

Tesina de Licenciatura en Bioquímica

Estudio de la activación del componente C1 del complemento sobre la capa laminar de *Echinococcus granulosus*.



Leticia Grezzi Santangelo

Tutor: Dr. Álvaro Díaz

Co-tutora: Mag. Anabella Barrios

Facultad de Ciencias

Julio 2017

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a Ana y Valeria, mis docentes del curso de Inmunología, que confiaron en mí y que dieron el puntapié inicial para que pueda ser parte de este equipo de trabajo.

Muy especialmente quiero agradecer a mi tutor Álvaro Díaz por permitirme ser parte de la “casita del medio”, por apoyarme a lo largo de este camino, por la dedicación, por las charlas interminables, por las críticas constructivas y por los consejos. También agradecer a mi co-tutora Anabella Barrios por la paciencia, la dedicación y la disposición a enseñarme hasta los más mínimos detalles, por la escucha y el apoyo. Por siempre confiar en mí. Sobre todo, por el hermoso vínculo que hemos generado.

Asimismo, quiero agradecer infinitamente a toda la Cátedra de Inmunología, especialmente a toda la “casita del medio”. Gracias por integrarme con todo el amor con el que lo hicieron, por apoyarme, por ayudarme. Sobre todo, por hacerme sentir tan cómoda con ustedes, que nos les interesa la competencia, y ayudar y compartir está siempre por encima de todo. Creo que somos un grupo maravilloso, como pocos.

Por supuesto, quiero agradecer inmensamente a Marcelo, mi compañero de vida, por apoyarme en esta locura de ser científica, por todo el esfuerzo y sacrificio que hace con gusto día a día para que yo pueda dedicarme de lleno a estudiar. A mi familia, incondicionales, que siempre me apoyaron en los triunfos y las alegrías que me trajo esta carrera, pero también en los fracasos y desilusiones, y en el momento más difícil que fue cuando las dudas casi me hacen abandonar los estudios. Lo mismo para mis amigos, pilares de mi vida, que supieron entender siempre las horas de estudio interminables, las noches sin dormir, la pasión por la ciencia.

Gracias a todos y cada uno de ustedes: lo logré!!!.

Resumen

El estadio larvario de *Echinococcus granulosus* es causante de la enfermedad conocida como equinococosis quística o hidatidosis. Esta enfermedad se caracteriza por el crecimiento dentro del parénquima de órganos internos (principalmente hígado y pulmón) de los hospederos, de una estructura larvaria unilocular, denominada hidátide. Esta estructura se encuentra definida por una pared formada por una capa interna celular (capa germinativa) y una capa externa, acelular, denominada capa laminar (CL). Esta última es una malla mucínica en cuyo interior se encuentran abundantes depósitos de una sal de *myo*-inositol hexakisfosfato (InsP_6) cálcico, que son centrales al presente trabajo. La capa laminar parece contribuir significativamente a la inducción de una respuesta no inflamatoria, hipótesis apoyada por la coincidencia en el tiempo entre la aparición de la CL y la resolución de la inflamación, lo que incluye el control de la activación del sistema complemento.

En este contexto, se destaca que la CL resulta opsonizada por anticuerpos, los cuales podrían dar inicio a la activación de la vía clásica del complemento. Por otro lado, el InsP_6 cálcico purificado es capaz de unir cantidades importantes de C1q (componente de reconocimiento del complejo C1, que da inicio a la activación de la vía clásica) proveniente de suero humano. Los efectos biológicos de esta interacción no se conocían.

En el presente trabajo se analizó si la unión entre el InsP_6 cálcico y el complejo C1 puede darse en el contexto de la CL, y si dicha unión conlleva la activación del complemento por la vía clásica (VC).

Los resultados obtenidos muestran en primer lugar que efectivamente la CL es capaz de unir grandes cantidades de C1 (determinado por medida de los tres componentes del complejo: C1q, C1r y C1s), y que esta unión se da mayoritariamente sobre el InsP_6 cálcico. En segundo lugar, muestran que la CL es capaz de activar a la VC en parte en forma independiente del InsP_6 cálcico, o sea presumiblemente a través de anticuerpos específicos unidos, pero también en menor medida a través del InsP_6 cálcico. En tercer lugar, los resultados muestran que la activación de C1 sobre el InsP_6 cálcico es débil en relación a las cantidades del complejo que ese compuesto es capaz de unir. Esto podría explicarse si el InsP_6 cálcico, en forma similar a lo reportado para otros polianiones, se une a C1q en una modalidad que no favorece la activación eficiente del complejo. Esto, junto con la probable competencia por parte del InsP_6

cálcico con la unión y activación de C1 sobre los anticuerpos, permitiría explicar porqué el InsP_6 cálcico en el contexto de la CL hace un aporte débil o nulo a la activación del complejo. Si bien en este trabajo no se obtuvo evidencia que la unión de C1 al InsP_6 cálcico disminuyera la capacidad global de la CL de activar la VC, como se esperaría si la competencia impidiera totalmente o casi la unión de C1 a los anticuerpos, un mecanismo de inhibición por competencia no puede descartarse. Este potencial mecanismo podría afectar, en alguna etapa de la infección y bajo ciertas circunstancias, a la capacidad de activar la VC de los anticuerpos unidos a la CL, o con mayor probabilidad y relevancia biológica, a aquellos unidos a las células de la capa germinativa. Además, considerando la cantidad de funciones inmunoregulatoras que posee C1q, no puede descartarse que el secuestro de C1, y en particular de C1q, sobre los gránulos de InsP_6 cálcico, a través de impedir la interacción de dicha proteína con células del sistema inmune, colabore con el mantenimiento de un contexto antiinflamatorio en la vecindad del parásito.

Lista de abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

Arg: arginina

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

BSA: seroalbúmina bovina (inglés, *Bovine Serum Albumin*)

C1-INH: inhibidor de C1

C3bBb: convertasa de C3 de la vía alternativa

C4b2a: convertasa de C3 de la vía clásica y de la vía de las lectinas

CCP: proteína de control del complemento (del inglés, *Complement Control Protein*)

CG: capa germinativa

CL: capa laminar

CUB: del inglés, *C1r/C1s sea urchin uEGF and bone morphogenetic protein-1*

DAMPs: patrones moleculares asociados al daño celular (del inglés, *Damage Associated Molecular Pattern*)

DTT: ditioneitol

E: Echinococcus

EDTA: ácido etilendiaminetetraacético (del inglés, *Ethylenediaminetetraacetic Acid*)

EGF: factor de crecimiento epidérmico (del inglés, *Epidermal Growth Factor*)

Fc: región constante de inmunoglobulinas

Gal: galactosa

GalNac: N-acetilgalactosamina

GlcNac: N-acetilglucosamina

GPI: glicofosfatidil inositol (del inglés, *Glycophosphatidyl Inositol*)

Ile: isoleucina

LPS: lipopolisacárido

NMR: resonancia magnética nuclear (del inglés, Nuclear Magnetic Resonance)

IgG: inmunoglobulina de clase G

IgM: inmunoglobulina de clase G

IL-4: interleuquina 4

InsP₆: *myo*-inositol hexakisfosfato

kDa: kilodalton

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)

PBS: amortiguador fosfato salino (del inglés, Phosphate-Buffered Saline)

PRR: receptor de reconocimiento de patrones (del inglés, *Pattern Recognition Receptor*)

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

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, Tricloroacetic Acid)

VA: vía alternativa

VBS: tampón veronal salino (del inglés, Veronal Buffer Saline)

VC: vía clásica

VL: vía de las lectinas

Índice de contenidos

Agradecimientos	i
Resumen	ii
Lista de abreviaturas	iv
1. Introducción	1
1.1. Helmintiasis	1
1.2. Generalidades sobre <i>Echinococcus granulosus</i>	1
1.3. Estructura del quiste hidático	4
1.3.1. Estructura de la capa laminar	5
1.3.1.1. Mucinas	6
1.3.1.2. <i>Myo</i> -inositol hexakifosfato cálcico	7
1.4. La capa laminar y la respuesta inmune	9
1.5. El sistema complemento, con énfasis en la vía clásica	10
1.5.1. Activación del sistema complemento	12
1.5.1.1. Vía clásica	12
1.5.1.2. Vía de las lectinas	16
1.5.1.3. Vía alternativa	17
1.5.1.4. Activación de los componentes tardíos del sistema complemento	18
1.5.2. Regulación del inicio de la activación del complemento por la vía clásica	19
1.6. La capa laminar y el sistema complemento, con énfasis en la vía clásica	21

2. Objetivos	23
2.1. Objetivo general	23
2.2. Objetivos específicos	23
3. Materiales y Métodos	24
3.1. Materiales de trabajo	24
3.1.1. Suspensión de partículas de la CL proveniente de infección experimental en ratón y de infección natural en humano	24
3.1.2. Modificaciones realizadas al material de CL	25
3.1.2.1. Extracción con tampón conteniendo el agente quelante EDTA: eliminación selectiva de los gránulos de $InsP_6$ cálcico de la CL	25
3.1.2.2. Proteólisis inespecífica con la preparación proteolítica pronasa: Eliminación de anticuerpos del hospedero de la CL	26
3.1.2.3. Combinación de extracción con EDTA y proteólisis	27
3.1.2.4. Eliminación selectiva de los gránulos de $InsP_6$ cálcico de la CL con el agente quelante EDTA y posterior reconstitución de la CL con $InsP_6$ cálcico purificado	27
3.1.3. Obtención de $InsP_6$ cálcico purificado a partir de la CL	27
3.1.4. Obtención de suero humano normal (SHN)	27
3.2. Técnicas generales	28
3.2.1. Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA)	28
3.2.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	28
3.2.3. Transferencia húmeda a membranas de fluoruro de polivinidileno (PVDF)	28

3.2.4. Western Blots	29
3.3. Estrategia experimental	30
3.3.1. Estudios de unión de C1q sobre CL y sobre $InsP_6$ cálcico purificado	31
3.3.2. Estudios de unión y activación del complejo C1, en condiciones de ausencia funcional de C1-INH	31
3.3.3. Estudios de unión y activación del complejo C1 y del componente C2, en condiciones de presencia de C1-INH	33
3.4. Procesamiento de los datos obtenidos	33
3.4.1. Procesamiento de los datos de densitometría de Western Blot para la unión del complejo C1	33
3.4.2. Procesamiento de los datos de densitometría de Western Blot para activación de C1r y C1s, en condiciones de ausencia funcional de C1-INH	34
3.4.3. Procesamiento de los datos de densitometría de Western Blot para activación de C1r y C1s, en condiciones de presencia funcional de C1-INH	34
3.4.4. Procesamiento de los datos de densitometría de Western Blot para activación del componente C2	35
4. Resultados	36
4.1. Ensayos con material hidático de origen de ratón	36
4.1.1. Efecto de los gránulos de $InsP_6$ cálcico sobre el inicio de la activación de la VC, en condiciones de ausencia de C1-INH	36
4.1.2. Efecto de los gránulos de $InsP_6$ cálcico sobre el inicio de la activación de la VC, en condiciones de presencia de C1-INH	42
4.2. Ensayos con material hidático de origen humano	45

4.2.1. Efecto de los gránulos de InsP_6 cálcico sobre la activación de la VC, en condiciones de presencia de C1-INH	45
5. Discusión	48
5.1. Influencia de los gránulos de InsP_6 cálcico en el inicio de la VC	48
5.1.1. Unión del complejo C1	48
5.1.2. Activación del complejo C1, en ausencia de C1-INH	49
5.1.3. Activación del complejo C1, en presencia de C1-INH	50
5.2. Significado biológico de los resultados obtenidos	51
6. Conclusiones	53
7. Bibliografía	54

1.Introducción

1.1. Helmintiasis

Los parásitos helmintos infectan aproximadamente a la tercera parte de la población mundial, principalmente en regiones tropicales, generando diversas patologías conocidas como “helmintiasis”. Estas enfermedades suelen presentar una gran proporción de casos relativamente asintomáticos, acompañado de un pequeño grupo que desarrolla patologías severas. El mantenimiento de este estado asintomático se reconoce como reflejo de un contexto inmunorregulador que podría ser promovido por el propio parásito.

Las regiones donde estos parásitos son habituales o endémicos se asocian con una prevalencia mucho más baja de alergias y enfermedades autoinmunes, lo que sugiere que las infecciones helmínticas protegen contra esas inmunopatologías.

Por otro lado, la erradicación de las enfermedades causadas por estos parásitos sigue estando distante debido a la falta de vacunas y fármacos eficaces, y a la rápida reinfección en zonas donde la transmisión no puede ser controlada. Por tanto, es necesario generar nuevas estrategias de intervención que subyacen en la comprensión de las bases inmunológicas que permiten a estos parásitos generar infecciones con extraordinaria prevalencia [1][2].

1.2. Generalidades sobre *Echinococcus granulosus*

El género *Echinococcus* pertenece al filo platelmintos, a la clase cestode y a la familia *taeniidae* [3]. Este género abarca un grupo de endoparásitos con ciclos de vida complejos o heteroxenos, dependientes de la asociación predador-presa entre dos mamíferos: los carnívoros (canídeos y félidos), que son hospederos definitivos para las tenias adultas, y sus presas herbívoras (ungulados, roedores y lagomorfos), que sirven como hospederos intermediarios para los estadios larvarios [4].

El avance en las técnicas de biología molecular, más específicamente el análisis filogenético mitocondrial, ha permitido en la actualidad reconocer nueve especies distintas dentro del género *Echinococcus*: *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. vogeli*, *E. oligarthrus*, *E. equinus*, *E. ortleppi*, *E. shiquicus*, *E. canadensis* y *E. felidis*. Anteriormente se reconocían 10 genotipos

(G1-G10) distintos dentro de este género. En este contexto, *E. equinus*, *E. ortleppi* y *E. canadensis* se consideraban cepas dentro de la especie *E. granulosus*. Actualmente estas cuatro especies se denominan en conjunto como *E. granulosus sensu lato*. Continuando con la correspondencia entre la clasificación anterior y la clasificación actual, los genotipos G1-G3 (cepas de oveja y de bovino, respectivamente) corresponden a la especie *E. granulosus sensu stricto*, el genotipo G4 (cepa de caballo) a la especie *E. equinus*, el genotipo G5 (cepa de bovino) a la especie *E. ortleppi* y los genotipos G6-G10 (cepas de camello y cabra, cerdo y cérvido, respectivamente) corresponden a la especie *E. canadensis* [3][4][5][6].

Los estadios larvarios de las especies agrupadas como *E. granulosus sensu lato* son causantes de la enfermedad conocida como equinococosis quística o hidatidosis, que afecta tanto a ungulados domésticos como salvajes y, en forma accidental, también al ser humano. Esta es una zoonosis parasitaria crónica, asociada a la pobreza y las malas prácticas de higiene, principalmente en las comunidades ganaderas [5]. Esta zoonosis es considerada hiperendémica en América del Sur, principalmente en Argentina, el sur de Brasil, Uruguay, Chile y regiones montañosas de Perú y Bolivia, pero también afecta al litoral Mediterráneo, al sur y centro de la antigua Unión Soviética, Asia central, China, Australia y África [6][7][8]. Tanto en Uruguay como en Argentina (países con gran actividad ganadera) la mayoría de las infecciones de ganado, así como también del ser humano, son causadas por *E. granulosus sensu stricto* [5].

El ciclo de vida de *E. granulosus sensu lato* se esquematiza en la *Figura 1.1*. Como se mencionó previamente, es un parásito heteroxeno, es decir que requiere dos especies diferentes para completar su ciclo de vida. El estadio adulto (3-6 mm de largo) reside en el intestino delgado del hospedero definitivo (cánidos, principalmente perros). Los huevos maduros contenidos en las proglótides grávidas son liberados al medio externo a través de las heces del animal. Los huevos embrionados son ingeridos por los hospederos intermediarios (normalmente ovejas, cabras, cerdo, ganado, caballos, camello y accidentalmente el ser humano) y una vez llegados al intestino delgado, eclosionan liberando al embrión hexacanto (oncosfera). Las oncosferas penetran la pared intestinal y migran, a través del sistema circulatorio, hacia varios órganos, principalmente hígado y pulmones, en donde se desarrollan a larvas llamadas hidátides. Estas hidátides crecen gradualmente produciendo protoscólices y, en algunos casos, hidátides hijas. Los protoscólices presentan una sorprendente versatilidad en cuanto a su diferenciación: i) si son ingeridos por el hospedero definitivo (con las vísceras infectadas

del hospedero intermediario), evaginan, se adhieren a la mucosa intestinal y se desarrollan a gusanos adultos en un lapso de 32-80 días, o ii) si se liberan en el medio interno del hospedero intermediario, por ruptura de una hidátide fértil, se desarrollan en forma reversa a nuevas hidátides, proceso que se conoce como infección secundaria [6].

Como se mencionó previamente, el ser humano es un hospedero intermediario accidental, que podría infectarse por el contacto fecal-oral con hospederos definitivos o al ingerir agua o vegetales contaminados [6][9]. La infección provoca, a largo plazo, falla de los órganos por compresión debido al crecimiento de la hidátide. Asimismo, existen complicaciones como la ruptura de la hidátide con el riesgo de generar reacciones alérgicas que van desde anafilaxis leve a fatal o infecciones secundarias, ya sea bacterianas o fúngicas [10].

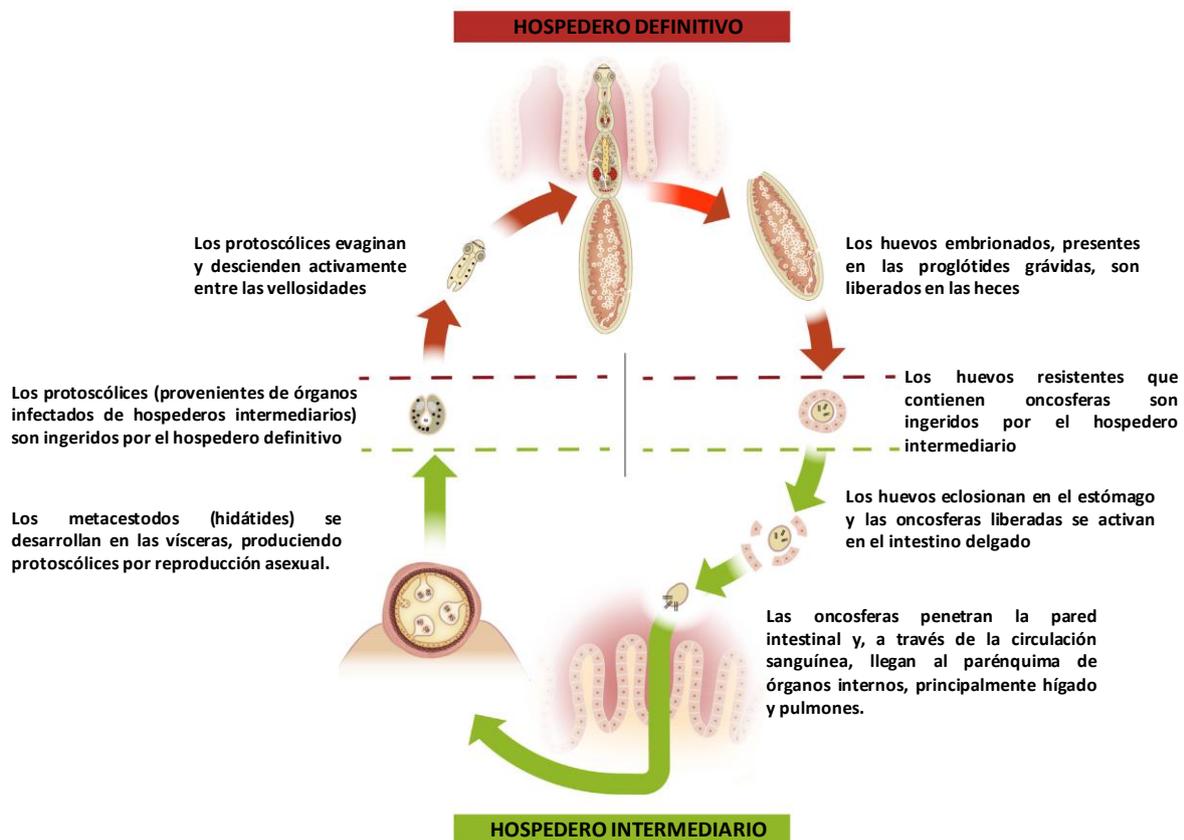


Figura 1.1: Ciclo de vida de *E. granulosus*. Las etapas del ciclo se exponen detalladamente en el texto. Imagen tomada y modificada de [3]

1.3. Estructura del quiste hidático

La equinococosis quística se caracteriza por el crecimiento, dentro del parénquima de órganos internos (principalmente hígado y pulmón) del hospedero intermediario, de una estructura larvaria, unilocular, turgente, llena de líquido, denominada hidátide (*Figura 1.2*). Está definida por una pared que se compone de una capa externa de material acelular, gruesa (puede alcanzar hasta 3 mm de espesor), rica en carbohidratos, denominada capa laminar (CL). La CL es sintetizada por la capa de células subyacente, delgada (10 μm) denominada capa germinativa (CG) [11][12][13]. Esta fina capa de células incluye, en su lado externo, un sincitio. De esta capa brotan hacia el interior de la hidátide pequeñas vesículas que dan lugar a la formación de los protoscólices. 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. La formación de una u otra estructura se relaciona con el grado de adaptación del parásito a la especie de hospedador intermediario; la formación de la cápsula de colágeno es indicio de una buena adaptación hospedador-parásito y por lo general apareja la formación de hidátides fértiles, es decir que albergan protoscólices. Sin embargo, cuando el parásito no se adapta correctamente a su hospedador secundario, se genera una zona de reacción inflamatoria activa y se producen hidátides no fértiles [14]. Entonces, tomadas en conjunto, la hidátide y la capa adventicia o la reacción inflamatoria local, forman lo que se conoce como quiste hidático.

