. 191, no. 5, pp. 2647–2656, 2013.
- [38] V. Garlatti *et al.*, "Cutting edge: C1q binds deoxyribose and heparan sulfate through neighboring sites of its recognition domain.," *J. Immunol.*, vol. 185, no. 2, pp. 808–12, 2010.
- [39] C. Gaboriaud, W. L. Ling, N. M. Thielens, I. Bally, and V. Rossi, "Deciphering the fine details of C1 assembly and activation mechanisms: 'Mission impossible'?", *Front. Immunol.*, vol. 5, no. NOV, pp. 3–9, 2014.
- [40] L. Kouser *et al.*, "Emerging and novel functions of complement protein C1q," *Front. Immunol.*, vol. 6, no. JUN, 2015.
- [41] H. Paidassi *et al.*, "Cell Recognition a Multiligand-Bridging Molecule in Apoptotic C1q Binds Phosphatidylserine and Likely Acts as C1q Binds Phosphatidylserine and Likely Acts as a Multiligand-Bridging Molecule in Apoptotic Cell Recognition 1," *J Immunol*, vol. 180, pp. 2329–2338, 2008.
- [42] S. K. Law and a W. Dodds, "The internal thioester and the covalent binding properties of the complement proteins C3 and C4.," *Protein Sci.*, vol. 6, no. 2, pp. 263–274, 1997.
- [43] A. Sepp, A. W. Dodds, M. J. Anderson, R. Duncan Campbell, A. C. Willis, and S. K. Alex Law, "Covalent binding properties of the human complement protein C4 and hydrolysis rate of the internal thioester upon activation," *Protein Sci.*, vol. 2, no. 5, pp. 706–716, 1993.
- [44] F. Poppelaars *et al.*, "New insight into the effects of heparinoids on complement inhibition by C1-inhibitor," *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 184, no. 3, pp. 378–388, 2016.
- [45] L. C. Wijeyewickrema *et al.*, "Polyphosphate is a novel cofactor for regulation of complement by the serpin, C1-inhibitor.," *Blood*, vol. 128, no. 13, p. blood-2016-02-699561, 2016.
- [46] L. Beinrohr, V. Harmat, J. Dobó, Z. Lőrincz, P. Gál, and P. Závodszky, "C1 inhibitor serpin domain structure reveals the likely mechanism of heparin potentiation and conformational disease," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 29, pp. 21100–21109, 2007.
- [47] C. Q. Schmidt, J. D. Lambris, and D. Ricklin, "Protection of host cells by complement regulators," *Immunol. Rev.*, vol. 274, no. 1, pp. 152–171, 2016.
- [48] U. Kishore and R. B. Sim, "Factor H as a regulator of the classical pathway activation," *Immunobiology*, vol. 217, no. 2, pp. 162–168, 2012.

- [49] C. Spoerry, P. Hesse, M. J. Lewis, L. Paton, J. M. Woof, and U. Von Pawel-Rammingen, "Novel IgG-degrading enzymes of the IgdE protease family link substrate specificity to host tropism of streptococcus species," *PLoS One*, vol. 11, no. 10, pp. 1–20, 2016.
- [50] G. J. Silverman, C. S. Goodyear, and D. L. Siegel, "On the mechanism of staphylococcal protein A immunomodulation," *Transfusion*, vol. 45, no. 2, pp. 274–280, 2005.
- [51] E. J. Smith, L. Visai, S. W. Kerrigan, P. Speziale, and T. J. Foster, "The Sbi protein is a multifunctional immune evasion factor of *Staphylococcus aureus*," *Infect. Immun.*, vol. 79, no. 9, pp. 3801–3809, 2011.
- [52] L. Björck and G. Kronvall, "Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent.," *J. Immunol.*, vol. 133, no. 2, pp. 969–974, 1984.
- [53] R. Sun *et al.*, "Trichinella spiralis Paramyosin Binds Human Complement C1q and Inhibits Classical Complement Activation," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 9, no. 12, pp. 1–14, 2015.
- [54] J. P. Lacleste *et al.*, "Paramyosin inhibits complement C1 Information about subscribing to The Journal of Immunology is PARAMYOSIN INHIBITS COMPLEMENT," 2010.
- [55] V. Ferreira *et al.*, "The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from *Trypanosoma cruzi*," *J. Immunol.*, vol. 172, no. 5, pp. 3042–50, 2004.
- [56] M. Kang *et al.*, "Collagen-binding microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule (MSCRAMM) of gram-positive bacteria inhibit complement activation via the classical pathway," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 28, pp. 20520–20531, 2013.
