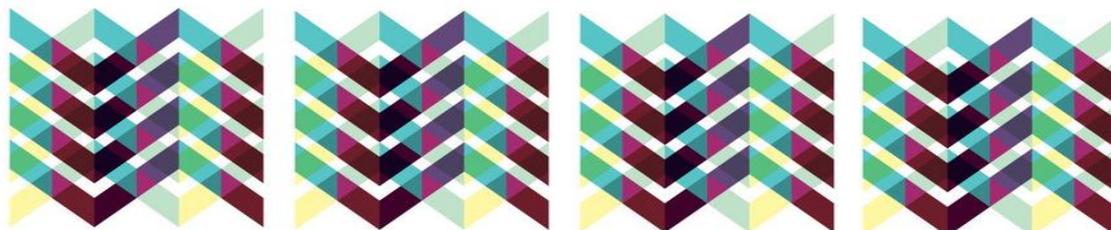


**“Caracterización de glicoproteínas de *Fasciola hepatica* y evaluación de su capacidad inmunomoduladora sobre células dendríticas”**



**Tesis de Maestría**

**en Biología Celular y Molecular**

**PEDECIBA**

**Dra. Natalie Brossard Barbosa**

**Orientadora: Dra. Teresa Freire Gard**

Dpto. Inmunobiología, Facultad de Medicina



**Montevideo, Uruguay**

**Junio, 2017**

## Tabla de contenido

Agradecimientos .....	4
Resumen .....	6
Tabla de Abreviaturas.....	7
Tabla de lectinas, abreviaturas y especificidades de unión .....	8
Introducción.....	10
Fasciolosis .....	10
<i>F. hepatica</i> y su Ciclo de Vida.....	10
Control actual de la fasciolosis .....	14
Glicanos de <i>F. hepatica</i> .....	15
N- glicosilación .....	18
O- glicanos y proteínas de tipo mucina de <i>F. hepatica</i> .....	20
Células Dendríticas.....	21
Inmunomodulación de CDs .....	24
Inmunomodulación de las CDs por <i>F. hepatica</i> .....	25
Glicanos e inmunomodulación sobre las CDs .....	25
Modulación de CDs por glicanos de <i>F. hepatica</i> .....	26
Hipótesis de trabajo .....	29
Objetivos generales y específicos.....	31
Materiales y Métodos .....	33
Ratones .....	33
Preparación del Extracto Total de <i>F. hepatica</i> (FhTE).....	33
Análisis por SDS-PAGE.....	34
Análisis por método de Western Blot .....	34
Estudio de glicoproteínas de FhTE mediante Lectin Blot .....	34
Análisis por técnica de ELISA .....	35
Péptido VF66 .....	36
Obtención de anticuerpos policlonales específicos de VF66.....	37
Evaluación del reconocimiento de FhTE por anticuerpos $\alpha$ VF66 .....	38
Enriquecimiento en glicoproteínas por cromatografía de afinidad utilizando anticuerpos anti-VF66.....	38
Generación de la columna de afinidad con anticuerpos anti-VF66 .....	38
Obtención de componentes mucínicos por cromatografía de afinidad .....	39
Concentración de EI-VF66 por precipitación con ácido tricloroacético (TCA) .....	39
Obtención de fracciones parasitarias reconocidas por la lectina ConA .....	40
Generación de la columna con ConA: Activación de agarosa.....	40
Generación de la columna con Con A: Inmovilización de la lectina.....	40
Purificación de glicoproteínas manosiladas por cromatografía de afinidad.....	41
Evaluación del reconocimiento de fracciones parasitarias por parte de lectinas.....	41
Oxidación de FhTE y OSM con meta-periodato de sodio.....	42
Generación de CDs derivadas de médula ósea (BMDCs) .....	42

Maduración de BMDCs.....	43
Medición de citoquinas por ELISA.....	43
Estudio de viabilidad celular.....	43
Análisis estadístico.....	44
<b>Resultados .....</b>	<b>46</b>
<b>Parte I: Obtención de proteínas de tipo mucina de <i>F. hepatica</i> y evaluación de sus propiedades inmunomoduladoras sobre CDs.....</b>	<b>46</b>
Desarrollo de la columna de afinidad .....	46
Obtención de glicoproteínas con los anticuerpos $\alpha$ VF66 (El $\alpha$ VF66).....	53
Caracterización bioquímica del El $\alpha$ VF66.....	55
Caracterización glucídica del El $\alpha$ VF66.....	55
Oxidación del FhTE y El - VF66 .....	59
<b>Evaluación de la inhibición de la maduración de las células dendríticas por el FhTE y el El<math>\alpha</math>VF66 .....</b>	<b>60</b>
<b>Parte II: Obtención de glicoproteínas de <i>F. hepatica</i> reconocidas por ConA y evaluación de sus propiedades inmunomoduladoras sobre CDs .....</b>	<b>64</b>
Purificación del El-ConA .....	65
Caracterización bioquímica del El-ConA .....	66
Caracterización de la composición de carbohidratos de El-ConA.....	69
<b>Evaluación de la inhibición de la maduración de las células dendríticas por el El-ConA.....</b>	<b>71</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>74</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>83</b>

## Agradecimientos

Son muchas las personas que aportaron a esta tesis con su conocimiento, tiempo y apoyo incondicional haciendo posible llevarla adelante.