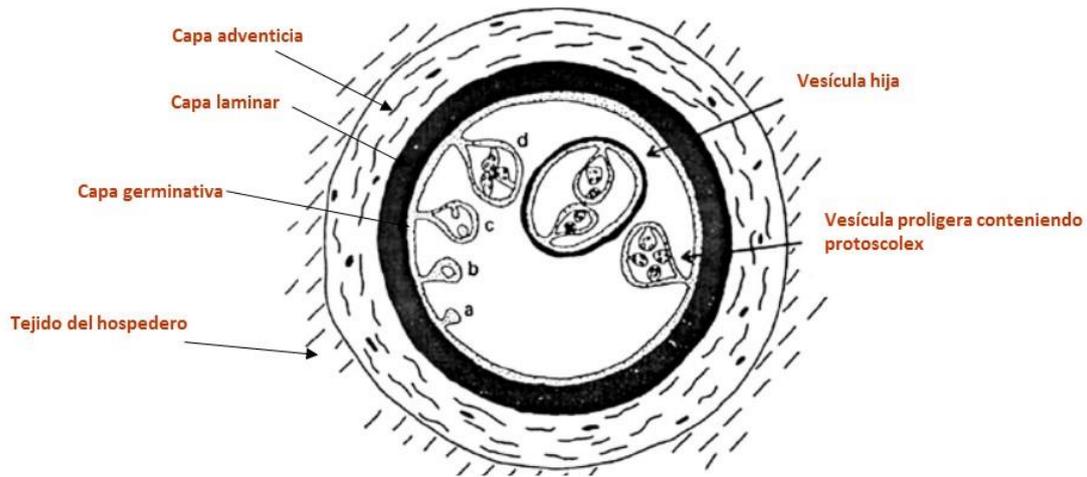
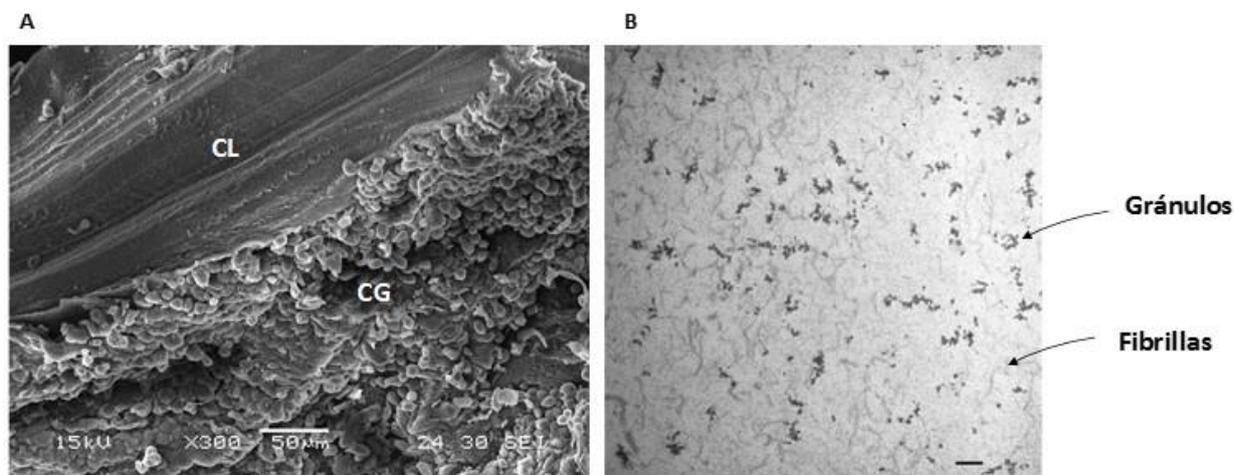


Figura 2. Esquema representativo de la estructura del quiste hidático. Los detalles de la estructura se presentan en el texto. De afuera hacia adentro se observa: tejido del hospedero, capa adventicia, capa laminar, capa germinativa. Dentro del quiste se puede apreciar una vesícula prolígera que contiene protoscolex, y una vesícula hija. Tomado y modificado de [10].

1.3.1. Estructura de la capa laminar

El componente principal de la CL en todos los géneros de *Echinococcus* es una malla de glicoproteínas de tipo mucinas que se encuentran altamente O-glicosiladas [15][16][17]. En el caso de *E. granulosus*, y probablemente también *E. equinus*, la CL está formada además por un segundo componente, consistente en abundantes depósitos de tamaño del orden de decenas de nanómetros de la sal cálcica *myo*-inositol hexakifosfato (InsP_6) cálcico [18][19][20][21][17]. A nivel ultraestructural, estos dos grandes componentes pueden observarse como una red de fibrillas y como gránulos densos a los electrones, respectivamente (*Figura 1.3*).

Figura 1.3. Ultraestructura de la capa laminar de *Echinococcus granulosus*. En (A) se muestra una micrografía electrónica de barrido en la que se puede apreciar a la CG y a la CL (destacándose sus laminaciones concéntricas). En (B) se muestra una micrografía electrónica de transmisión en la que se observa las fibrillas correspondientes a las mucinas y los gránulos densos a los electrones correspondientes a los depósitos de InsP_6 cálcico. La barra representa 0.5 μm de longitud. La micrografía mostrada en (A) fue gentilmente cedida por María Celina Elisondo (CONICET- Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina)



La leyenda de la Figura 1.3 se encuentra en la página anterior

1.3.1.1. Mucinas

Los carbohidratos que componen la CL son esencialmente O-glicanos mucínicos formados por galactosa (Gal), N-acetilgalactosamina (GalNac) y N-acetilglucosamina (GlcNac), en orden decreciente de abundancia [12][22][23]. Estos glicanos están basados en los *core* convencionales 1 y 2 de O-glicosilación mucínica, elongados y terminados en su mayoría en residuos Gal. En consecuencia, los residuos monosacáridos terminales no reductores expuestos son esencialmente α y β Gal (con una pequeña contribución de GlcNac) y el glicano más abundante es el *core* 1 no decorado (Gal β 1-3GalNac α 1-serina/treonina).

Por otra parte, los esqueletos polipeptídicos (apomucinas) no se conocen en detalle. De todos modos, los resultados de transcriptómica de la CG sugieren candidatos para las apomucinas de la CL, ya que revelan secuencias que se encuentran altamente expresadas en la CG y ausentes en protoscólices. Estas secuencias presentan un péptido líder (fundamental para la secreción convencional de proteínas), extremos N-terminales no glicosilados cortos (que en ciertos casos presentan cisteínas desapareadas), seguidos de un dominio glicosilado con alta proporción de residuos treonina, y finalmente una secuencia de inserción de ancla glicosilfosfatidilinositol (GPI) en el extremo C-terminal [24][25].

Con respecto al ensamblaje de las mucinas de la CL, se especula que interacciones entre mucinas cortas generarían la estructura en fibrilla que se observa al microscopio electrónico,

y que interacciones entre éstas explicarían el ensamblaje de la malla tridimensional. Se cree que para la formación de ambos niveles estructurales serían importantes las interacciones entre los azúcares, a través de enlaces de hidrogeno, y también entre las apomucinas, posiblemente mediante la formación de enlaces disulfuro e incluso a través de interacciones electroestáticas [13][11].

1.3.1.2 Myo-inositol hexakisfosfato cálcico

Los inositol fosfatos son componentes ubicuos de las células eucariotas. El más abundante de estos compuestos es el *myo*-inositol hexakisfosfato (InsP_6), con una concentración que varía entre 10 y 100 μM , dependiendo del tipo celular y la etapa del desarrollo. Este compuesto presenta una distribución intracelular, principalmente nuclear y citosólica [26].

El InsP_6 puede sufrir sucesivas desprotonaciones y dar compuestos con una alta densidad de carga negativa, lo que le permite interactuar con cationes di y tri-valentes dando lugar tanto a complejos solubles como a sales insolubles. La estructura química del InsP_6 predice que en los compartimientos citosólico y nuclear el compuesto forma un complejo soluble con magnesio, mientras que en condiciones extracelulares (o del sistema vesicular) el compuesto precipita como sal de calcio [27][28]. En lo que refiere a las funciones del InsP_6 como compuesto citosólico y nuclear (soluble), en células animales se sugiere un papel como cofactor en la reparación no homóloga del ADN así como en la exportación de ARNm del núcleo al citosol [29]. Por otro lado, en semillas de plantas, el InsP_6 está presente dentro de organelos rodeados de membrana formando sales con diferentes cationes metálicos, que se especula constituyen un almacenamiento interno de fósforo y minerales [30].

Con respecto a *E. granulosus*, nuestro grupo de trabajo ha demostrado la presencia de abundantes depósitos de InsP_6 cálcico extracelular en la CL, en la cual este compuesto constituye aproximadamente 1/3 de la masa seca total. Los depósitos individuales tienen 41 nm de tamaño, y cada uno se compone de varias esferas de 8 nm cada una, que corresponderían a cristales individuales del sólido [18]. Los depósitos de InsP_6 cálcico también fueron observados dentro de vesículas de membrana en las células de la CG, lo que indicaría que el InsP_6 precipita con calcio dentro de un compartimiento vesicular celular y luego es secretado a la CL [19].

La insolubilización del 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, si bien el tratamiento de muestras biológicas con agentes quelantes es en principio un método de baja especificidad, cuando se analiza por ^1H -RMN el sobrenadante resultante de la extracción de paredes hidatídicas con EDTA, las únicas moléculas orgánicas detectadas fueron InsP_6 y EDTA (Figura 4.1) [20].

Hasta el día de hoy se desconoce el papel del InsP_6 cálcico en el contexto de la CL. Como se mencionó previamente, la presencia de abundante InsP_6 cálcico es una característica de la CL de *E. granulosus* que no es compartida con todos los restantes miembros del género. Esto permite prever una función de este compuesto relacionada con características que son únicas de este parásito: la capacidad de la larva para controlar la inflamación del hospedero es notable y contrasta con lo observado para la larva de *E. multilocularis*, que resulta mucho más inflamatoria.

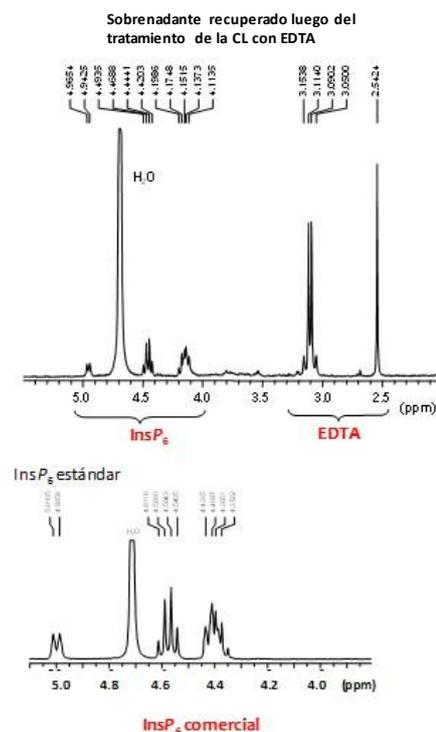


Figura 1.4. El tratamiento de la CL con EDTA remueve selectivamente el InsP_6 cálcico. El análisis de ^1H -RMN del sobrenadante recuperado luego del tratamiento de la CL con EDTA muestra solamente señales correspondientes al InsP_6 y al EDTA utilizado en la remoción. La imagen fue tomada y modificada de [20].

1.4. La capa laminar y la respuesta inmune

Dado que la CL es extremadamente rica en carbohidratos y aparentemente carente de proteínas estructurales de tipo no mucinas, las larvas de *Echinococcus* exponen al huésped principalmente carbohidratos [13]. Los carbohidratos son esenciales en la decodificación de los patógenos, incluyendo los helmintos, por parte del sistema inmune innato. Por lo general, para los helmintos, esta decodificación resulta en la instrucción de respuestas adaptativas que presentan un fuerte componente regulador, es decir, no inflamatorio. Esto es aparentemente el resultado de la adaptación evolutiva de estos parásitos para controlar el sistema inmune. En este contexto, *Echinococcus granulosus* es un excelente ejemplo de control inflamatorio del hospedero. La larva que, como se mencionó previamente, puede alcanzar decenas de cm de diámetro en parénquimas de órganos de sus hospederos intermediarios, suele permanecer durante años rodeada por una cápsula no infiltrada, producto de la resolución inicial de la inflamación alrededor del parásito [31].

La CL se encuentra en la interfase hospedero-parásito por lo que es crucial en la interacción del sistema inmunológico del hospedero infectado con el parásito. La CL pudo haber surgido en respuesta a la necesidad de proporcionar soporte mecánico para el crecimiento del parásito, así como para proteger a las células que conforman la CG de la respuesta inmunitaria del hospedero. Sin embargo, a su vez debe permitir el paso de nutrientes y productos de desecho, así como posibilitar el crecimiento del parásito. La respuesta a estas demandas se ve reflejada en la propia estructura: la CL es una malla elástica e hidrofílica que permite la difusión de macromoléculas de al menos 150 kDa, al mismo tiempo que impide el contacto directo entre la CG y el sistema inmunológico del hospedero [31].

La CL parece contribuir de manera significativa a la inducción de una respuesta no inflamatoria observada en las infecciones por *E. granulosus*. Esta hipótesis se apoya en la coincidencia en el tiempo entre el despliegue de la CL por la larva y la resolución de la inflamación, y por las propiedades no inflamatorias de la CL cuando se enfrenta in vitro con el complemento del hospedero o con macrófagos o células dendríticas [32][33][34][35][36].

1.5. El sistema complemento, con énfasis en la vía clásica

El sistema complemento juega un papel crucial en la defensa innata frente a patógenos. La activación del complemento conduce a cascadas proteolíticas robustas y eficientes que suelen terminar en opsonización y lisis del patógeno, así como en la generación de la respuesta inflamatoria clásica mediante la producción de potentes moléculas proinflamatorias. Asimismo, es considerado un puente funcional entre las respuestas inmunes innatas y adaptativas, permitiendo una defensa integrada del hospedero frente a patógenos. Como tal, un estudio de sus funciones permite la comprensión de los fundamentos moleculares de las interacciones con patógenos, así como la organización, integración y orquestación de la respuesta inmune del hospedero.

El sistema complemento fue descrito por Jules Bordet a fines del siglo XIX como el componente termosensible presente en el plasma capaz de “complementar” la actividad bactericida que presentaban los anticuerpos [37][38][39].

El complemento es un sistema complejo que involucra a más de 30 proteínas, presentes tanto en forma soluble en el plasma (donde constituye más del 15% de la fracción globular) como en superficies celulares [40]. La mayoría de las proteínas circulantes se producen en el hígado, aunque la biosíntesis extrahepática del complemento es importante e involucra a varios tipos de células, incluyendo fibroblastos, células T y B, adipocitos, células endoteliales y monocitos [41]. En este contexto, resulta fundamental destacar la biosíntesis de C1q por parte de los macrófagos (células del sistema inmune innato), que permite generar una alta concentración de esta proteína en sitios de infección, sin la necesidad de reclutar el complemento plasmático [41][42].

Luego de su descubrimiento, se pensó durante muchos años que las funciones del sistema complemento estaban restringidas a respuestas inmunes innatas y como efector de las respuestas adaptativas, pero que no tenía impacto en la instrucción de éstas últimas. Actualmente se sabe que la participación de este sistema es fundamental en la inducción y regulación de la inmunidad adaptativa, actuando tanto a nivel de células dendríticas como de linfocitos B y T [43][44]. Aunque el complemento se considera generalmente proinflamatorio como se mencionó anteriormente, también ha demostrado ser importante en los procesos homeostáticos que conducen a la eliminación de las células que presentan patrones

moleculares asociados al daño celular (DAMPs, del inglés *Damage Associated Molecular Pattern*) [44].

Además de su papel en “complementar” otras funciones del sistema inmune, el SC también es capaz de orquestar otros procesos no inmunológicos, como la angiogénesis y la maduración de la sinapsis nerviosa [45][46]. Además, los componentes del SC se entrelazan en complejas redes de interacción con otras cascadas plasmáticas, incluyendo la de la coagulación [47].

Resulta evidente que esta intrincada red y sus interacciones con otras vías debe ser estrictamente controlada; una falla en el control puede desembocar en que el complemento actúe en el tejido del hospedero y cause daño orgánico, pudiendo desencadenar enfermedades autoinmunes tanto crónicas como agudas. En suma, el complemento es una cascada proteolítica agresiva que funciona bajo el estricto control de los inhibidores y el resultado final en cada caso depende de una inclinación del equilibrio entre activación e inhibición [48].

La activación del complemento involucra cascadas enzimáticas en las cuales precursores enzimáticos inactivos (zimógenos o proenzimas) son alterados mediante cortes proteolíticos. Cada enzima activada escinde y activa a la siguiente enzima de la cascada. Las cascadas enzimáticas dan como resultado una enorme amplificación de la cantidad de productos proteolíticos que se generan [49]. La activación del complemento, además de involucrar escisiones proteolíticas, también involucra reordenamientos estructurales. En conjunto estos mecanismos hacen posible que el SC esté presente de forma ubicua e inactiva, y pueda activarse localmente.

El primer paso para la activación es el reconocimiento de moléculas en la superficie del patógeno (pero no en células “sanas” del hospedero). Esto puede ocurrir por tres vías distintas: vía clásica (VC), vía de las lectinas (VL) y vía alternativa (VA) (*Figura 1.5*).