- [57] P. S. Hair *et al.*, "Human astrovirus coat protein binds C1q and MBL and inhibits the classical and lectin pathways of complement activation," *Mol. Immunol.*, vol. 47, no. 4, pp. 792–798, 2010.
- [58] C. P. Ooi, L. R. Haines, D. M. Southern, M. J. Lehane, and A. Acosta-Serrano, "Tsetse GmmSRPN10 Has Anti-complement Activity and Is Important for Successful Establishment of Trypanosome Infections in the Fly Midgut," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 9, no. 1, 2015.
- [59] J. Behnsen *et al.*, "Secreted *Aspergillus fumigatus* protease Alp1 degrades human complement proteins C3, C4, and C5," *Infect. Immun.*, vol. 78, no. 8, pp. 3585–3594, 2010.
- [60] J. M. Inal and R. B. Sim, "A *Schistosoma* protein, Sh-TOR, is a novel inhibitor of

- complement which binds human C2," *FEBS Lett.*, vol. 470, no. 2, pp. 131–134, 2000.
- [61] S. Grosskinsky, M. Schott, C. Brenner, S. J. Cutler, M. M. Simon, and R. Wallich, "Human complement regulators C4b-binding protein and C1 esterase inhibitor interact with a novel outer surface protein of *Borrelia recurrentis*," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 4, no. 6, pp. 1–12, 2010.
- [62] L. A. Lewis, W. M. Shafer, T. D. Ray, S. Ram, and P. A. Rice, "Phosphoethanolamine residues on the lipid moiety of *Neisseria gonorrhoeae* lipooligosaccharide modulate binding of complement inhibitors and resistance to complement killing," *Infect. Immun.*, vol. 81, no. 1, pp. 33–42, 2013.
- [63] D. K. Ho, M. Skurnik, A. M. Blom, and S. Meri, "Yersinia pestis Ail recruitment of C4b-binding protein leads to factor I-mediated inactivation of covalently and noncovalently bound C4b," *Eur. J. Immunol.*, vol. 44, no. 3, pp. 742–751, 2014.
- [64] A. S. Barbosa *et al.*, "Immune evasion of *Leptospira* species by acquisition of human complement regulator C4BP," *Infect. Immun.*, vol. 77, no. 3, pp. 1137–1143, 2009.
- [65] M. H. McGavin, D. Krajewska-Pietrasik, C. Ryden, and M. Hook, "Identification of a *Staphylococcus aureus* extracellular matrix-binding protein with broad specificity," *Infect. Immun.*, vol. 61, no. 6, pp. 2479–2485, 1993.
- [66] G. Pietrocola, S. Rindi, R. Rosini, S. Buccato, P. Speziale, and I. Margarit, "The Group B *Streptococcus*-Secreted Protein CIP Interacts with C4, Preventing C3b Deposition via the Lectin and Classical Complement Pathways," *J. Immunol.*, vol. 196, no. 1, pp. 385–94, 2016.
- [67] V. Agarwal, M. Sroka, M. Fulde, S. Bergmann, K. Riesbeck, and A. M. Blom, "Binding of *Streptococcus pneumoniae* endopeptidase O (PepO) to complement component C1q modulates the complement attack and promotes host cell adherence," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 22, pp. 15833–15844, 2014.
- [68] M. Honda-Ogawa *et al.*, "Cysteine proteinase from *Streptococcus pyogenes* enables evasion of innate immunity via degradation of complement factors," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 22, pp. 15854–15864, 2013.
- [69] A. Diaz, A. Ferreira, and R. B. Sim, "Complement evasion by *Echinococcus granulosus*: sequestration of host factor H in the hydatid cyst wall," *J. Immunol.*, vol. 158, no. 8, pp. 3779–3786, 1997.
- [70] R. Parente, S. J. Clark, A. Inforzato, and A. J. Day, "Complement factor H in host defense

- and immune evasion," *Cell. Mol. Life Sci.*, 2016.
- [71] B. V Geisbrecht Brandon L Garcia, S. A. Zwarthoff, S. H. M, B. L. Garcia, S. H. M Rooijackers, and B. V Geisbrecht, "Complement Pathway Novel Evasion Mechanisms of the Classical Novel Evasion Mechanisms of the Classical Complement Pathway," *J Immunol Ref.*, vol. 1976, pp. 2051–2060, 2016.