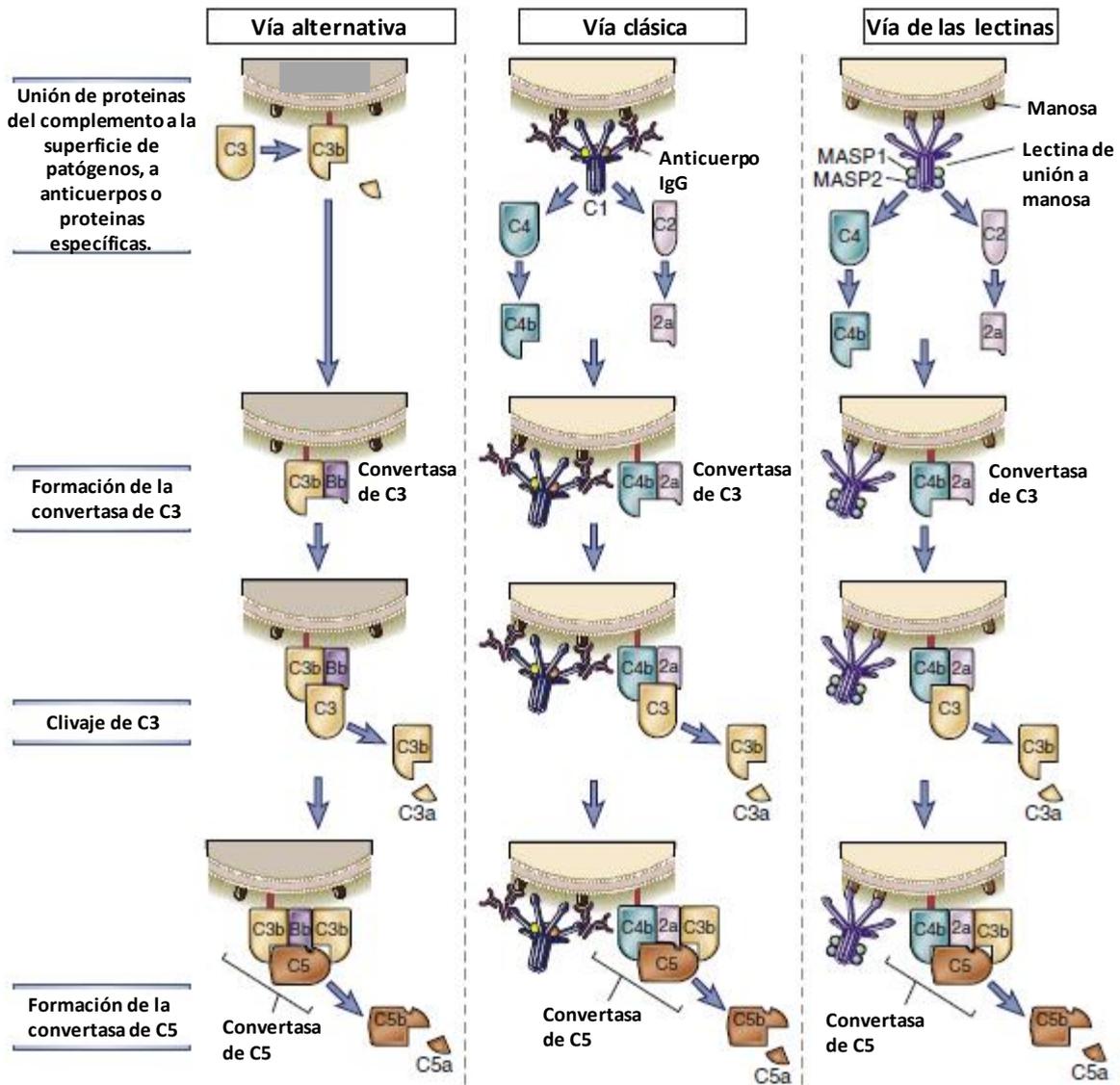


Figura 1.5. Pasos tempranos en la activación del sistema complemento por VC, VL y VA. Los detalles de activación de las cascadas proteolíticas se describen en el texto. Imagen tomada y modificada de [49].

A continuación, se describen los mecanismos de iniciación de cada una de las vías, con énfasis en la VC, centro de estudio en esta Tesina.

1.5.1. Activación del sistema complemento

1.5.1.1 Vía clásica

C1, el complejo iniciador de la vía clásica, tiene un tamaño aproximado de 790 kDa. Consiste en una molécula de C1q y dos moléculas de cada una de las subunidades catalíticas C1r y C1s,

las cuales forman un tetrámero dependiente de calcio. C1q, que es la subunidad de reconocimiento del complejo C1, es una proteína hexamérica de 460 kDa que se ensambla a partir de 18 cadenas polipeptídicas, 6 de cada uno de los tipos A, B y C. Éstas son similares en longitud, exhiben secuencias de aminoácidos homólogas y, en el ser humano, están codificadas por tres genes diferentes en el cromosoma 1 [50][48][51][52]. Cada una de estas cadenas comprende una región N-terminal corta implicada en la formación de enlaces disulfuro entre cadenas A-B y C-C, que es seguida por una secuencia de tipo colágeno que se repite dando lugar a la formación de seis hélices triples heterotriméricas ABC. Estas hélices se asocian para formar un “tallo” y, debido a interrupciones en la secuencia de colágeno de tipo Gly-X-Y, divergen para formar seis “brazos” individuales que terminan, en su extremo C-terminal, con dominios globulares. Esto genera la estructura bien conocida en forma de ramillete [53][54]. Mientras que los dominios de tipo colágeno mantienen la estructura hexamérica e interactúan con moléculas efectoras, las cabezas globulares se encuentran a cargo de las propiedades de reconocimiento de C1q [55] (*Figura 1.6*).

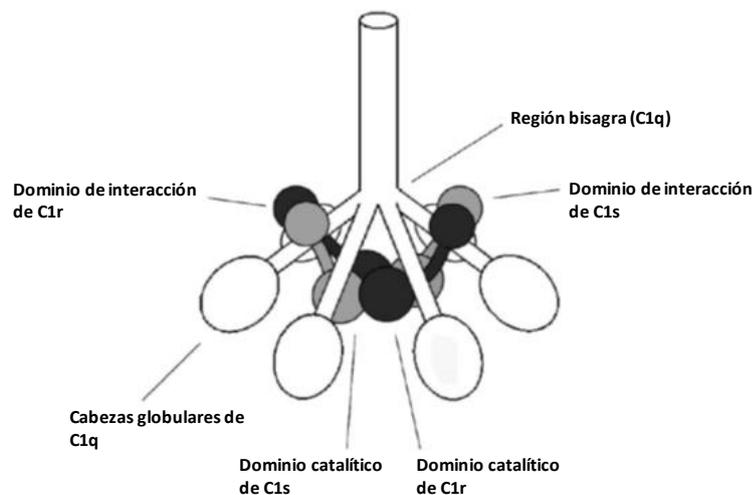


Figura 1.6. Modelo estructural tridimensional del complejo C1 en su forma no activada. C1q, C1r y C1s aparecen en blanco, negro y gris, respectivamente. Tomado y modificado de [52]. Los detalles de la estructura se encuentran descriptos en el texto.

C1q reconoce la porción Fc de los anticuerpos de clase M (IgM) o de clase G (IgG), así como también a la proteína C reactiva (proteína de fase aguda) depositada sobre las superficies de

patógenos [56][57]. También reconoce directamente varios patrones moleculares repetitivos sobre patógenos (porinas bacterianas, LPS) actuando entonces como PRR (del inglés *Pattern Recognition Receptor*) [58][59]. La activación del complemento mediada por C1q sobre las superficies que no son propias conduce a un aumento en la fagocitosis, la lisis y en la generación de señales inflamatorias [60]. Por otra parte, C1q también detecta varias estructuras propias alteradas, tales como proteínas anormales (priones [40], fibrillas β -amiloides [61]). C1q también es capaz de reconocer y unir moléculas asociadas a “señales de muerte celular” expuestas en las células apoptóticas y/o necróticas, tales como fosfatidilserina y ADN [62][63][64]. La unión a fosfatidilserina y a ADN ejemplifican la capacidad de C1q de unirse a arreglos repetidos con carga negativa, que pueden ser propios además de, como se dijo antes, ser expuestos por microorganismos. La unión de C1q a componentes propios en general provoca la eliminación de dichas células (principalmente por parte de monocitos), pero la inflamación y la citolisis se ven inhibidas [65]. En ciertos contextos, la interacción entre C1q y polianiones puede en la práctica causar disminución en la capacidad de activación de la vía clásica, como se ha sugerido para el disulfato de betulina y el sulfato de ácido betulínico (polianiones derivados del compuesto triterpenoide betulina) [66]. Esto podría estar relacionado con aspectos estructurales del reconocimiento de polianiones por C1q, que se discuten a continuación.

La versatilidad de unión de C1q a sus blancos se basa principalmente en la estructura heterotrimérica de sus cabezas globulares, debido a 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. En el modelo representado en la *Figura 1.6*, la localización relativa de los sitios catalíticos y de clivaje de C1r sugiere que es necesario un movimiento hacia afuera del “tallo” de C1q para permitir la disociación de la estructura dimérica de C1r, y así dar lugar a su autoactivación. En esta hipótesis, se espera que cualquier ligando que interactúe con la cara externa de la cabeza globular de C1q (como por ejemplo sería el caso de IgG), desencadene una activación eficiente del complejo C1. Por el contrario, parece poco probable que un ligando que interacciona con el sitio de unión interno descrito previamente genere la tensión necesaria para dar lugar a un movimiento hacia afuera del “tallo” de C1q. Se postula que esto limita la activación del complejo C1 cuando C1q interacciona con polianiones [67]

Como se mencionó, los restantes componentes del complejo C1 son las glicoproteínas C1r y C1s de 92 y 86 kDa, respectivamente. Más específicamente se trata de proteasas de serina con organizaciones estructurales homólogas y que comprenden, a partir del extremo N-terminal: un módulo CUB (que presenta solo un par de residuos cisteína), un módulo similar al factor de crecimiento epidérmico denominado EGF (con seis residuos de cisteína conservados), un segundo módulo CUB, dos módulos CCP (proteínas de control del complemento) contiguos y, por último, un dominio de tipo serina proteasa (similar a la quimiotripsina) en extremo C-terminal (*Figura 1.7*) [52].

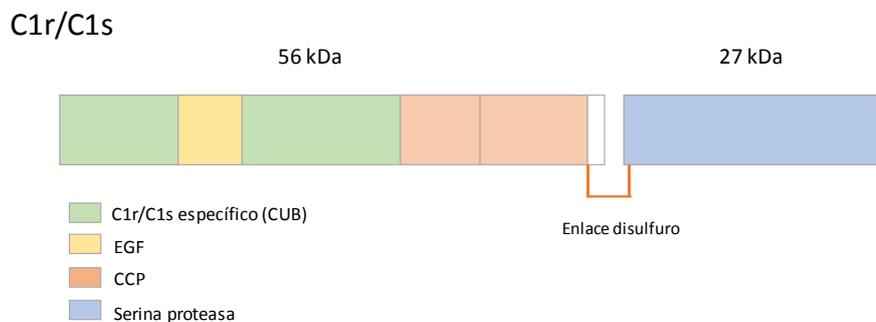


Figura 1.7. Estructura modular de C1r y C1s activados. Ambas proteasas comprenden un módulo N-terminal CUB, un módulo similar a EGF de unión a Ca^{2+} , un segundo módulo CUB, dos módulos CCP y un dominio Serina proteasa (SP), similar a quimotripsina.

En su forma de proenzima, tanto C1r como C1s exhiben una estructura de cadena única. Ambas proenzimas se activan por escisión de un solo enlace específico arginina-isoleucina (Arg-Ile) para dar lugar a las proteasas activas, de dos cadenas, que permanecen unidas por un puente disulfuro. La autoactivación de C1r, producto del cambio conformacional generado en C1q tras su unión al sitio blanco, da lugar a dos fragmentos, uno de 56 kDa y otro de 27 kDa (fragmento que conserva el dominio proteasa de serina). Posteriormente, debido a la estrecha asociación del sitio activo de C1r y el sitio de activación de C1s dentro de los brazos de tipo colágeno de C1q, el fragmento menor de C1r activado corta y activa a la proenzima C1s para dar lugar a los fragmentos de 56 kDa y 27 kDa (éste segundo conteniendo el dominio proteasa de serina), que también permanecen unidos entre sí mediante un enlace disulfuro.

Estudios basados en microscopía electrónica demostraron que el tetrámero de proteasas posee una estructura de tipo C1s-C1r-C1r-C1s, con regiones funcionales especializadas, donde la región N-terminal de cada proteasa media las interacciones dependientes de Ca^{2+} , mientras que la región C-terminal es responsable de la actividad catalítica [52].

El siguiente paso en la cascada es la activación del componente C4. C4 pertenece a la familia de las α_2 -macroglobulinas, y está formado por tres cadenas unidas por enlaces disulfuro: α de 93 kDa, que porta un grupo tioéster interno, β de 75 kDa, y γ de 32 kDa. La molécula de C4 es escindida por C1r activado en un solo punto dentro de la cadena α , generando la anafilotoxina C4a (9 kDa) y el fragmento más grande C4b (196 kDa). En la molécula de C4b, el enlace tioéster queda expuesto y es, por tanto, susceptible de ataque nucleofílico. La mayoría de las moléculas de C4b que se generan son rápidamente hidrolizadas por agua (nucleófilo mayoritario en el plasma). Sin embargo, una pequeña proporción de C4b puede unirse covalentemente a superficies que presenten aceptores nucleofílicos, como grupos amino o hidroxilo, mediante enlace amida o éster, respectivamente.

El C4b depositado es capaz de unir al siguiente componente de la vía, C2. Si esta unión ocurre en las inmediaciones de C1s activado, entonces C2 es escindido en un solo corte dando lugar C2b (30 kDa), que permanece en fase fluida, y al dominio C-terminal catalítico, C2a (70 kDa). C2a permanece transitoriamente asociado a C4b, formando el complejo enzimático inestable C4bC2a, la convertasa de C3 de la VC. La convertasa, cuyo sitio activo proteolítico se encuentra en C2a, es capaz de activar proteolíticamente al principal componente del SC, C3 [37][49].

1.5.1.2. Vía de las lectinas

La activación de la vía de las lectinas se inicia por la unión de complejos formados por determinadas lectinas, específicamente la lectina de unión a mananos (MBL, del inglés *Mannan-Binding Lectin*) o ficolinas, con proteasas llamadas MASPs, a carbohidratos específicos en la superficie de patógenos.

Estos complejos son similares estructural y funcionalmente al complejo C1, con el reconocimiento y unión a cargo de la lectina, y la actividad catalítica presente en las MASPs (MASP 1, 2 y 3), que son homólogas a las proteasas C1r y C1s.

Como consecuencia del reconocimiento del sitio blanco por parte del complejo, MASP2 se autoactiva y escinde al componente C4. Igual que sucede en la VC, si el componente C2 se une a C4b, depositado en la superficie activadora, en las inmediaciones de MASP2, podrá ser cortado, para así dar lugar a la convertasa de C3 de la vía alternativa, C4bC2a [49].

1.5.1.3. Vía alternativa

Esta vía presenta una iniciación atípica, que se basa en un asa de retroalimentación positiva. El componente C3 es constantemente hidrolizado en el plasma; el fragmento C3b generado sufre un cambio conformacional que apareja la exposición de un enlace tioéster reactivo que se encontraba oculto en la proteína nativa, lo que posibilita que algunas moléculas de C3b sean capaces de unirse covalentemente a superficies biológicas cercanas. Una vez depositado, el C3b es capaz de unir factor B (análogo a C2). El factor B unido es escindido por una serina proteasa plasmática denominada factor D (que circula en forma activa), en los fragmentos Bb (que permanece unido a C3b) y Ba. De esta manera, se forma la convertasa de C3 de la VA, C3bBb. Esta convertasa escinde más moléculas de C3, configurando así una secuencia de amplificación. Incluso si el C3b es generado por activación de la VC o la VL, también es capaz de formar un complejo con el fragmento Bb y así escindir más moléculas de C3. Por tanto, la convertasa de C3 de la VA sirve como bucle de retroalimentación positiva para amplificar la activación del complemento por cualquier de las tres vías [49].

Las tres vías del sistema complemento, que como se describió difieren en las moléculas iniciales que determinan su activación, convergen en la activación proteolítica de C3. C3 es una glicoproteína de 185 kDa formada por dos subunidades: la subunidad α de 110 kDa y la β de 75 kDa, unidas por un enlace disulfuro. Al igual que C4, pertenece a la familia de las α_2 -macroglobulinas y contiene un enlace tioéster en la subunidad α que, en la forma nativa de la proteína, se encuentra oculto en un bolsillo hidrofóbico y es por tanto, inaccesible. Tras la activación de C3, ya sea por la convertasa C4bC2a o por la C3bBb, el C3b generado sufre un

cambio conformacional que apareja la exposición del enlace tioéster, altamente reactivo con nucleófilos como el agua y moléculas que contienen grupos hidroxilo, preferentemente. Si estas moléculas se encuentran en la superficie de la célula, C3b puede unirse covalentemente con la célula a través de un enlace éster. Entonces, el enlace tioéster interno, luego que C3 es activado, le confiere el potencial de unirse covalentemente y formar un complejo con cualquier nucleófilo presente en superficies biológicas, ya sea extrañas o propias. Aunque su versatilidad para unir todos los tipos de células extrañas es deseable, su unión a las células del organismo huésped debe ser minimizada. Esto es intrínseco al tioéster en sí mismo; como se dijo, una vez activado, el tioéster es extremadamente reactivo. El agua, con una concentración muy alta en el medio, es capaz de hidrolizarlo inmediatamente y poner así un límite en el rango espacial de activación de C3b.

Por otra parte, el C3a generado (y que permanece en la fase soluble) es una potente anafilotoxina que participa en el reclutamiento y activación de células efectoras de la respuesta inmune innata.

El C3b depositado puede actuar como opsonina, marcando a las células infectadas para su eliminación por células fagocíticas especializadas, o puede continuar con la cascada proteolítica generando la convertasa de C5 [37][49].

1.5.1.4. Activación de los componentes tardíos del SC

Luego que se alcanza una cierta densidad de moléculas de C3b depositadas en la superficie activadora, tiene lugar la activación de la vía terminal. En este contexto, el depósito de una molécula de C3b sobre cualquiera de las convertasas de C3 provoca un cambio en la especificidad de sustrato de la convertasa de la molécula de C3 a la de C5, dando lugar a la convertasa de C5.

C5 es un dímero de 190 kDa, formado por una cadena α de 115 kDa y una cadena β de 75 kDa. Pertenece también a la familia de α_2 -macroglobulina, pero carece de un enlace tioéster interno. La activación de C5 por las convertasas de C5 da lugar a C5a (11 kDa, proveniente de la cadena α) y C5b (104 kDa). C5a es la más potente anafilotoxina y por tanto el mediador inflamatorio más importante del SC. Por su parte, C5b mantiene transitoriamente una conformación que le permite unir las siguientes proteínas de la cascada, C6 (110 kDa) y C7

(100 kDa), formando el complejo C5b-7. El componente C7 es hidrofóbico y es por tanto capaz de insertarse en las membranas lipídicas, donde se convierte en un receptor de alta afinidad para el siguiente componente de la cascada proteolítica, C8. La molécula de C8 (155 kDa) es un trímero de cadenas α (64 kDa), β (64 kDa) y γ (22 kDa). Una de estas cadenas se une al complejo C5b-7 y forma un heterodímero covalente con la segunda cadena; la tercera cadena se inserta en la membrana lipídica. El complejo formado C5b-8, establemente insertado en la membrana lipídica, presenta una capacidad limitada para lisar células. La formación de un MAC (del inglés *Membrane Attack complex*) totalmente activo se consigue con la inserción del siguiente componente en la cascada, C9. C9, unido a C5b-8, polimeriza para formar poros en las membranas plasmáticas. Estos poros son de aproximadamente 100 Å de diámetro y permiten el libre movimiento de agua y de iones. La entrada de agua da lugar a la lisis, causada por el desbalance osmótico, de aquellas células que presentan el complejo MAC insertado en su membrana [48] [39] [37] [49].

1.5.2. Regulación del inicio de la activación del complemento por la vía clásica.

Los tejidos sanos del hospedero contrarrestan el daño mediado por el complemento a través del uso de un arsenal de reguladores eficaces, que circulan en forma soluble o están anclados en las membranas. La constante y arbitraria activación de la cascada del complemento marca un peligro potencial para cualquier superficie, poniendo en peligro al hospedero a través de la ruptura de la homeostasis corporal. Los reguladores de complemento aseguran que, incluso después de la opsonización inicial, las superficies del hospedero no se vean afectadas por las acciones del bucle de amplificación de VA, que puede tener lugar a partir de la activación de cualquiera de las tres vías. Así, existe una fina regulación de la activación del complemento en todos los pasos de las vías, principalmente en lo que respecta al inicio, la formación de la convertasa de C3 y la activación de la vía terminal. A continuación, se ahondará en lo que respecta a la regulación del inicio de la VC, es decir, la activación del complejo C1.

El inhibidor de C1 (C1-INH) fue descubierto en 1957 por Ratnoff y Lepow, quienes lo describieron como un factor termosensible presente en el plasma humano que inhibía la actividad proteolítica del primer componente del sistema complemento [51]. Estudios

posteriores demostraron que C1-INH inactiva tanto C1r como C1s, y que es el único regulador negativo del inicio de la vía clásica del complemento [68][69]. Esta glicoproteína soluble de 110 kDa, que circula en el plasma a una concentración aproximada de 2 a 4 μ M, pertenece a la familia de las serpinas de inhibidores de proteasas de serina, y por lo tanto actúa como un sustrato suicida. La inactivación de las proteasas por las serpinas depende de un mecanismo de captura que se activa después del reconocimiento, por parte de la proteasa, de un bucle central reactivo presente en la serpina. La escisión del enlace peptídico desencadena un reordenamiento molecular y da lugar a la formación de un enlace de tipo covalente entre un residuo específico del inhibidor y el residuo de serina del sitio activo de la proteasa.

C1-INH difiere de otros miembros de la familia en que contiene un dominio amino terminal largo, de aproximadamente 100 residuos aminoacídicos, que está altamente glicosilado [70]. Es mayoritariamente sintetizado en el hígado, pero también, en menor medida, por células epiteliales [71], monocitos [72] y plaquetas [73][74].

Durante la activación del complejo C1, el inhibidor de C1 inhibe a C1r activado y C1s activado. Además disocia C1r y C1s del complejo C1 activado, proceso que se determina principalmente por la interacción con C1r [75] [68] [69]. También puede suprimir la activación espontánea de C1 a través de una interacción reversible con los zimógenos de C1r y C1s [76][56].

Este inhibidor también regula la activación de la VL, a través de la inactivación de MASP-2, aunque en este caso no es el único inhibidor que participa, ya que la α_2 -macroglobulina también es capaz de inhibir MASP-2 [77][78][79]. De las formas anteriores, C1-INH previene la activación de C4 y de C2 y, por tanto, la formación de la convertasa de C3 de la VC/VL.

Además de su papel en la regulación del inicio de la activación del sistema complemento, el C1-INH también participa en la regulación de otras ramas de la inflamación y en la regulación de la coagulación [80]. En efecto, además de C1r y C1s inhibe proteasas presentes en el plasma como factor XII [81][82], calicreína plasmática [83] y plasmina [84].

La actividad inhibitoria del C1-INH por sí mismo es relativamente pobre. En 1920 Gross y Erch informaron que el polianión heparina podría potenciar la actividad de C1-INH para la vía clásica, y que los mecanismos involucrados en esta potenciación incluirían una unión mejorada del inhibidor con C1s y la interferencia con la unión de C1q a activadores. Posteriormente, a fines del siglo XX, *Wuillemin et al.* concluyeron que la heparina y el heparan sulfato son dos de los potenciadores más potentes de la actividad de C1-INH [85]. Otro

excelente potenciador, descrito recientemente por *Wijeyewickrema et al.*, es el polifosfato [80].

1.6. La capa laminar y el sistema complemento, con énfasis en la vía clásica.

Como se ya se ha mencionado, el estadio larvario de *E. granulosus* puede persistir en el parénquima de órganos de sus hospederos intermediarios durante años sin provocar inflamación significativa. Esto permite inferir que la regulación de la respuesta inflamatoria, incluyendo la activación del complemento por VC, debe ser una importante adaptación de la biología de *E. granulosus* a su condición de endoparásito obligado.

En las etapas pre-quísticas el parásito genera una respuesta inflamatoria local, con activación del sistema complemento, sobre todo a nivel de la VA [32][9]. En contraste, al menos los protoscólices pierden la capacidad de activar el sistema complemento durante la diferenciación (reversa) a hidátides, durante la cual uno de los sucesos claves es la formación de la CL [9]. En coincidencia con este panorama, los extractos solubles de la CL activan pobremente el SC en comparación con extractos de protoscólices y con líquido hidático [86]. En conjunto, los resultados anteriores fueron los primeros indicios de que la CL era decodificada por el sistema innato como una estructura no inflamatoria, y llevaron al grupo a centrar sus estudios en la interacción del SC del hospedero con la CL de *E. granulosus*.

La evidencia de activación de la VA por estadios pre-quísticos, cuya disminución coincidía en el tiempo con la aparición de la CL, llevó al grupo a centrar sus estudios iniciales en posibles mecanismos de control de la VA [32] [86]. En este contexto, se encontró que la CL es capaz de unir factor H y, por tanto, controlar la activación de esta vía [87]. En concordancia, se encontró también que el C3b depositado en dicha superficie es rápidamente inactivado. Esto se aplica al C3b unido en forma covalente a las mucinas [88] y, según resultados recientes, también a C3b depositado sobre proteínas adsorbidas al InsP_6 cálcico, que sería inactivado aún con mayor velocidad (A. Barrios, resultados no publicados). Esto implica que deben existir sitios para factor H tanto sobre las mucinas como sobre el InsP_6 cálcico.

En relación a la VL, se observó que no hay unión de MBL a la CL [89].

En lo que respecta a los antecedentes en relación a la VC específicamente, la CL es capaz de unir anticuerpos de clase IgM e IgG, en cantidades significativas [90][9]. 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 pH2 [34]. La extracción del InsP_6 cálcico de la CL 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_6 cálcico en la CL [34]. Por lo anterior, la CL tendría potencial de activar la VC a través de anticuerpos. No se encontró en la pared de la hidátide evidencia de actividades de inhibición de C1r/C1s activados [89]. Por otro lado, se observó que el InsP_6 cálcico sintético (generado a partir de InsP_6 sódico comercial y cloruro de calcio) une selectivamente C1q proveniente de suero humano [88]. Esta unión también fue observada empleando CL, control o con el InsP_6 cálcico previamente eliminado, por A. Barrios. También se observó que cuando se incubaba CL, de la que el InsP_6 cálcico fue previamente eliminado, con SH en dilución 1:4 in vitro, el depósito detectable de C3 es más lento que en el caso de la CL nativa [88]. Estas observaciones dieron lugar a la hipótesis que los gránulos de InsP_6 cálcico podrían iniciar la activación de la VC, la cual, a concentraciones altas de complemento, podría lógicamente ser amplificada a través de la VA. Sin embargo, al momento de comienzo de esta Tesina no existía ninguna evidencia directa de iniciación de la VC por parte del InsP_6 cálcico.

2.Objetivos

2.1. Objetivo general

Determinar si la unión del componente C1q (proveniente de SH) por parte del InsP_6 cálcico también tiene lugar en el contexto de la CL, y si esta unión conlleva a la activación del complejo C1.

2.2. Objetivos específicos

1. Determinar si el InsP_6 cálcico en el contexto de la CL es capaz de unir complejo C1 proveniente de SH.
2. Determinar si la unión del complejo C1 sobre el InsP_6 cálcico es directa o requiere la presencia de otras proteínas séricas.
3. Determinar si la unión de C1 sobre el InsP_6 cálcico da lugar a la activación de C1r y de C1s, en condiciones experimentales de ausencia funcional de C1-INH.
4. Determinar si la unión de C1 sobre el InsP_6 cálcico, da lugar a la activación de C1r y de C1s en condiciones experimentales de presencia funcional de C1-INH, y si contribuye a la activación global del complejo C1 por la CL.
5. Determinar si la unión de C1 al InsP_6 cálcico da lugar a la activación del componente C2, y si contribuye a la activación global de dicho componente por la CL.

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales de trabajo

3.1.1. Suspensión de partículas de CL proveniente de infección experimental en ratón y de infección natural en humano

Las hidátides provenientes de ratones fueron gentilmente donadas por el Dr. Gustavo Mourglia (Laboratorio de Inmunología). Éstas derivan de infección secundaria intraperitoneal de ratones hembras de la cepa Balb/c, de 6 a 8 semanas de edad [91]. Para las infecciones se utilizaron protoscólices viables provenientes de hidátides de infecciones naturales en ganado bovino uruguayo, por lo que se presume corresponde a *E. granulosus sensu stricto* (por tratarse de la cepa con mayor prevalencia del país) [5].

Las hidátides así obtenidas fueron incubadas en solución amortiguadora Tris/HCl 20 mM pH 7.4 incluyendo NaCl 135 mM, CaCl₂ 0.5 mM, Tritón X-100 0.1% m/v y NaN₃ 0.05% m/v. El detergente (Tritón X-100) y la azida (NaN₃) fueron utilizados con la finalidad de matar al parásito y desprender la CG de la CL. En este punto el criterio utilizado fue que aquellas que presentaban CG desprendida de la CL observable a nivel macroscópico, fueron seleccionadas para ser puncionadas con jeringa. Esto permitió extraer el líquido hidático junto con las células de la CG, y así obtener las CL colapsadas [31]. Para remover el material fibroso proveniente del hospedador (distinguible macroscópicamente por su color amarillento), las CL se frotaron sobre un papel de filtro. A continuación fueron cortadas utilizando un bisturí, lo que permitió obtener pedazos de CL más pequeños (aunque aún visibles macroscópicamente) que fueron incubados con tampón inicial durante 30 minutos y luego lavados NaCl 2M, CaCl₂ 0.5 mM, eliminando así las proteínas adsorbidas, provenientes en su mayoría del hospedero. [11] [90] [87] [90]. Las CL fueron llevadas nuevamente a tampón inicial por lavados repetitivos. A partir de este material, se preparó una suspensión de partículas de CL de tamaño máximo estimado en 1mm x 1mm x 0.1mm (la última dimensión corresponde al espesor típico de la CL en hidátides provenientes de infecciones artificiales en ratones) utilizando un homogeneizador eléctrico (*TissueRuptor*, Qiagen). Para poder determinar el contenido de masa seca de la suspensión obtenida, se tomó una alícuota de 1 mL de este material (prestando especial atención a homogeneizar muy bien antes de la toma) y se la traspasó a un tubo de 1.5 mL

previamente masado. Luego, se lavó 4 veces con agua destilada y se llevó a un volumen final aproximado de 500 μ l, se congeló a -80°C , se liofilizó y se masó. Se determinó la masa seca de CL como la diferencia entre la masa final y la inicial. Este dato permitió determinar la concentración en mg de masa seca de CL por mL del “stock” de CL original. La suspensión se conservó siempre a 4°C .

Por otro lado, se trabajó con material hidático humano proveniente de infección natural localizado en la columna vertebral de un único paciente, material gentilmente provisto por el Dr. Daniel Darrosa (Departamento de Parasitología del Instituto de Higiene). Esta muestra, proveniente de Uruguay, presumiblemente pertenece a *E. granulosus sensu stricto*. Para obtener la suspensión de partículas de CL, la muestra se sometió al mismo tratamiento realizado para las muestras provenientes de material de ratón, dando lugar a una suspensión de concentración conocida, que fue cedida por A. Barrios.

Es importante destacar que, por tratarse este material de una muestra previamente congelada, la eliminación de la CG y/o del material fibroso proveniente del hospedero pudo no haber sido completa como si lo fue para el material proveniente de ratón (que no fue congelado antes del tratamiento).

3.1.2. Modificaciones realizadas al material de CL

3.1.2.1. Extracción con tampón conteniendo el agente quelante EDTA: eliminación selectiva de los gránulos de InsP_6 cálcico de la CL

El tratamiento de la CL con EDTA, por quelado del catión calcio (Ca^{++}), disuelve los gránulos de InsP_6 en forma altamente selectiva, como ya se mencionó en la sección Introducción.

Para preparar el material de CL sin gránulos de InsP_6 cálcico, entonces se tomó la cantidad necesaria de la muestra de suspensión “stock” de CL para generar material para todos los experimentos, y se traspasó a un tubo de 50 mL. Se le realizaron 3 lavados por centrifugación cada uno con 30 mL de una solución amortiguadora conteniendo Tris/ HCl 20mM, pH 8, durante 3 minutos a 2000 g y descartando el sobrenadante cada vez. Estos lavados permiten eliminar el Tritón X-100 así como el exceso de sales y de NaN_3 que se encontraba en el material “stock”. Es importante destacar que se cuenta con cuantificaciones precisas de la cantidad de InsP_6 cálcico presente en la CL [18], lo que permite calcular la cantidad de EDTA

mínima necesaria para asegurar una extracción completa en una muestra determinada. Esta relación establecida es 1 mL de solución amortiguadora 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 con respecto a la cantidad de calcio presente en la CL. La incubación de la suspensión de CL con tampón conteniendo EDTA se realizó durante 15 minutos a temperatura ambiente y con agitación. Luego, se realizaron 4 lavados por centrifugación a 5400 g durante 5 minutos, con 35 mL cada uno con una solución de VBS⁺⁺.

Se pudo observar macroscópicamente, tal como estaba reportado previamente, que el aspecto de la CL cambia de opaco a translúcido cuando se le extraen los gránulos de InsP₆ cálcico [20]. De esta forma se obtuvo un “stock” de CL sin gránulos de InsP₆ cálcico, al que se le denominó “CL pre- tratada con EDTA”.

3.1.2.2. Proteólisis inespecífica con la preparación proteolítica pronasa: eliminación de anticuerpos del hospedero de la CL

El tratamiento con la preparación proteolítica pronasa permite eliminar de forma total las inmunoglobulinas del hospedero presentes en la CL, sin disolver la malla de mucinas y sin alterar el tamaño ni la apariencia de las partículas de CL [13]. Para preparar este material, se tomó una muestra de “stock” de CL control necesaria para alcanzar una concentración inicial de 10 mg/mL de masa seca de CL y se la traspasó a un tubo de 50 mL. Se realizaron 3 lavados por centrifugación a 2000 g y durante 3 minutos, con 30 mL cada uno con la solución amortiguadora Tris/HCl 20mM, pH 8, conteniendo CaCl₂ 0.1 mM (para preservar la integridad de los depósitos de InsP₆ cálcico). Para la digestión se agregó un volumen igual al de CL ya contenido en el tubo, de una solución de pronasa (*Sigma* #P5147-1G) en el mismo amortiguador, de concentración 0.25 mg/mL de modo de alcanzar una concentración final de 0.125 mg de enzima/mL. Se incubó toda la noche a 37°C en estufa con agitación. Luego se lavó 5 veces, manteniendo un cociente de lavado de 1/10 cada vez, con una solución conteniendo NaCl 2M, 0.1% Tween 20. De esta forma se obtuvo un “stock” de material de CL sin inmunoglobulinas, que se le denominó “CL pronasa”.

3.1.2.3. Combinación de extracción con EDTA y proteólisis

Con el fin de eliminar de la CL tanto los gránulos de InsP_6 cálcico como las inmunoglobulinas, se sometió al material de CL “stock” primero al tratamiento descrito con el agente quelante EDTA y luego al tratamiento descrito con la preparación proteolítica pronasa. A este material se le denominó “CL EDTA/pronasa”.

3.1.2.4. Eliminación selectiva de los gránulos de InsP_6 cálcico de la CL con el agente quelante EDTA y posterior reconstitución de la CL con InsP_6 cálcico purificado.

Para obtener este material se tomó una alícuota del el “stock” de CL pre-tratada con EDTA que permita obtener una concentración de 6 mg/mL de masa seca de CL, por tubo de reacción. Luego, se le agregó la cantidad necesaria de InsP_6 cálcico purificado disuelto en un volumen pequeño de VBS⁺⁺ de modo de obtener una concentración final de este componente de 2 mg/mL, por tubo de reacción. De esta forma se obtuvo el material al que se le denominó “CL reconstituída”.

3.1.3. Obtención de InsP_6 cálcico purificado a partir de CL

Este material fue donado por el grupo de trabajo y se obtuvo según lo especificado en [18]. Brevemente se somete la CL a hidrólisis alcalina, tratamiento que disuelve las mucinas pero no libera los depósitos de InsP_6 cálcico de la CL. De esta forma se obtiene InsP_6 cálcico en estado sólido, que fue posteriormente resuspendido en VBS⁺⁺.

3.1.4. Obtención de suero humano normal (SHN)

Este material fue gentilmente cedido por la Mag. Anabella Barrios y se obtuvo de la manera detallada en [92].

3.2. Técnicas generales

3.2.1. Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA)

Previo al análisis por SDS-PAGE, las muestras fueron precipitadas mediante el agregado de solución de TCA 10% p/v final, y posterior incubación en hielo durante 30 minutos. Luego se centrifugó a 13000 g durante 10 minutos, a 4°C. Se descartó el sobrenadante y al precipitado se le agregó 800 µL de TCA 10% (v/v final). Se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante y al precipitado se le agregó 800 µL de acetona fría por tubo de reacción. Se centrifugó, se descartó el sobrenadante y se dejó evaporar el remanente de acetona, a temperatura ambiente. El material obtenido se resuspendió en un volumen apropiado de tampón de muestra 2X de SDS-PAGE (Tris/HCl 0.2 M, pH 8, urea 8 M, SDS al 2% m/v y azul de bromofenol) y se conservó a 4°C.

3.2.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

Las electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS fueron realizadas según lo descrito en [93]. Se utilizaron geles concentradores al 3% (m/v) y geles separadores al 10% o 12.5% (m/v), de 1.5 mm de espesor. Las electroforesis fueron realizadas en el sistema *Mini Protean 3* de Bio-Rad, a 30 mA constante y a temperatura ambiente. A las muestras disueltas en solución amortiguadora 2X o 6X se le agregó el agente reductor de puentes disulfuro ditioneitol (DTT) a concentración final 40 mM, y se calentaron a 100°C durante 5 minutos. En cada caso, como referencia se corrió una dilución de SHN que contiene el componente a analizar.

3.2.3. Transferencia húmeda a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF)

Las membranas de PVDF (*Millipore*, #IPVH00010) se incubaron con metanol durante 5 minutos. Posteriormente, tanto los geles de poliacrilamida como las membranas de PVDF se equilibraron en solución de transferencia (compuesta por Tris base 48 mM, glicina 39 mM y

metanol en distintas proporciones, dependiendo del experimento: 0%, 5% y 20% v/v en agua) y se dispusieron en el equipo de transferencia entre papeles de filtro embebidos en la misma solución (orden: ánodo/papeles de filtro/gel de poliacrilamida/membrana de PVDF/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 o a 300 mA durante 2 horas y media, ambos a 4°C. Finalizada la transferencia, las membranas de PVDF fueron incubadas con solución de bloqueo (PBS conteniendo el detergente Tween-20 al 0.1% m/v y BSA al 0.2% m/v) durante 1 hora a temperatura ambiente.

3.2.4. Western Blots

Las membranas de PVDF obtenidas en la forma descrita previamente, se lavaron con 50 mL de una solución de lavado (PBS conteniendo Tween-20 al 0.05% m/v). Luego se incubaron con 2 mL de la dilución del anticuerpo primario correspondiente en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C, con agitación. Los anticuerpos primarios se detallan para cada tipo de experimento más adelante. Una vez finalizada la incubación, se lavaron 3 veces con 50 mL (una vez durante 5 minutos y dos veces durante 10 minutos) con solución de lavado y se las incubó con 2 mL del anticuerpo secundario correspondiente diluido en solución de bloqueo durante 1 hora y media, con agitación y a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (*Calbiochem*, #401393) en dilución 1/5000 y 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 3 lavados en las mismas condiciones que las descritas para el anticuerpo primario, y se reveló mediante el agregado de sustrato quimioluminiscente (*ECL Supersignal West Pico Chemiluminiscent substrate*, Thermo Pierce, #34078). Los blots fueron visualizados en el equipo *Universal Hood II* de Bio-Rad o en el equipo *G-BOX* de Syngene. En los casos en los que así se indique, se realizó la cuantificación de la integral de intensidad sobre el área de las bandas empleando el software *ImageJ* versión k 1.45

3.3. Estrategia experimental

Los estudios realizados se basaron en ensayos *in vitro* de unión y activación del complejo C1, así como de activación del componente C2, sobre la superficie de partículas macroscópicas de la CL y sobre InsP_6 cálcico purificado.