- [72] A. M. Ferreira, F. Irigoín, M. Breijo, R. B. Sim, and A. Díaz, "How Echinococcus granulosus deals with complement," *Parasitol. Today*, vol. 16, no. 4, pp. 7387–7390, 2000.
- [73] M. Breijo, G. Anesetti, L. Martínez, R. B. Sim, and A. M. Ferreira, "Echinococcus granulosus: The establishment of the metacestode is associated with control of complement-mediated early inflammation," *Exp. Parasitol.*, vol. 118, no. 2, pp. 188–196, 2008.
- [74] A. M. Ferreira, M. Breijo, R. B. Sim, and A. Nieto, "Contribution of C5-mediated mechanisms to host defence against Echinococcus granulosus hydatid infection," *Parasite Immunol.*, vol. 22, no. 9, pp. 445–453, 2000.
- [75] F. Irigoín, R. Wurzner, R. B. Sim, and A. M. Ferreira, "Comparison of complement activation in vitro by different Echinococcus granulosus extracts," *Parasite Immunol*, vol. 18, no. 7, pp. 371–375, 1996.
- [76] F. Irigoín, A. Laich, A. M. Ferreira, C. Fernández, R. B. Sim, and A. Díaz, "Resistance of the Echinococcus granulosus cyst wall to complement activation: Analysis of the role of InsP6 deposits," *Parasite Immunol.*, vol. 30, no. 6–7, pp. 354–364, 2008.
- [77] P. I. Seoane, *Generación de herramientas para el estudio del reclutamiento del factor H del complemento a la capa laminar de Echinococcus granulosus Paula Seoane Tutor : Dr . Álvaro Díaz Licenciatura en Bioquímica Facultad de Ciencias.* 2012.
- [78] V. M. Varela-Díaz and E. A. Coltorti, "The presence of host immunoglobulins in hydatid cyst membranes," *J Parasitol*, vol. 59, no. 3, pp. 484–488, 1973.
- [79] A. Díaz, F. Irigoín, F. Ferreira, and R. B. Sim, "Control of host complement activation by the Echinococcus granulosus hydatid cyst," *Immunopharmacology*, vol. 42, no. 1–3, pp. 91–98, 1999.
- [80] G. Mourglia-Ettlin, J. M. Marqués, J. A. Chabalgoity, and S. Dematteis, "Early peritoneal immune response during echinococcus granulosus establishment displays a biphasic behavior," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 5, no. 8, pp. 1–11, 2011.
- [81] U. K. (1970): Laemmli, "Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of

- Bacteriophage-T4," *Nature*, vol. 227, pp. 680–685, 1970.
- [82] J. L. Dangl, T. G. Wensel, S. L. Morrison, L. Stryer, L. a Herzenberg, and V. T. Oi, "Segmental flexibility and complement fixation of genetically engineered chimeric human, rabbit and mouse antibodies.," *EMBO J.*, vol. 7, no. 7, pp. 1989–1994, 1988.
- [83] N. A. Daha *et al.*, "Complement activation by (auto-) antibodies," *Mol. Immunol.*, vol. 48, no. 14, pp. 1656–1665, 2011.
- [84] W. Xu *et al.*, "Properdin Binds to Late Apoptotic and Necrotic Cells Independently of C3b and Regulates Alternative Pathway Complement Activation," *J. Immunol.*, vol. 180, no. 11, pp. 7613–7621, 2008.
- [85] G. Castellano *et al.*, "Maturation of dendritic cells abrogates C1q production in vivo and in vitro," *Production*, vol. 103, no. 10, pp. 3813–3820, 2004.
- [86] M. E. Benoit, E. V Clarke, P. Morgado, D. A. Fraser, and A. J. Tenner, "Complement protein C1q directs macrophage polarization and limits inflammasome activity during the uptake of apoptotic cells.," *J. Immunol.*, vol. 188, no. 11, pp. 5682–5693, 2012.
- [87] K. K. Hosszu, F. Santiago-Schwarz, E. I. B. Peerschke, and B. Ghebrehiwet, "Evidence that a C1q/C1qR system regulates monocyte-derived dendritic cell differentiation at the interface of innate and acquired immunity.," *Innate Immun.*, vol. 16, no. 2, pp. 115–27, 2010.
- [88] A. Chen, S. Gaddipati, Y. Hong, D. J. Volkman, E. I. Peerschke, and B. Ghebrehiwet, "Human T cells express specific binding sites for C1q. Role in T cell activation and proliferation.," *J. Immunol.*, vol. 153, no. 4, pp. 1430–40, 1994.