Como se explicó previamente, la preparación del material de CL incluyó lavados con una solución con alta fuerza iónica (NaCl 2M), de modo de trabajar sólo con los componentes intrínsecos a la estructura, más los anticuerpos del hospedero que se encuentran específicamente unidos a la misma (que son difíciles de extraer y además relevantes al estudio).

Para todos los ensayos, la cantidad de InsP_6 cálcico purificado utilizada se corresponde a la cantidad de InsP_6 cálcico estimada presente en la muestra de CL control [18].

Este trabajo se encontraba enmarcado en un proyecto más amplio en el cual se estudiaron pasos posteriores de la cascada (hasta C5 inclusive) en presencia de SHN 1:60, de forma de eliminar la contribución de la VA. Si bien en este trabajo dicha vía no es relevante, se decidió realizar los ensayos con SHN dilución 1:60, de manera de continuar los estudios en las mismas condiciones experimentales [92].

Es importante aclarar que en todos los ensayos se trabajó con una concentración de CL de 6 mg/mL y una concentración de InsP_6 cálcico purificado de 2 mg/mL, por tubo de reacción, y con una dilución de SHN 1:60 o con la cantidad de C1 purificado presente en la dilución de SHN 1:60.

Para poner a punto el sistema, así como también para poder comprender de forma más simplificada la unión y activación del complejo C1 sobre los materiales de trabajo, primero se realizaron ensayos en condiciones de ausencia funcional C1-INH con CL de origen de hospedero de ratón. Posteriormente, los estudios se realizaron en presencia funcional de C1-INH y utilizando CL de origen de hospedero de ratón y de CL de origen de hospedero humano.

3.3.1. Estudios de unión de C1q sobre CL y sobre $InsP_6$ cálcico purificado.

Para este ensayo se trabajó con los materiales CL control, CL pre-tratada con EDTA e $InsP_6$ cálcico purificado manteniendo las concentraciones por tubo de reacción especificadas en la sección 3.3. Las muestras se incubaron con SHN durante una hora en baño de agua a 37°C (de manera de evitar la decantación durante el ensayo), y con agitación. La reacción se detuvo por pasaje a hielo. Posteriormente, las muestras se lavaron 5 veces con VBS⁺⁺ manteniendo un cociente de lavado de 1/10 cada vez. Se eluyeron las proteínas de la fase insoluble agregando 500 μ L de una solución de NaCl 2 M, conteniendo además $CaCl_2$ 0.5 M, que permite preservar los depósitos de $InsP_6$ cálcico. Además, se agregó 100 μ L de solución de lisozima 1 mg/mL, portadora de la precipitación posterior. Se incubó durante 30 minutos, a temperatura ambiente y con agitación. Se retiraron 600 μ L de sobrenadante de cada muestra y se precipitaron las proteínas presentes con TCA. Cada uno de los precipitados obtenidos se resuspendió en 30 μ L de solución amortiguadora de muestra 2X de SDS-PAGE y con DTT a una concentración final de 40 mM. Para este experimento se utilizaron geles separadores al 12.5% (m/v) y las transferencias se realizaron usando 20% de metanol. El volumen total de cada muestra (30 μ L) se sembró en un carril de SDS-PAGE y se analizó por western blot para C1q, utilizando un anticuerpo policlonal desarrollado en conejo contra la cadena A de C1q humano (Abcam, #ab155052), a una dilución de 1/500.

3.3.2. Estudios de unión y activación del complejo C1, en condiciones de ausencia funcional de C1-INH

Para estos ensayos se trabajó con CL control, CL EDTA e $InsP_6$ cálcico purificado. Además, cuando corresponda, se agregaron los materiales de CL reconstituída, CL pronasa y CL EDTA/pronasa (sección 3.1.2), manteniendo las concentraciones por tubo de reacción especificadas en la sección 3.3.

Los estudios de unión y activación del complejo en estas condiciones se realizaron incubando los materiales con complejo C1 purificado durante 1 hora a 37°C, o con SHN según se especifica a continuación.

Las muestras se incubaron con SHN de dos formas: (i) 30 minutos con agitación a 4°C, temperatura a la cual se espera que tenga lugar la unión del complejo C1 pero no su activación o (ii) 30 minutos con agitación a 4°C, seguido de 5 lavados con de VBS⁺⁺ en frío, manteniendo un cociente de lavado 1/10 cada vez, para eliminar las proteínas no unidas o débilmente unidas a la fase insoluble, y luego 1 hora a 37°C con agitación, para permitir la activación (en condiciones de ausencia de C1-INH) del complejo C1 que hubiera quedado unido durante la incubación a 4°C. En todos los casos, luego se lavó 5 veces con VBS⁺⁺ manteniendo un cociente de lavado 1/10 cada vez. Se llevó cada uno de los tubos a un volumen apropiado de modo de obtener la concentración de CL indicada previamente y una dilución de SHN 1:60, o de complejo C1 a una concentración final por tubo de reacción de 140 µg/mL (correspondiente a la concentración estimada de C1 presente en los ensayos realizados con SHN) y en presencia de una proteína irrelevante en exceso, en este caso BSA, a una concentración final de 1% p/v. Se eluyeron las proteínas de la fase insoluble agregando 300 µL de una solución de NaCl 2 M, conteniendo además CaCl₂ 0.5 M para preservar los depósitos de InsP₆ cálcico, en los casos que corresponda, como se explicó previamente. Además, se agregó 50 µL de solución de lisozima 1 mg/mL, portadora de la precipitación posterior. Se incubó durante 30 minutos, a temperatura ambiente y con agitación. Se retiraron 500 µL de sobrenadante y se procedió a concentrar las proteínas eluidas por precipitación con TCA (ver sección 3.2.1). Cada uno de los precipitados obtenidos se resuspendieron en 40 µL de tampón muestra 2X conteniendo DTT a una concentración final de 40 mM. Se transfirió usando 20 % de metanol. La mitad de cada muestra se sembró en un carril de SDS-PAGE y se analizó por Western Blot. Se utilizaron anticuerpos policlonales desarrollados en conejo contra C1r, que reconoce a C1r sin activar (83 kDa) así como al fragmento de activación de menor masa molecular (27 kDa), y contra C1s que reconoce a C1s sin activar (83 kDa) y a ambos fragmentos de activación (56 kDa y 27 kDa). Estos anticuerpos fueron gentilmente donados por el Dr. Robert Sim (Universidad de Oxford). Ambos anticuerpos se utilizaron una dilución de 1/100 y fueron incubados durante toda la noche a 4°C y con agitación.

3.3.3. Estudios de unión y activación del complejo C1 y del componente C2, en condiciones de presencia de C1-INH

Para estos ensayos se tomaron muestras de suspensión de CL control, de CL pre-tratada con EDTA y de $InsP_6$, manteniendo las cantidades y relaciones mencionadas en la sección 3.1. Las muestras se incubaron con SHN a distintos tiempos en baño de agua a 37°C y con agitación. La reacción se detuvo por pasaje a baño de hielo y agregado de 30 μ L de una solución de amortiguador muestra 6X de SDS-PAGE y DTT a una concentración final de 40 mM. Se sembraron 22 μ L de una alícuota de cada reacción (porción soluble e insoluble juntas) en cada carril de SDS-PAGE y se analizó por western blot para C1r, C1s, C1-INH y C2. En estas condiciones, se espera que C1-INH inhiba a C1, formando complejos covalentes con las proteasas activadas y disocie las mismas de C1q, motivo por el cual se estudió tanto la fase soluble como la fase insoluble. Para visualizar los complejos C1r-C1INH y C1s-C1INH (137 kDa), las transferencias se realizaron utilizando 0% o 5% de metanol. Se utilizó un anticuerpo policlonal contra C1-INH desarrollado en conejo (dilución 1/100), gentilmente donado por el Dr. Robert Sim (Universidad de Oxford). 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 fragmento de menor tamaño generado durante la activación (Santa Cruz Biotechnology, #sc-373809), a una dilución de 1/500. En este punto es necesario aclarar que la medición de la activación del componente C2 no se ve interferida por activación de C2 proveniente de la VL, debido a que ésta es despreciable en las condiciones experimentales utilizadas, tanto para CL de origen de ratón como para CL de origen humano.

3.4. Procesamiento de los datos obtenidos

3.4.1. Procesamiento de los datos de densitometría de Western Blot para la unión del complejo C1

En el caso de C1r, debido a que se utilizó un anticuerpo que reconoce la proteasa sin activar y el fragmento de activación de menor masa molecular (27 kDa), para calcular la unión total de C1r se utilizó la fórmula:

$$\text{Unión de C1r} = \text{C1r (83 kDa)} + \text{C1r activado (27 kDa)}$$

Para C1s, el anticuerpo utilizado reconoce tanto la proteasa sin activar, así como ambos fragmentos de activación, el de mayor masa molecular (56 kDa) y el de menor masa molecular (27 kDa), por lo que la fórmula utilizado para calcular la unión total de C1s fue:

$$\text{Unión de C1s} = \text{C1s (83 kDa)} + \text{C1s activado (56 kDa)} + \text{C1s activado (27 kDa)}$$

3.4.2. Procesamiento de datos de densitometría de Western Blot para activación de C1r y C1s, en condiciones de ausencia funcional de C1-INH

Se midió el grado de activación de las proteasas C1r y C1s en la fase insoluble, como se mencionó previamente en esta sección. Las fórmulas utilizadas fueron:

$$\text{Activación de C1r} = \frac{\text{C1r activado (27 kDa)}}{\text{C1r (83 kDa)} + \text{C1r activado (27 kDa)}}$$

$$\text{Activación de C1s} = \frac{\text{C1s activado (56 kDa)} + \text{C1s activado (27 kDa)}}{\text{C1s (83 kDa)} + \text{C1s activado (56 kDa)} + \text{C1s activado (27 kDa)}}$$

3.4.3. Procesamiento de datos de densitometría de Western Blot para activación de C1r y C1s, en condiciones de presencia de C1-INH

Como se detalla previamente en esta sección, así como en la sección Resultados, la activación de las proteasas C1r y C1s en estos experimentos se midió a partir de su inactivación, que da lugar a la formación de los complejos C1r-C1INH y C1s-C1INH. Las fórmulas utilizadas fueron:

$$\text{Activación de C1r} = \frac{\text{C1r-C1INH (137 kDa)}}{\text{C1r (27 kDa) + C1r-C1INH (137 kDa)}}$$

$$\text{Activación de C1s} = \frac{\text{C1s-C1INH (137 kDa)}}{\text{C1s (27 kDa) + C1s-C1INH (137 kDa)}}$$

3.4.4. Procesamiento de datos de densitometría de Western Blot para la activación del componente C2

La fórmula empleada fue:

$$\text{Activación de C2} = \frac{\text{C2b (32 kDa)}}{\text{C2 (102 kDa) + C2b (32 kDa)}}$$

4. Resultados

Esta sección se dividirá en dos partes; en la primera se describirán los resultados obtenidos utilizando hidátides provenientes de infecciones experimentales intraperitoneales en ratones, y en la segunda parte se expondrán los resultados obtenidos a partir de material hidático proveniente de infección natural en humano. La mayoría de los ensayos se realizaron con material de origen de ratón por las razones detalladas [92]. Brevemente, la primera razón es que la infección experimental por *E.granulosus* en ratones es similar a la que ocurre en hospederos intermediarios naturales, en el sentido que la inflamación también se resuelve [9]. La segunda es que, debido a que la hidátide se desarrolla en la cavidad peritoneal y no en parénquima de órganos (como sucede con los hospederos intermediarios naturales), es fácil separar limpiamente la CL de la CG y del tejido del hospedero. Y la tercera razón es que la región Fc de los anticuerpos se encuentra altamente conservada en mamíferos, lo que apareja que los anticuerpos de ratón activen la vía clásica del complemento humano [94] [95]. Además, el contenido y la forma física en la que se encuentra el InsP_6 cálcico, componente de la CL central en el análisis realizado, es similar entre hidátides de infección experimental (de origen de ratón) y natural (al menos de origen bovino) [18]. De todos modos, en la última parte del trabajo se presentan datos obtenidos utilizando material hidático de origen humano, importantes por implicar una interacción homóloga entre el origen de la CL y el origen del complemento.

4.1 Ensayos con material hidático de origen de ratón

4.1.1 Efecto de los gránulos de InsP_6 cálcico sobre el inicio de la activación de la VC, en condiciones de ausencia funcional de C1-INH

A partir del antecedente que el InsP_6 cálcico purificado es capaz de retener de forma selectiva C1q proveniente de SH [88], se propuso evaluar si esta interacción también ocurría en el contexto de la CL, y cuál era su efecto sobre el inicio de la activación de la VC. Para ello fue necesario generar un material de CL sin gránulos de InsP_6 cálcico ("CL EDTA"), el cual se obtuvo según se detalla en la sección 3.1.2.1 de Materiales y Métodos.

Se observó que efectivamente la CL retiene C1q a partir de SH, en forma mayoritariamente dependiente de la presencia de InsP_6 cálcico. Esto se desprende de comparar “CL control” y “CL EDTA” en la *Figura 4.1*: se puede apreciar que la unión de C1q a la CL es mucho más débil cuando previamente se eliminaron los gránulos de InsP_6 cálcico. Asimismo, se observa que hay un remanente de unión de C1q sobre la CL pre-tratada con EDTA, la cual presumiblemente se puede asignar a la interacción con los anticuerpos unidos *in vivo* a las mucinas, no removidos durante la preparación del material de trabajo, como se explicó en la sección 3.1 de Materiales y Métodos.

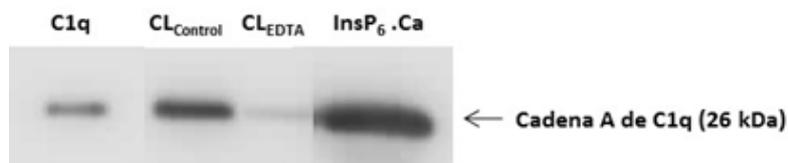


Figura 4.1. Unión del componente C1q sobre capa laminar de origen de ratón y sobre InsP_6 cálcico purificado. Se incubaron CL control (CL_{Control}) y CL pre-tratada con EDTA (CL_{EDTA}), así como InsP_6 cálcico purificado (InsP_6 .Ca), con suero humano normal (SHN) en dilución 1:60. Se realizaron varios lavados con tampón veronal salino conteniendo calcio y magnesio (VBS⁺⁺) para eliminar las proteínas no unidas o débilmente unidas a las fases insolubles. Las proteínas que quedaron retenidas fueron eluidas por incubación con una solución de alta fuerza iónica (NaCl2M). Las proteínas eluidas se concentraron por precipitación con ácido tricloroacético (TCA, ver sección 3.2.1 de Materiales y Métodos) y se analizaron por Western Blot con un anticuerpo contra la cadena A de C1q humano (26 kDa). Además de las muestras descritas, se corrió como referencia una muestra de 24 ng de C1q humano purificado. La cantidad de InsP_6 cálcico purificado utilizada se corresponde a la cantidad de InsP_6 cálcico estimada presente en la muestra de CL control.

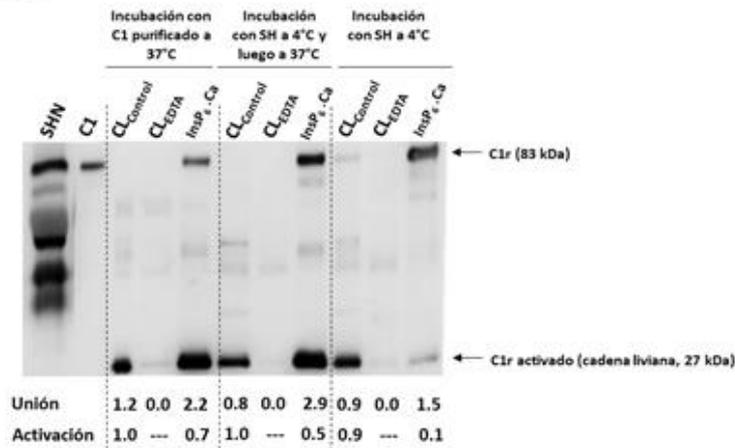
A partir de este resultado, se decidió determinar si la unión al InsP_6 cálcico abarca a todo el complejo C1, como se esperaría, y si se da de forma directa o por el contrario requiere de otras proteínas. Concomitantemente, se estudió si esta unión es capaz de activar el complejo C1, en condiciones de ausencia funcional de C1-INH. Esto se estudió en términos de la activación proteolítica de las proteasas C1r y C1s. En este punto es importante aclarar que se analizó solamente la activación de la fracción de las proteasas asociada con las fases insolubles, en el entendido que, en ausencia de C1-INH, el C1r y el C1s activados no se disocian de C1q y entonces permanecen asociados al complejo. Se utilizaron como fases insolubles CL control, CL pre-tratada con EDTA e InsP_6 cálcico purificado, y se emplearon como fuentes de C1 el propio complejo purificado (en presencia de un gran exceso de una proteína irrelevante)

o SHN. Se observó que la unión al InsP_6 cálcico de C1 purificado (en términos de C1r y C1s) no requiere la mediación de otras proteínas séricas, es decir que es directa (*Figura 4.2 A y 4.2 B, izquierda*). Asimismo se observó que la unión del complejo C1 para todas las condiciones es mayor sobre el InsP_6 cálcico purificado en comparación con el InsP_6 cálcico en el contexto de la CL (comparar “ InsP_6 .Ca” y “CL control”). Sin embargo, ocurrió lo contrario para la activación del complejo C1, la cual pareció ser mayor sobre el InsP_6 cálcico en el contexto de la CL que sobre el compuesto purificado. Estas diferencias se retomarán con más detalle en la sección Discusión. Con SHN se obtuvo similar resultado: la unión de C1 fue mayor sobre el InsP_6 cálcico purificado que sobre el compuesto en el contexto de la CL y, lo contrario ocurrió a nivel de la activación de las proteasas.

Curiosamente, en la incubación de los materiales con SH a 4°C (*Figura 4.2A y 4.2B, derecha*), durante la cual se esperaba que ocurriese la unión del complejo C1 pero no su activación, se observó cierto nivel de activación. Esto podría atribuirse a que la activación de las proteasas en ausencia funcional de C1-INH presente una cinética muy rápida, que implique que ocurra significativamente aún a 4°C .

En conjunto, el ensayo permite demostrar que efectivamente el InsP_6 cálcico en el contexto de la CL es capaz de activar la VC, al menos en condiciones de ausencia funcional de C1-INH.

(A) C1r



(B) C1s

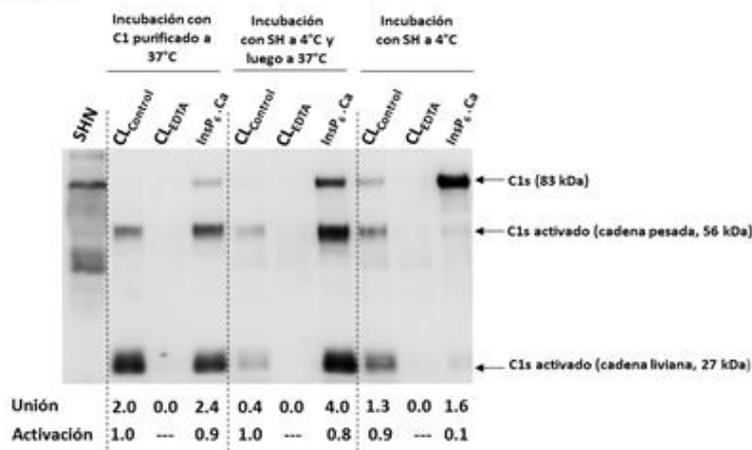


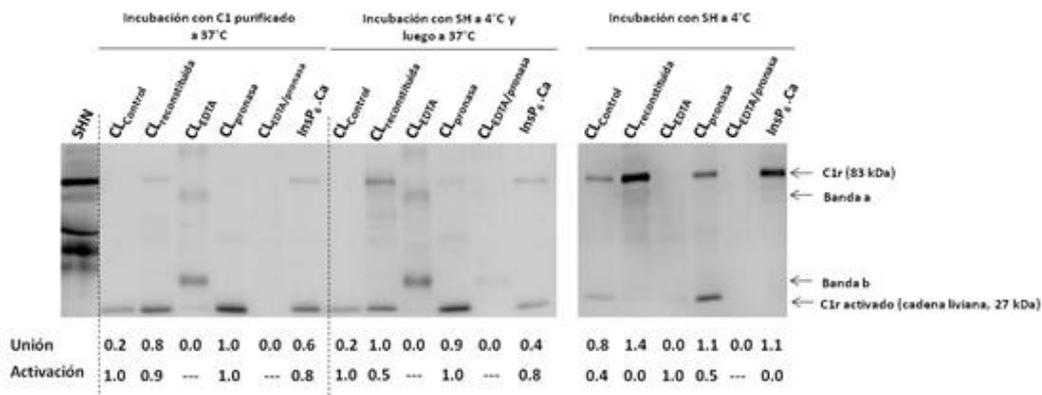
Figura 4.2. Unión y activación del complejo C1 sobre CL y sobre *InsP*₆ cálcico purificado, en condiciones de ausencia funcional de C1-INH. Se incubaron CL control y CL pre-tratada con EDTA, de origen de ratón, así como *InsP*₆ cálcico purificado con: (i) complejo C1 humano purificado, a 37°C para permitir la unión y activación de las proteasas; (ii) SHN a 4°C, seguido de lavados con VBS⁺⁺ y nuevamente incubación a 37°C, lo que permite la activación en condiciones de ausencia de C1-INH de lo que quedó unido durante la incubación a 4°C o (iii) SHN a 4°C. Se hicieron lavados con VBS⁺⁺, se eluyeron las proteínas unidas por incubación con una solución de alta fuerza iónica (NaCl 2M) y se concentraron las mismas por precipitación con TCA. Las muestras así obtenidas se analizaron por Western Blot con anticuerpos contra C1r (A) y C1s (B) humanos. En el caso de C1r, la activación se detecta en base a la aparición del fragmento de 27 kDa (el fragmento de mayor masa molecular no es reconocido por el anticuerpo). Para C1s, la activación se detecta por la aparición tanto del fragmento de 56 kDa como el de 27 kDa. Debajo de cada carril se indica el grado de unión del complejo C1 (expresado en unidades arbitrarias), en base a los datos obtenidos por densitometría, para cada una de las condiciones experimentales utilizadas, calculado como se indica en la sección 3.4.1 de Materiales y Métodos. Asimismo, se indica el grado de activación de cada una de las proteasas, calculado como se explica en la sección 3.4.2 de Materiales y Métodos. En los casos en que no se detectó unión de complejo C1, no se indica el grado de activación de las proteasas C1r o C1s por no haberse podido calcular. Además de las muestras descritas previamente, se sembró como referencia una dilución de SHN (SHN) que contiene aproximadamente 21 ng de C1, y 24 ng de complejo C1 humano purificado (C1). La cantidad de *InsP*₆ cálcico purificado utilizada se corresponde a la cantidad de *InsP*₆ cálcico estimada presente en la muestra de CL control.

Indagando en la interacción entre los gránulos de InsP_6 cálcico y la VC, se realizó un ensayo similar al descrito previamente, pero adicionando tres nuevos materiales de CL: CL reconstituida, obtenida a partir de CL pre-tratada con EDTA, a la cual se le agregó la cantidad correspondiente de InsP_6 cálcico purificado; CL pre-tratada con la preparación proteolítica pronasa (CL pronasa), lo que permite eliminar los anticuerpos que se encuentran unidos a la CL y así obtener un material de CL que contenga solamente gránulos de InsP_6 cálcico como posibles activadores de la VC; y CL pre-tratada con EDTA y con pronasa, eliminando así tanto los gránulos como los anticuerpos unidos a la CL.

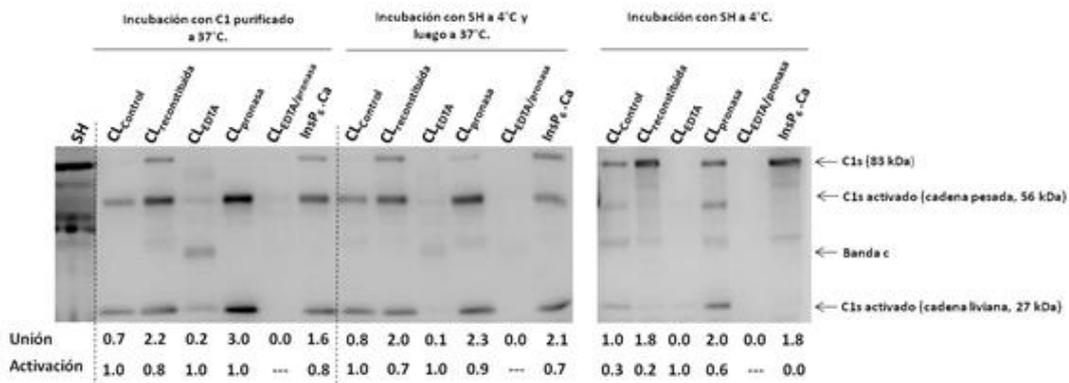
En la *Figura 4.3* se muestran los resultados obtenidos. Es importante resaltar que se repitieron los resultados obtenidos previamente con los materiales de CL control, CL pre-tratada con EDTA e InsP_6 cálcico purificado. En lo que respecta a los materiales de CL no ensayados previamente, es importante destacar en primer lugar que al reconstituir la CL pre-tratada con EDTA con InsP_6 cálcico purificado ("CL reconstituida") se recuperó la gran capacidad de la CL de unir C1. En segundo lugar, los resultados mostraron que el InsP_6 cálcico purificado, ya sea aislado (" $\text{InsP}_6\text{.Ca}$ ") o mezclado con la CL ("CL reconstituida"), tiene mayor capacidad de unir C1, pero menor capacidad de activar a las proteasas tras dicha unión, que el InsP_6 cálcico nativo presente en la CL ("CL control"); esto confirma los resultados obtenidos previamente en cuanto a que el InsP_6 cálcico purificado no se comporta de idéntica manera que el InsP_6 cálcico en la CL.

Además, se observó que la unión del complejo C1 a la CL se vio aumentada por el tratamiento con la preparación proteolítica pronasa (comparar CL control y CL pronasa), lo que sugiere que en la CL (control) el acceso de C1 se encuentra limitado estéricamente, y que esta limitación se reduciría por cierto nivel de proteólisis sobre la malla de mucinas. Esta idea explicaría la diferencia de comportamiento entre el InsP_6 cálcico sólo o agregado a la CL, y el InsP_6 cálcico en la CL, en términos de unión de C1 control. Sin embargo, no explicaría la diferencia en capacidad de activación de C1, ya que el C1 que se une tanto en la CL tratada con pronasa como en la CL control se activa totalmente en el tiempo del ensayo, lo que no ocurre con el C1 que se une al InsP_6 cálcico purificado, ya sea aislado o mezclado con CL pre-tratada con EDTA.

(A) C1r



(B) C1s



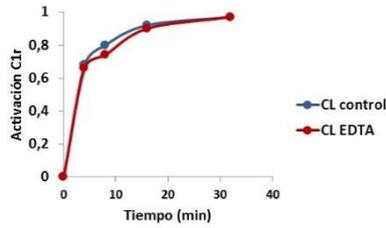
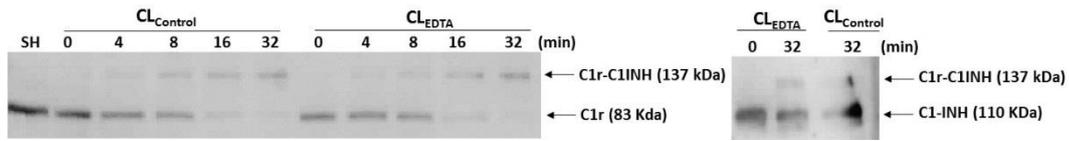
4.3. Unión y activación del complejo C1 sobre la CL sometida a distintos tratamientos, en condiciones de ausencia funcional de C1-INH. Se incubó CL de origen de ratón, control o sometida previamente a tratamientos con EDTA, con la preparación proteolítica pronasa para eliminar los anticuerpos unidos a la CL (CL_{pronasa}), con EDTA seguido de reconstitución con InsP₆ cálcico purificado (CL_{reconstituida}), con EDTA y pronasa para eliminar el InsP₆ cálcico y los anticuerpos unidos a la CL (CL_{EDTA/pronasa}) así como InsP₆ cálcico purificado con (i) complejo C1 purificado, (ii) SHN en dilución 1:60 primero a 4°C y luego a 37°C o (iii) SHN en dilución 1:60 a 4°C. El procesamiento y análisis de las muestras son iguales a lo explicado para la *Figura 4.2*. En (A) se muestran los resultados obtenidos para C1r y en (B) para C1s. Nótese que las bandas adicionales a las de C1r/C1s y C1r/C1s activados (bandas a, b y c), que aparecen solamente para el material de CL pre-tratado con EDTA, parecen ser debidas a una reacción inespecífica de los anticuerpos y no estar relacionadas con ninguno de los componentes del complejo C1. El Blot correspondiente a la condición de incubación a 4°C se muestra por separado porque corresponde a un gel diferente. Además de las muestras descritas previamente, se sembró como referencia una dilución de SHN (SHN) que contiene aproximadamente 21 ng de C1. La cantidad de InsP₆ cálcico purificado utilizada para reconstituir la CL se corresponde a la cantidad de InsP₆ cálcico estimado presente en las muestras de CL control.

4.1.2. Efecto de los gránulos de InsP_6 cálcico sobre el inicio de la activación de la VC, en condiciones de presencia funcional de C1-INH.

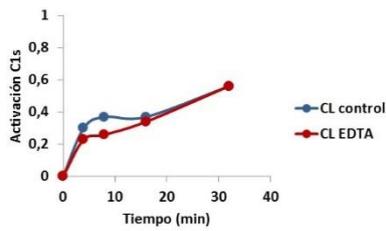
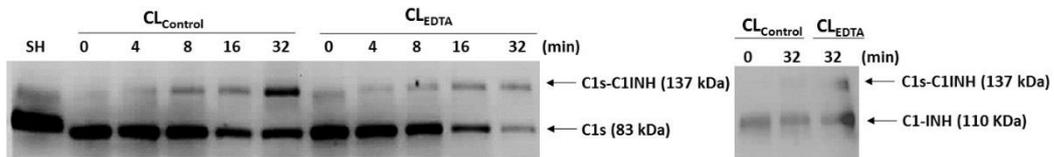
La estrategia experimental de la que se desprenden los siguientes resultados difiere significativamente de la empleada en los experimentos en ausencia funcional de C1-INH. En primer lugar, las incubaciones se realizaron directamente con SHN a 37°C, condición en la que se encuentran presente tanto C1-INH como otras proteínas séricas. Por otro lado, se corrió en los carriles de SDS-PAGE una muestra representativa de la reacción total en cada condición experimental, es decir que se analizó en conjunto la fase insoluble y la fase soluble, por lo que estos ensayos dan información sobre la activación total de C1, pero no sobre su unión. Esta diferencia en la estrategia experimental elegida se debe principalmente a que el mecanismo de acción de C1-INH consiste en desplazar las proteasas activadas de la fase insoluble hacia la soluble, por lo que en su presencia se vuelve necesario evaluar los parámetros de activación en ambas fases. Además, en estas condiciones el grado de activación de las proteasas C1r y C1s se estudió indirectamente a partir de la formación de los complejos covalentes C1r-C1-INH y C1s-C1-INH, por lo que estrictamente se debería hablar de inactivación; de todos modos, la formación de los complejos con C1-INH nos da información acerca de la activación de C1r y C1s.

En primer lugar se logró verificar, utilizando un anticuerpo contra C1-INH, que las bandas de alto peso molecular (137 kDa) se corresponden a los complejos formados entre C1-INH y las proteasas (*Figura 4.4, A y B*, paneles de la derecha). En segundo lugar, se observó que no hay diferencia en el grado de activación de C1r ni C1s al remover los gránulos de la CL, lo que se aparta significativamente de lo esperado en base a los resultados obtenidos para la unión (*Figura 4.1*) y activación de C1, en ausencia de C1-INH (*Figuras 4.2 y 4.3*) Esto parecería indicar que el InsP_6 cálcico presente en la CL (de origen de ratón) no contribuye a la activación de la VC. Sin embargo, si bien formalmente al experimento le falta un control de activación espontánea (SHN incubado con tampón solamente), se observó que el InsP_6 cálcico purificado sí parece ser capaz de activar C1 en SHN (*Figura 4.4, C y D*). En definitiva, en presencia de C1-INH (y otros componentes séricos), la presencia del InsP_6 cálcico no aumenta la capacidad de la CL de activar a C1, al menos para CL de origen de hospedero de ratón.

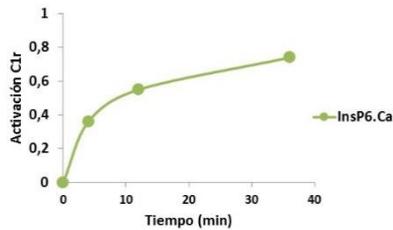
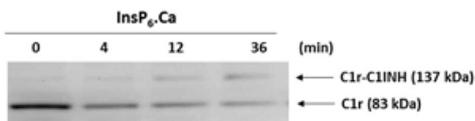
(A) C1r (CL de origen de ratón)



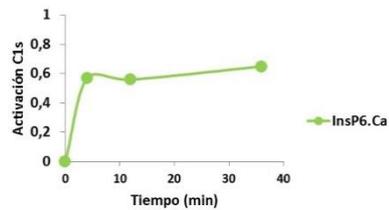
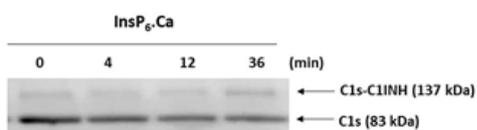
(B) C1s (CL de origen de ratón)



(C) C1r (InsP₆-Ca purificado)



(D) C1s (InsP₆-Ca purificado)

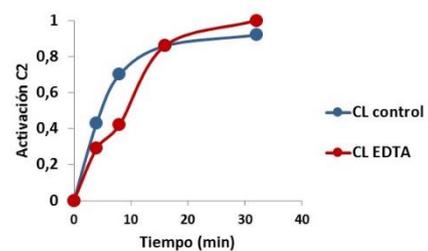
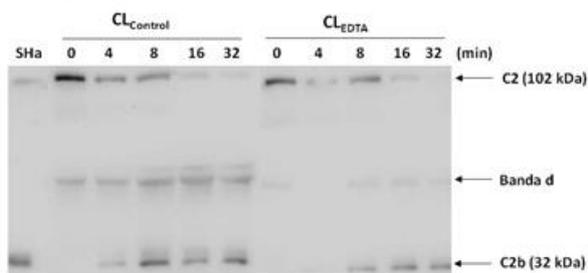


La Leyenda de la Figura 4.4 se encuentra en la página siguiente.

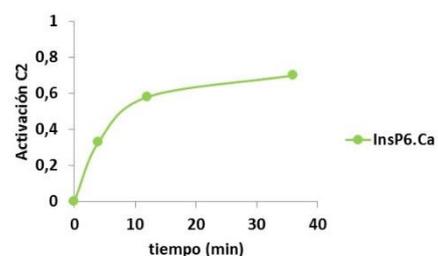
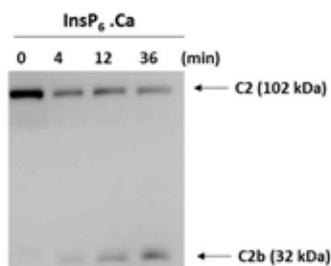
Figura 4.4. Unión y activación del complejo C1 sobre CL de origen de hospedero de ratón y sobre $InsP_6$ cálcico purificado, en condiciones donde se encuentra presente el C1-INH. Se incubaron CL control y CL pre-tratada con EDTA así como $InsP_6$ cálcico purificado, con SHN diluido 1:60, durante los tiempos indicados en la *Figura*. Se analizó una alícuota representativa de cada reacción (porción soluble e insoluble juntas) por Western Blot, utilizando los anticuerpos contra C1r y C1s empleados anteriormente, seguido de densitometría. Se muestra en (A) y en (B) la activación de C1r y C1s, respectivamente, sobre la CL; y en (C) y en (D) la activación C1r y C1s, respectivamente, sobre el $InsP_6$ cálcico purificado ($InsP_6.Ca$). La activación de C1r y C1s se puso en evidencia indirectamente, a partir de la formación de los complejos covalentes entre las proteasas activadas y el C1-INH. En las condiciones reductoras de la electroforesis utilizada, estos complejos mantienen sólo los fragmentos menores de las proteasas, por lo que migran a 137 kDa tanto el complejo C1r-C1INH como el C1s-C1INH. Se utilizó un anticuerpo contra C1-INH para corroborar la identidad de los complejos C1r-C1INH (A) y C1s-C1INH (B). Debajo (A y B) o a la derecha (C y D) de cada Western blot se muestra el gráfico correspondiente al grado de activación de las distintas proteasas, calculado como se explica en la sección 3.4.3 de Materiales y Métodos. La cantidad de $InsP_6$ cálcico purificado utilizada se corresponde a la cantidad de $InsP_6$ cálcico estimada presente las muestras de CL control.

En cuanto a la activación de C2, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos para C1 (*Figura 4.4*). Por un lado, los resultados parecen indicar que la presencia o ausencia de los gránulos de $InsP_6$ cálcico en el contexto de la CL, no interfiere con la activación de este componente, en los tiempos ensayados (*Figura 5A*). Sin embargo, si bien en este caso también al experimento le falta un control de activación espontánea, se observa cierto grado de activación de C2 sobre $InsP_6$ cálcico purificado (*Figura 5B*).

(A) C2 (CL de origen de ratón)



(B) C2 ($InsP_6.Ca$ purificado)



La Leyenda de la Figura 4.5 se encuentra en la página siguiente.

Figura 4.5. Activación del componente C2 sobre CL de origen de ratón y sobre $InsP_6$ cálcico purificado. Se incubó CL control, CL pre-tratada con EDTA o $InsP_6$ cálcico purificado con SHN en dilución 1:60, a 37°C durante los tiempos indicados. Se analizaron muestras representativas del total de cada reacción (fase insoluble y soluble juntas) por Western Blot, utilizando un anticuerpo que reconoce el fragmento de menor tamaño de C2 activado (denominado C2b, 32 kDa), seguido de densitometría. A la derecha se grafica la activación de C2, calculada como se explica en la sección 3.4.4 de Materiales y Métodos. Nótese que la banda adicional a la de C2 y C2b (banda d) que aparece en (A), parece ser debida a una reacción inespecífica del anticuerpo y no corresponde al componente C2. El término SHa refiere a SHN activado con Zymosán (paredes de levaduras), lo que permite generar la banda de C2b como referencia.

4.2. Ensayos con material hidático de origen humano

Se realizaron ensayos, menos amplios que los descritos previamente, sobre CL de origen humano con la intención de validar los resultados obtenidos para material hidático de origen de ratón.

4.2.1. Efecto de los gránulos de $InsP_6$ cálcico sobre el inicio de la activación de la VC, en condiciones de presencia de C1-INH.

En primer lugar, se verificó que la CL de origen humano también es capaz de unir C1 proveniente de SHN, y que dicha unión ocurre principalmente sobre los gránulos de $InsP_6$ cálcico, ya que se observa que disminuye significativamente al tratar a la CL con EDTA previo a su incubación con SHN (*Figura 4.6*). En este caso, la diferencia entre el grado de unión de C1 sobre la CL $InsP_6$ cálcico y la CL sin $InsP_6$ cálcico, no se observó tan marcadamente como para el material proveniente de ratón.

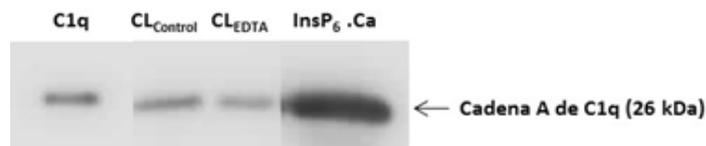


Figura 4.6. Unión del componente C1q sobre CL de origen humano y sobre $InsP_6$ cálcico purificado. El experimento del cual se desprenden estos resultados, así como el procesamiento de los datos obtenidos es igual al que fue explicado en la *Figura 4.1*.

A continuación, se evaluó qué ocurre a nivel de la activación de las proteasas C1r y C1s en condiciones de presencia de C1-INH (y otros componentes séricos) (Figura 4.7). Este experimento se realizó de la misma manera que fue previamente explicado para material proveniente de ratón (Figura 4.4). Para el material de origen de hospedero humano, se observó que la presencia de $InsP_6$ cálcico en la CL sí pareció contribuir positivamente a la activación de las proteasas C1r y C1s. De todos modos, el nivel de activación no se corresponde con el grado de unión de C1 sobre el $InsP_6$ cálcico; en otras palabras, la capacidad de unión de C1 no se ve reflejada en una capacidad acorde activación del complejo (comparar Figura 4.6 con 4.7)

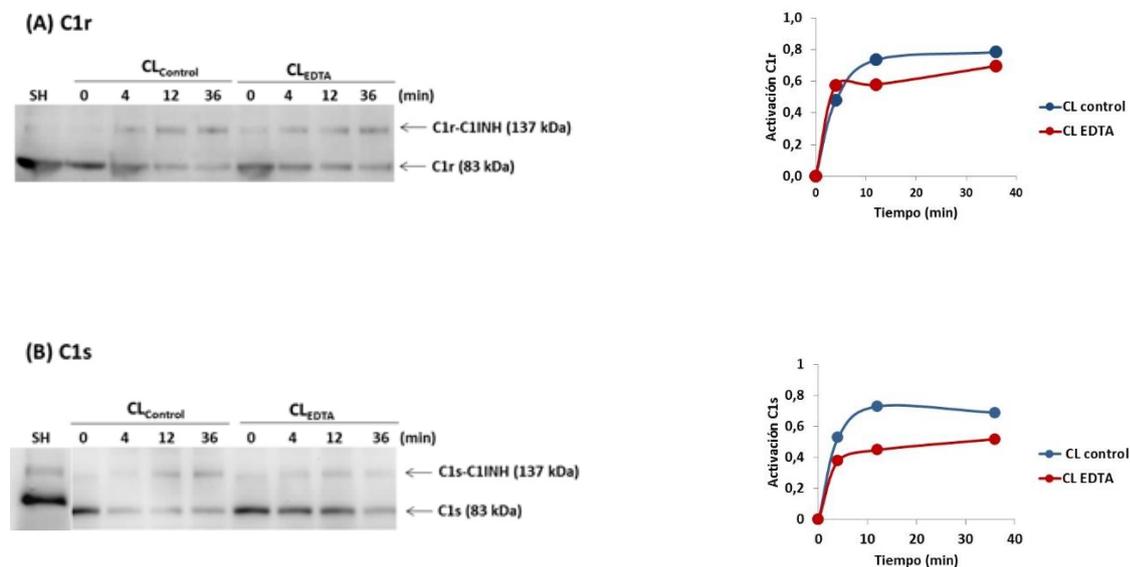


Figura 4.7. Unión y activación del complejo C1 sobre CL de origen humano, en condiciones en las que se encuentra presente C1-INH. El experimento que dio lugar a estos resultados, así como el procesamiento de los datos obtenidos, fue similar a lo explicado para la Figura 4.4, con la excepción de los tiempos utilizados. En (A) se presentan los resultados obtenidos para la activación de C1r y en (B) de C1s.

A partir de este resultado, se decidió evaluar si está contribución positiva de los gránulos de $InsP_6$ cálcico a nivel de la activación de C1 se veía reflejada en la capacidad de activar C2. Se observó que, para el último punto de tiempo ensayado (36 minutos), parece haber mayor activación de C2 en la CL control que en la CL sin $InsP_6$ cálcico (Figura 4.8). El resultado, sin embargo, se vio confundido por los valores aparentemente opuestos correspondientes al tiempo anterior (12 minutos), que involucran a un carril en el cual se sembró menor cantidad

de muestra, por lo que deben ser considerados dudosos. El experimento debería repetirse agregando un control de carga. De todos modos, el resultado sugiere preliminarmente que la contribución del InsP_6 cálcico también es levemente positiva a nivel de la activación de C2, en forma similar a lo observado para C1, trabajando con material de CL de origen de hospedero humano.

En suma, la aparente capacidad del InsP_6 cálcico purificado de activar C1 y C2 en SHN (*Figuras 4.4 y 4.5*) se ve reflejada, a nivel cualitativo, en una contribución del compuesto a la activación de estos componentes en la CL de origen humano (*Figuras 4.7 y 4.8*). Sin embargo, esta contribución es cuantitativamente muy pobre en relación a la contribución del InsP_6 cálcico a unir C1, y además no es detectable al trabajar con el sistema heterólogo (CL de origen de hospedero de ratón-complemento humano).

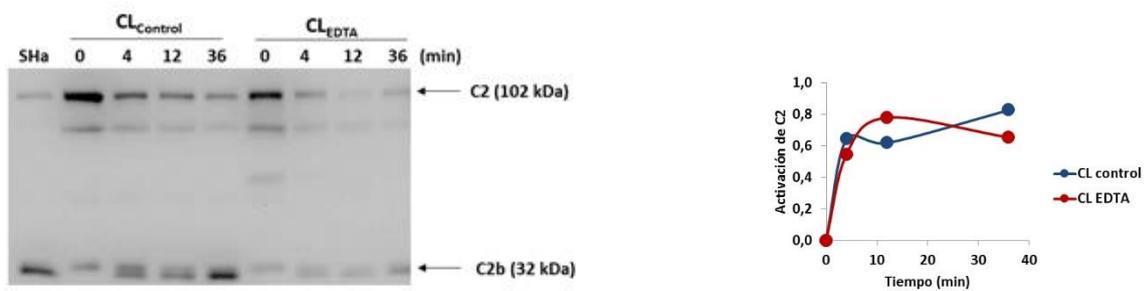


Figura 4.8. Activación del componente C2 sobre CL de origen humano. El experimento del cual se desprenden estos resultados, así como el procesamiento de los datos obtenidos es igual al explicado en la *Figura 4.5*.

5. Discusión

Como se dijo previamente, este trabajo surgió a partir de las observaciones del grupo que el InsP_6 cálcico sintético era capaz de unir C1q proveniente de SH, y que cuando se incubaba CL de la que el InsP_6 cálcico fue previamente eliminado con SH en dilución 1:4 *in vitro*, el depósito detectable de C3 era menor que en el caso de la CL control. Estos resultados dieron lugar a la hipótesis que el InsP_6 cálcico podría, a través de la unión de C1q, iniciar la activación de la VC. Los resultados de esta Tesina son compatibles, al menos en parte, con esta hipótesis. Sin embargo, se obtuvo evidencia que, si bien el InsP_6 cálcico es capaz de dar inicio a la VC en el contexto de la CL, ello ocurre en menor grado que lo esperado para las cantidades de InsP_6 cálcico unidas, probablemente porque la activación de las proteasas es altamente ineficiente en este contexto.

5.1. Influencia de gránulos de InsP_6 cálcico sobre el inicio de la VC

Para su mejor comprensión, esta sección se dividirá en tres partes. En la primera parte se discutirá lo que respecta a la unión del complejo C1, en la segunda lo relativo a la activación de las proteasas C1r y C1s en ausencia funcional de C1-INH y en la última parte la activación de dichas proteasas en presencia de C1-INH, así como los resultados obtenidos sobre la activación del componente C2.

5.1.1. Unión del complejo C1

En este trabajo se evidenció la unión del complejo C1 sobre los gránulos de InsP_6 cálcico en el contexto de la CL, además de sobre InsP_6 cálcico purificado. Tanto para la CL de origen de hospedero de ratón como para la de origen de hospedero humano, se observó unión de cantidades importantes de complejo C1 proveniente del SH, y que dicha unión se da mayoritariamente sobre los gránulos de InsP_6 cálcico. Si bien existían datos previos en términos de C1q, tanto con InsP_6 cálcico purificado [88] como con InsP_6 cálcico en el contexto de la CL [92], en este trabajo se expandieron dichos resultados, evidenciando la unión del

complejo C1 en términos de C1r y de C1s (*Figuras 4.2 y 4.3*) además de en términos de C1q (*Figuras 4.1 y 4.6*). Sin embargo, no se probó que la unión del complejo C1 es a través de la unión de C1q, lo que sí se demostró en ensayos posteriores realizados por A. Barrios, empleando C1q purificado.

Asimismo, este trabajo mostró por primera vez que la unión de C1 sobre el InsP_6 cálcico, presente en la CL o purificado, ocurre sin la mediación de otras proteínas séricas, es decir, se da de forma directa (*Figura 4.2, izquierda*).

Los resultados mostraron también que el InsP_6 cálcico presente en la CL une menor cantidad de C1 que lo que une similar cantidad del compuesto purificado (comparar en la *Figura 4.3* “CL control” con “CL reconstituida”, e “ InsP_6 .Ca” con “CL reconstituida”). Este resultado puede deberse, al menos en parte, a diferencias en el grado de acceso del complejo C1 al InsP_6 cálcico, que podría estar restringido por la red de mucinas de la CL. Esta idea se ve apoyada por la observación que tratamiento de la CL con la preparación proteolítica pronasa da lugar a un aumento en la unión de C1 en comparación con la CL control (*Figura 4.3: comparar “CL control” con “CL pronasa”*). En esta idea, el efecto de la pronasa podría afectar en cierto grado a las mucinas y a consecuencia de ello abrir la malla de fibrillas, permitiendo una mayor llegada del componente C1 a los gránulos de InsP_6 cálcico, en comparación con la CL control. La posibilidad que la pronasa actúe en este contexto simplemente eliminando proteínas adsorbidas *in vivo* al InsP_6 cálcico (de modo de generar sitios disponibles para la unión de C1) es improbable, ya que el protocolo de preparación de los distintos materiales de CL incluye lavados con alta fuerza iónica (NaCl 2M) que se ha visto previamente eliminan a las proteínas adsorbidas. De ser correctos estos razonamientos, el efecto del acceso debe ser importante ya que se observa que el InsP_6 cálcico purificado une más complejo C1 que igual masa de InsP_6 cálcico en el contexto de la CL, a pesar que en ésta última el tamaño de partícula es menor que en el compuesto purificado [18].

5.1.2. Activación del Complejo C1, en ausencia funcional de C1-INH.

La principal observación a destacar es que efectivamente el InsP_6 cálcico, tanto en el contexto del CL como purificado, activa a las proteasas C1r y C1s en condiciones de ausencia funcional de C1-INH (*Figuras 4.2 y 4.3*). Una segunda observación es que, para similares niveles de unión

de C1, el InsP_6 cálcico purificado, aislado o mezclado con la CL, activa en menor grado el complejo que el InsP_6 cálcico nativo de la CL. No tenemos explicación para esta diferencia, excepto plantear que las características de superficie del sólido sean alteradas por la digestión alcalina utilizada en su purificación [18].

5.1.3. Activación del Complejo C1, en presencia de C1-INH.

En primer lugar, los resultados obtenidos en condiciones de presencia funcional de C1-INH señalan que tanto la CL control como la CL que fue previamente tratada con EDTA activan C1 y C2, lo que es probablemente atribuible a la presencia de anticuerpos específicos unidos a las mucinas.

En segundo lugar, los resultados sugieren que la unión del complejo C1 sobre el InsP_6 cálcico efectivamente da lugar a cierto nivel de activación en presencia funcional de C1-INH. Esto surge de los resultados con InsP_6 cálcico purificado (*Figuras 4.4, C y D*), si bien en forma preliminar, ya que a estos experimentos formalmente les faltan controles de activación espontánea. La idea surge también de la observación que en el material de CL de origen humano, la activación total de C1r y C1s es mayor en material control que en el material del que se eliminó el InsP_6 cálcico (*Figura 4.7, A y B*). Algo similar parece ocurrir a nivel de la activación de C2 (*Figura 4.8*). En este punto es importante aclarar que los datos obtenidos corresponden a experimentos únicos en los cuales cada tiempo de incubación fue realizado sin repeticiones, por lo que los resultados deben tomarse con precaución. De verificarse la activación de C2 dependiente de InsP_6 cálcico, la implicancia es que este sólido puede, posiblemente a través de las proteínas adsorbidas, aceptar el depósito covalente de C4b. Resultados consistentes con esta idea han sido recientemente obtenidos por A. Barrios.

Los resultados obtenidos utilizando CL de origen de hospedero de ratón pueden ser compatibles con las ideas previas, pero se discutirán más adelante porque acarrear mayor complejidad de interpretación.

En tercer lugar, los resultados sugieren que la capacidad de unión de C1 que posee el InsP_6 cálcico en el contexto de la CL no se ve reflejada en una capacidad acorde de activación del complejo, en presencia funcional de C1-INH (comparar *Figuras 4.6 y 4.7*). Estos resultados pueden ser en parte explicados teniendo en cuenta que C1q se une a los polianiones a través

de la cara interna de las cabezas globulares, mientras que la unión a la región Fc de los anticuerpos se da a través de la cara externa de las mismas. Se cree que el modo de unión a polianiones apareja una capacidad de activación de C1 limitada en comparación con la que ocurre sobre los anticuerpos, en donde la unión previamente descrita promueve eficientemente los cambios conformacionales necesarios para que tenga lugar la activación del complejo [67]. Esto podría sumarse a que la presencia de polianiones puede aumentar la velocidad de inactivación de C1r y de C1s por C1-INH [80] [85].

En cuarto lugar, los resultados muestran disparidad de comportamiento entre los materiales de diferentes orígenes de hospedero: la presencia de $InsP_6$ cálcico no modifica la capacidad global de activación del complejo C1 ni del componente C2 sobre la CL de origen de ratón (*Figuras 4.4 y 4.5*), contrariamente a lo observado para material de origen humano, en el cual el $InsP_6$ cálcico contribuye de manera positiva, si bien débil, a la activación de dichos componentes (*Figuras 4.7 y 4.8*). Esto puede ser explicado proponiendo que los gránulos de $InsP_6$ cálcico, al unir grandes cantidades de C1, competirían con la unión de este componente sobre los anticuerpos. Esta competencia (con activación ineficiente) funcionaría en mayor grado en el caso de la CL de origen de ratón, por una interacción no tan ávida entre el C1q de origen humano y los anticuerpos de origen de ratón, y porque sobre la CL de origen de ratón hay mayor cantidad de anticuerpos (IgG y en particular IgM) que sobre la CL de origen humano (observaciones de A. Barrios), lo que haría que la cantidad de C1 en los ensayos fuera más limitante. Esto permitiría explicar porqué el efecto de los gránulos de $InsP_6$ cálcico sobre la iniciación de la VC es neutro en el material de origen de ratón y positivo en el material de origen humano.

5.2. Significado biológico de los resultados obtenidos

Con el fin de discutir los posibles significados biológicos de los resultados obtenidos en el marco de esta Tesina es importante reseñar que resultados de la Tesis de A. Barrios indican que la capacidad global de generar C5a (mediador que podría ser perjudicial para el parásito) no se ve alterada por la presencia de $InsP_6$ cálcico, en el sistema homólogo en particular (CL de origen humano-complemento de origen humano). Estas observaciones podrían explicarse por la suma de activación ineficiente de C1 sobre el $InsP_6$ cálcico, observada en esta Tesina, y

mecanismos adicionales de control de la propagación de la vía sobre el InsP_6 cálcico (observados en el trabajo de A. Barrios). En resumen, el InsP_6 cálcico no contribuye ni interfiere con la producción de C5a en el sistema homólogo.

Así, la hipótesis manejada inicialmente de que el papel de los gránulos de InsP_6 cálcico fuera inhibir la potencial activación de la VC sobre la CL generada por los anticuerpos no es apoyada en forma contundente por los resultados obtenidos en esta Tesina, ni en el contexto de la Tesis de Maestría de A. Barrios. Sin embargo, la posibilidad de inhibición de la activación de C1 sobre los anticuerpos por competencia depende de la cantidad, tipo y distribución de los anticuerpos en la CL (que se presume varía en el transcurso de la infección), así como por las concentraciones locales de C1q, cuya síntesis se encuentra a cargo de células provenientes del linaje monocítico, como los macrófagos [96][97]. En este contexto, es importante destacar que concomitante a la formación de la CL, aparecen depósitos granulares asimilables al InsP_6 cálcico [11]. En este marco, es planteable en particular una función de competencia por C1 por parte de los gránulos en etapas muy tempranas de la infección, cuando presumiblemente la cantidad de anticuerpos en la CL es baja.

Asimismo, se puede plantear que la unión de C1 por el InsP_6 cálcico constituya un mecanismo de evasión, ya no dirigido a inhibir la activación de la VC sobre la CL, sino a controlar la activación de la vía sobre las células del parásito (capa germinativa). En este razonamiento, la alta capacidad del InsP_6 cálcico de unir C1, sumada a la restricción al acceso de C1 impuesta por la malla de fibrillas, podría impedir la llegada de C1 funcional a la superficie de la capa germinativa. Esto impediría la activación de la VC sobre los anticuerpos unidos a la CG, que se sabe son de clase IgG y mayoritariamente de subclase IgG1 y se propone pueden, en ciertas circunstancias, conducir a la muerte de las células del parásito por apoptosis [98] [99].

Como se mencionó en la Introducción de este trabajo, la diversidad de ligandos de C1q hace que ésta sea una molécula muy versátil, que participa en múltiples procesos moleculares y celulares, ajenos al sistema complemento. En lo que refiere su participación en la respuesta inmune, C1q posee propiedades reguladoras tanto sobre la inmunidad innata como en la adaptativa. A nivel de la respuesta innata, puede inducir la polarización de macrófagos hacia un fenotipo M2, así como también limitar la activación del inflammasoma en macrófagos humanos [100]. Adicionalmente, el C1q puede regular el desarrollo, a partir de monocitos, de células dendríticas con un perfil antiinflamatorio [101]. Recientemente, Carlos Minutti y Judith E. Allen demostraron que C1q actúa como un cofactor para la proliferación de

macrófagos tisulares así como para la diferenciación de los mismos a un perfil M2, ambos procesos inducidos por IL-4 [102]. Las evidencias anteriores abren la posibilidad que los gránulos de InsP_6 cálcico de la CL tengan una función moduladora sobre las células del sistema inmune presentes en la vecindad de la hidátide a través de su capacidad de unir C1q. En otras palabras, C1q podría ser secuestrado por la hidátide, evitando de esta manera posibles efectos negativos para el parásito, como la proliferación de macrófagos y/o la inducción de una respuesta de tipo inflamatoria en las células dendríticas. Esto podría contribuir a la generación de una respuesta de tipo antiinflamatorio, característica de las infecciones por parásitos helmintos.

6. Conclusiones

En el presente trabajo se demostró que existe inicio de la activación de la VC sobre la CL, y que si bien ésta es en gran parte independiente del componente InsP_6 cálcico, este compuesto puede contribuir a dicho inicio. Más en detalle, se verificó que el InsP_6 cálcico en la CL es capaz de unir grandes cantidades de C1, y que esta unión ocurre de forma directa. Además se observó que el compuesto, tanto purificado como en el contexto de la CL, es capaz de activar al complejo C1. Sin embargo, la capacidad de unir C1 por parte del InsP_6 cálcico no se ve reflejada en una capacidad acorde de activación de C1 y de C2, en condiciones similares a las fisiológicas. El efecto neto de la presencia del InsP_6 cálcico en el contexto de la CL en el sistema homólogo (anticuerpos unidos a la CL humanos-complemento humano), de interés biológico, es un nivel de activación C1r, C1s y C2 levemente mayor que el que tiene lugar en su ausencia. En un sistema heterólogo (anticuerpos unidos a la CL de ratón-complemento humano) dicho efecto neto es neutro, probablemente debido a combinación de competencia por C1 y activación ineficiente.

Así, los resultados en conjunto sugieren que sobre el InsP_6 cálcico ocurre un inicio de activación de la VC que es ineficiente y que podría, al menos en ciertas condiciones, competir con la posibilidad de activación de dicha vía sobre los anticuerpos, en el contexto de la CL, e incluso de la CG.

7. Bibliografía

- [1] H. J. McSorley and R. M. Maizels, "Helminth infections and host immune regulation," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 25, no. 4, pp. 585–608, 2012.
- [2] D. E. Elliott, R. W. Summers, and J. V. Weinstock, "Helminths as governors of immune-mediated inflammation," *Int. J. Parasitol.*, vol. 37, no. 5, pp. 457–464, 2007.
- [3] R. C. A. Thompson, *Biology and Systematics of Echinococcus*, vol. 95. Elsevier Ltd, 2017.
- [4] 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.
- [5] 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," *Medline*, vol. 21, no. 2, pp. 166–175, 2016.
- [6] P. Moro and P. M. Schantz, "Echinococcosis: a review," *Int. J. Infect. Dis.*, vol. 13, no. 2, pp. 125–133, 2009.
- [7] P. L. Moro and P. M. Schantz, "Echinococcosis: historical landmarks and progress in research and control," *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, vol. 100, no. 8, pp. 703–714, 2006.
- [8] R. Y. Yu *et al.*, "Community surveys and risk factor analysis of human alveolar and cystic echinococcosis in Ningxia Hui Autonomous Region, China," *Bull. World Health Organ.*, vol. 84, no. 9, pp. 714–721, 2006.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] A. Díaz, C. Casaravilla, J. E. Allen, R. B. Sim, and A. M. Ferreira, "Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* I: structure," *Trends Parasitol.*, vol. 27, no. 6, pp. 264–273, 2011.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] K. Ingold, B. Gottstein, and A. Hemphill, "High molecular mass glycans are major structural elements associated with the laminated layer of in vitro cultivated *Echinococcus multilocularis* metacestodes," *Int. J. Parasitol.*, vol. 30, no. 2, pp. 207–214, 2000.
- [16] K. Ingold, W. Dai, R. L. Rausch, B. Gottstein, and A. Hemphill, "Characterization of the laminated layer of in vitro cultivated *Echinococcus vogeli* metacestodes," *J. Parasitol.*, vol. 87, no. 1, pp. 55–64, 2001.
- [17] K. S. Richards, C. Arme, and J. F. Bridges, "Echinococcus granulosus equinus: an ultrastructural study of murine tissue response to hydatid cysts," *Parasitology*, vol. 86 (Pt 3), pp. 407–417, 1983.
- [18] C. Casaravilla *et al.*, "Characterization of myo-inositol hexakisphosphate deposits from larval *Echinococcus granulosus*," *FEBS J.*, vol. 273, no. 14, pp. 3192–3203, 2006.
- [19] F. Irigoín, F. Ferreira, C. Fernandez, R. B. M. Sim, and A. Díaz, "myo-Inositol hexakisphosphate is a major component of and extracellular structure in the parasitic cestode *Echinococcus granulosus*," *Biochem. J.*, vol. 304, pp. 297–304, 2002.
- [20] 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.
- [21] A. 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.
- [22] A. Kilejian, K. Sauer, and C. W. Schwabe, "Host-parasite relationships in echinococcosis. VIII. Infrared spectra and chemical composition of the hydatid cyst," *Exp. Parasitol.*, vol. 12, no. 5, pp. 377–392, 1962.

- [23] A. Kilejian and C. W. Schwabe, "Studies on the polysaccharides of the *Echinococcus granulosus* cyst, with observations on a possible mechanism for laminated membrane formation," *Comp. Biochem. Physiol. -- Part B Biochem.*, vol. 40, no. 1, pp. 25–36, 1971.
- [24] 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.
- [25] I. J. Tsai *et al.*, "The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism," *Nature*, vol. 496, no. 7443, pp. 57–63, 2013.
- [26] R. F. Irvine and M. J. Schell, "Back in the Water: the return of the inositol phosphates.," *J. Palliat. Med.*, vol. 14, no. 8, pp. 971–972, 2011.
- [27] 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.
- [28] 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 μ M under cytosolic/nuclear conditions," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 100, no. 11, pp. 1800–1810, 2006.
- [29] J. D. York, A. R. Odom, R. Murphy, E. B. Ives, R. Susan, and S. R. Wentz, "A Phospholipase C-Dependent Inositol Polyphosphate Kinase Pathway Required for Efficient Messenger RNA Export Published by: American Association for the Advancement of Science Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/2898264> A Phospholipase C-Dependent I," vol. 285, no. 5424, pp. 96–100, 1999.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] 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. 168–172, 2000.
- [33] M. A. Andrade, M. Siles-Lucas, E. Espinoza, J. L. P. Arellano, B. Gottstein, and A. Muro, "Echinococcus multilocularis laminated-layer components and the E14t 14-3-3 recombinant protein decrease NO production by activated rat macrophages in vitro,"

- Nitric Oxide - Biol. Chem.*, vol. 10, no. 3, pp. 150–155, 2004.
- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] N. J. R. Steers, M. T. Rogan, and S. Heath, “In-vitro susceptibility of hydatid cysts of *Echinococcus granulosus* to nitric oxide and the effect of the laminated layer on nitric oxide production,” *Parasite Immunol.*, vol. 23, no. 8, pp. 411–417, 2001.
- [37] A. W. Dodds and R. B. Sim, *Complement A practical approach*. 1997.
- [38] 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.
- [39] J. R. Dunkelberger and W.-C. Song, “Complement and its role in innate and adaptive immune responses,” *Cell Res.*, vol. 20, no. 1, pp. 34–50, 2010.
- [40] M. a Klein *et al.*, “Complement facilitates early prion pathogenesis,” *Nat. Med.*, vol. 7, no. 4, pp. 488–92, 2001.
- [41] B. P. Morgan and P. Gasque, “Extrahepatic complement biosynthesis: where, when and why?,” *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 107, no. 1, pp. 1–7, 1997.
- [42] J. H. Lu *et al.*, “The classical and regulatory functions of C1q in immunity and autoimmunity,” *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 5, no. 1, pp. 9–21, 2008.
- [43] S. Freeley, C. Kemper, and G. Le Friec, “The ‘ins and outs’ of complement-driven immune responses,” *Immunol. Rev.*, vol. 274, no. 1, pp. 16–32, 2016.
- [44] G. Bajic, S. E. Degn, S. Thiel, and G. R. Andersen, “Complement activation, regulation, and molecular basis for complement-related diseases,” *EMBO J.*, vol. 34, no. 22, pp. 2735–2757, 2015.
- [45] D. P. Schafer *et al.*, “Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner,” *Neuron*, vol. 74, no. 4, pp. 691–705, 2012.
- [46] T. Haynes *et al.*, “Complement anaphylatoxin C3a is a potent inducer of embryonic chick retina regeneration,” *Nat. Commun.*, vol. 4, no. May, pp. 1–11, 2013.
- [47] H. Hawlisch and J. Köhl, “Complement and Toll-like receptors: Key regulators of adaptive immune responses,” *Mol. Immunol.*, vol. 43, no. 1–2, pp. 13–21, 2006.
- [48] A. P. Sjöberg, L. A. Trouw, and A. M. Blom, “Complement activation and inhibition: a

- delicate balance," *Trends Immunol.*, vol. 30, no. 2, pp. 83–90, 2009.
- [49] A. K. Abbas, "Cellular and Molecular Immunology." 2014.
- [50] U. Kishore *et al.*, "Structural and functional anatomy of the globular domain of complement protein C1q," *Immunol. Lett.*, vol. 95, no. 2, pp. 113–128, 2004.
- [51] I. H. Lepow, G. B. Naff, E. W. Todd, J. Pensky, and C. F. Hinz, "Chromatographic resolution of the first component of human complement into three activities," *J. Exp. Med.*, vol. 1255, 1963.
- [52] G. J. Arlaud, C. Gaboriaud, N. M. Thielens, M. Budayova-Spano, V. Rossi, and J. C. Fontecilla-Camps, "Structural biology of the C1 complex of complement unveils the mechanisms of its activation and proteolytic activity," *Mol. Immunol.*, vol. 39, no. 7–8, pp. 383–394, 2002.
- [53] G. J. Arlaud, M. G. Colomb, and J. Gagnon, "A functional model of the human C1 complex. Emergence of a functional model," *Immunol. Today*, vol. 8, no. 4, pp. 106–111, 1987.
- [54] C. J. Strang, R. C. Siegel, M. L. Phillips, P. H. Poon, and V. N. Schumaker, "Ultrastructure of the first component of human complement: electron microscopy of the crosslinked complex," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 79, no. January, pp. 586–590, 1982.
- [55] C. Gaboriaud, N. M. Thielens, L. A. Gregory, V. Rossi, J. C. Fontecilla-Camps, and G. J. Arlaud, "Structure and activation of the C1 complex of complement: Unraveling the puzzle," *Trends Immunol.*, vol. 25, no. 7, pp. 368–373, 2004.
- [56] N. R. Cooper, *The Classical Complement Pathway: Activation and Regulation of the First Complement Component*, vol. 37, no. C. 1985.
- [57] A. Szalai, A. Agrawal, T. Greenhough, and J. Volanakis, "C-reactive protein: structural biology and host defense function," *Clin Chem Lab Med*, vol. 37, no. 3, p. 265–70., 1999.
- [58] W. Bredt, B. Wellek, H. Brunner, and M. Loos, "Interactions between mycoplasma pneumoniae and the first components of complement," *Infect. Immun.*, vol. 15, no. 1, pp. 7–12, 1977.
- [59] F. Santoro, M. A. Ouaisi, J. Pestel, and A. Capron, "Interaction between *Schistosoma mansoni* and the complement system: binding of C1q to schistosomula," *J. Immunol.*, vol. 124, no. 3, pp. 2886–2891, 1980.
- [60] R. Wallis, D. A. Mitchell, R. Schmid, W. J. Schwaeble, and A. H. Keeble, "Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation,"

- Immunobiology*, vol. 215, no. 1, pp. 1–11, 2010.
- [61] P. Tacnet-Delorme, S. Chevallier, and G. J. Arlaud, “-Amyloid Fibrils Activate the C1 Complex of Complement Under Physiological Conditions: Evidence for a Binding Site for A on the C1q Globular Regions,” *J. Immunol.*, vol. 167, no. 11, pp. 6374–6381, 2001.
- [62] J. S. Navratil, S. C. Watkins, J. J. Wisnieski, and J. M. Ahearn, “The globular heads of C1q specifically recognize surface blebs of apoptotic vascular endothelial cells,” *J. Immunol.*, vol. 166, no. 5, pp. 3231–9, 2001.
- [63] H. Païdassi, P. Tacnet-Delorme, T. Lunardi, G. J. Arlaud, N. M. Thielens, and P. Frchet, “The lectin-like activity of human C1q and its implication in DNA and apoptotic cell recognition,” *FEBS Lett.*, vol. 582, no. 20, pp. 3111–3116, 2008.
- [64] H. Paidassi *et al.*, “C1q Binds Phosphatidylserine and Likely Acts as a Multiligand-Bridging Molecule in Apoptotic Cell Recognition,” *J. Immunol.*, vol. 180, no. 4, pp. 2329–2338, 2008.
- [65] D. A. Fraser, A. K. Laust, E. L. Nelson, and A. J. Tenner, “C1q Differentially Modulates Phagocytosis and Cytokine Responses during Ingestion of Apoptotic Cells by Human Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells,” *J. Immunol.*, vol. 183, no. 10, pp. 6175–6185, 2009.
- [66] S. Bureeva *et al.*, “Selective inhibition of the interaction of C1q with immunoglobulins and the classical pathway of complement activation by steroids and triterpenoids sulfates,” *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 15, no. 10, pp. 3489–3498, 2007.
- [67] 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. 808–812, 2010.
- [68] R. B. Sim, G. J. Arlaud, and M. G. Colomb, “C1 inhibitor-dependent dissociation of human complement component C1 bound to immune complexes,” *Biochem. J.*, vol. 179, no. 3, pp. 449–57, 1979.
- [69] R. J. Ziccardi and N. R. Cooper, “Active Disassembly of the First Complement Component, C1, by C1 Inactivator,” *J. Immunol.*, vol. 123, no. 2, pp. 788–792, 1979.
- [70] S. C. Bock *et al.*, “Human C1 inhibitor: primary structure, cDNA cloning, and chromosomal localization,” *Biochemistry*, vol. 25, no. 15, pp. 4292–4301, 1986.
- [71] a H. Schmaier *et al.*, “Synthesis and expression of C1 inhibitor by human umbilical vein endothelial cells,” *J. Biol. Chem.*, vol. 264, no. 0021–9258 (Print), pp. 18173–18179,

- 1989.
- [72] J. C. Bensa, A. Reboul, and M. G. Colomb, "Biosynthesis in vitro of complement subcomponents C1q, C1s and C1 inhibitor by resting and stimulated human monocytes," *Biochem.J.*, vol. 216, no. 0264–6021 (Print), pp. 385–392, 1983.
- [73] A. H. Schmaier, P. M. Smith, and R. W. Colman, "Platelet C1 inhibitor. A secreted alpha-granule protein," *J. Clin. Invest.*, vol. 75, no. 1, pp. 242–250, 1985.
- [74] G. K. . Enderson, "Immunological studies of plasma protease inhibitors associated with human blood platelets," no. c, pp. 157–163, 1980.
- [75] G. Sjöholm, "C1 SUBCOMPONENT COMPLEXES IN NORMAL AND PATHOLOGICAL SERA STUDIED BY CROSSED," pp. 455–464, 1976.
- [76] E. J. Folkard, B. Gardner, and N. C. Hughes-Jones, "The relationship between the binding ability and the rate of activation of the complement component C1.," *Immunology*, vol. 41, no. 1, pp. 179–85, 1980.
- [77] F. K. Kerr *et al.*, "Elucidation of the substrate specificity of the MASP-2 protease of the lectin complement pathway and identification of the enzyme as a major physiological target of the serpin, C1-inhibitor," *Mol. Immunol.*, vol. 45, no. 3, pp. 670–677, 2008.
- [78] T. Fujita Misao Matsushita, S. Thiel, J. C. Jensenius, M. Matsushita, I. Terai, and T. Fujita, "Protease Mannose-Binding Lectin-Associated Serine Proteolytic Activities of Two Types of Proteolytic Activities of Two Types of Mannose-Binding Lectin-Associated Serine Protease," *J Immunol Ref. J. Immunol. Tech. Hochschule Aachen April*, vol. 165, no. 13, pp. 2637–2642, 2000.
- [79] S. V. Petersen, S. Thiel, L. Jensen, T. Vorup-Jensen, C. Koch, and J. C. Jensenius, "Control of the classical and the MBL pathway of complement activation," *Mol. Immunol.*, vol. 37, no. 14, pp. 803–811, 2001.
- [80] 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.
- [81] A. D. Schreiber, A. P. Kaplan, and K. F. Austen, "Inhibition by C1INH of Hagemann factor fragment activation of coagulation, fibrinolysis, and kinin generation.," *J. Clin. Invest.*, vol. 52, no. 6, pp. 1402–1409, 1973.
- [82] A. de Agostini, H. R. Lijnen, R. A. Pixley, R. W. Colman, and M. Schapira, "Inactivation of factor XII active fragment in normal plasma. Predominant role of C1-inhibitor," *J. Clin.*

- Invest.*, vol. 73, no. 6, pp. 1542–1549, 1984.
- [83] E. PAPPALARDO, “Mechanisms of C1-Inhibitor Deficiency,” *Immunobiology*, vol. 205, no. 4–5, pp. 542–551, 2002.
- [84] A. E. Davis, P. Mejia, and F. Lu, “Biological activities of C1 inhibitor,” *Mol. Immunol.*, vol. 45, no. 16, pp. 4057–4063, 2008.
- [85] W. a Wullemin, H. te Velthuis, Y. T. Lubbers, C. P. de Ruig, E. Eldering, and C. E. Hack, “Potentiation of C1 inhibitor by glycosaminoglycans: dextran sulfate species are effective inhibitors of in vitro complement activation in plasma,” *J. Immunol.*, vol. 159, no. 4, pp. 1953–1960, 1997.
- [86] 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.
- [87] A. Diaz, A. Ferreira, and R. B. Sim, “Complement Evasion by *Echinococcus granulosus*,” no. 22, 1997.
- [88] 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.
- [89] Á. Díaz, F. Irigoín, F. Ferreira, and R. B. Sim, “Control of host complement activation by the *Echinococcus granulosus* hydatid cyst,” pp. 91–98, 1999.
- [90] E. A. Coltorti and V. M. Varela-Díaz, “Penetration of host IgG molecules into hydatid cysts,” *Zeitschrift für Parasitenkd.*, vol. 48, no. 1, pp. 47–51, 1975.
- [91] G. Mourglia-ettlin, J. Martí, A. Chabalgoity, and S. Dematteis, “Early Peritoneal Immune Response during *Echinococcus granulosus* Establishment Displays a Biphasic Behavior,” vol. 5, no. 8, pp. 1–11, 2011.
- [92] “A. Barrios ‘ Activación y control de la vía clásica del complemento sobre la capa laminar de *Echinococcus granulosus* ’ Lic. Anabella Barrios : Tutor Dr. Álvaro Díaz, Tesis de Maestría. PEDECIBA Biología, Biología celular y molecular, febrero 2017,” p. 2017, 2017.
- [93] U. K. Laemmli, “Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4,” 1970.
- [94] J. L. Dangel, 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,” vol. 7, no. 7, pp. 1989–1994, 1989.
- [95] N. A. Daha *et al.*, “Complement activation by (auto-) antibodies,” vol. 48, pp. 1656–1665, 2011.
- [96] G. Castellano *et al.*, “Maturation of dendritic cells abrogates C1q production in vivo and in vitro,” vol. 103, no. 10, pp. 3813–3821, 2004.
- [97] W. Müller, H. Hanauske-abel, M. Loos, W. M. Jller, and H. Hanauske-abel, “Biosynthesis of the First Component of Complement by Human and Guinea Pig Peritoneal Macrophages : Evidence for an Independent Production of the C1 Subunits Information about subscribing to The Journal of Immunology is online at : BIOSYNTHESIS OF THE FIRS,” vol. 121, pp. 1578–1584, 1978.
- [98] R. Paredes, P. Godoy, G. Cabrera, and C. Cabezo, “Bovine (Bos taurus) Humoral Immune Response Against Echinococcus granulosus and Hydatid Cyst infertility,” vol. 199, no. October 2010, pp. 189–199, 2011.
- [99] S. Riesle, M. P. García, C. Hidalgo, N. G. L. S, and R. Paredes, “Bovine IgG subclasses and fertility of Echinococcus granulosus hydatid cysts,” *Vet. Parasitol.*, 2014.
- [100] M. E. Benoit *et al.*, “Complement Protein C1q Directs Macrophage Polarization and Limits Inflammasome Activity during the Uptake of Apoptotic Cells,” 2012.
- [101] B. King, J. Guan, L. Min, and J. Lu, “C1q regulation of dendritic cell development from monocytes with distinct cytokine production and T cell stimulation,” *Mol. Immunol.*, vol. 48, no. 9–10, pp. 1128–1138, 2011.
- [102] C. M. Minutti *et al.*, “Local amplifiers of IL-4R α – mediated macrophage activation promote repair in lung and liver,” vol. 20067, no. May, 2017.