- En primer lugar, me gustaría agradecer a mi directora de Tesis: la Dra. Teresa Freire, por ser mi guía en éste emprendimiento en un ámbito que era nuevo para mí ya que mi formación es en medicina. Es difícil expresar toda la paciencia que siempre tuvo conmigo, aceptando las dificultades que se presentaban al tener que conciliar las dos actividades. Tere siempre transmite las ideas de manera concreta y simple, incluso las más complejas y es una de las personas con mayor capacidad de trabajo que conocí. Sin duda este trabajo no hubiera salido adelante sin su apoyo constante.
- A la Dra. Cecilia Giacomini cuyo apoyo fue fundamental para llevar adelante la generación de la columna de afinidad con ConA y quien fue de gran ayuda en el análisis de los materiales purificados.
- A mis compañeros de laboratorio en Facultad de Medicina: Carolina, Verónica, Ernesto, Enrique, Valeria, Sofía, Paula, Florencia y Lucía. A Caro, por su amistad, por ser incondicional, por quedarse conmigo hasta muy tarde cuando yo entraba después de clases al laboratorio, por ser excelente profesionalmente y porque es una amiga de oro. A Ernesto, por las risas, por su comentario siempre acertado de qué hacer cuando las cosas no funcionaban, por su compañerismo. A Vero, por su generosidad, por siempre estar dispuesta a ver las cosas con uno, sin importar el tiempo que tomaba, tiempo que no le sobra para nada, por ser una amiga. A Enrique, por el buen humor, por mostrar que se puede hacer medicina y ciencias, por su buena onda. A Vale y Sofi, que son excelentes compañeras y personas y que fueron una renovación para nuestro grupo, con nuevas ideas y toda la fuerza de los que se suman. A Pauli, que es un cerebro y una de las personas más dispuestas y trabajadoras que tuve el gusto de conocer. A Flo, que se sumó a lo último, pero

que ya compartíamos la docencia durante 7 años, por su compañía, por las charlas y las risas. A Lucía, por su ternura siempre y su motivación.

- A mis compañeros bioquímicos, que son unos genios y que me ayudaron todos en algún momento en esta tesis, es un placer trabajar con ellos al lado.
- A mis compañeros de genética, que compartimos nuestro lugar de trabajo y que siempre están dispuestos a dar una mano. A Fer, que no tengo palabras para darle las gracias por ayudarme a descifrar Word y las mil formas en que se puede desconfigurar un documento.
- A todo el Departamento de Inmunobiología de Facultad de Medicina por haberme ayudado a crecer como persona y como profesional, es un placer formar parte.
- A Vicky, Mónica, Miguel, Diego, Nico y todo el personal del LOBBM, por toda su buena onda y ayudar a que el trabajo sea más fácil.
- A mis amigos que siempre están al firme acompañándome en todos mis emprendimientos y en todos los cambios de planes.
- A PEDECIBA y CSIC por el apoyo económico para el desarrollo de ésta tesis.
- Finalmente, quiero terminar agradeciendo a las personas más importante para mi: mi Familia. A Luis, a mis padres, Rosario y Vladimir, y a mi hermano Marcel por siempre darme para adelante, por apoyarme y acompañarme en todo momento, por estimularme constantemente a ser una mejor persona y un mejor profesional, pero, por sobre todas las cosas, por todo su amor y cariño.

## Resumen

Los parásitos helmintos expresan diferentes glicoconjugados en su superficie y liberan productos de excreción-secreción ricos en diferentes glicanos que pueden ser muy importantes en su ciclo de vida, infección y patología. Evidencias recientes sugieren que los glicoconjugados de parásitos helmintos podrían desempeñar un papel en la evasión de la respuesta inmune, lo que lleva a una polarización de las respuestas inmunes hacia un perfil Th2 modificado, favoreciendo la supervivencia del parásito en su hospedero. Además, se ha demostrado que los glicanos parasitarios inhiben la maduración de las células dendríticas (CDs). Sin embargo, existe poca información sobre la naturaleza o función de glicanos producidos por el trematodo *Fasciola hepatica*, el agente causante de la fasciolosis en nuestro país.

En esta tesis, purificamos y caracterizamos glicoproteínas de tipo mucina y altamente manosiladas de *F. hepatica* y llevamos a cabo la evaluación de sus propiedades inmunomoduladoras sobre la maduración de CDs. Nuestros resultados indican el aislamiento de glicoproteínas de tipo mucina con un peso molecular aparente aproximado de 45 kDa, mientras que los glicoconjugados altamente manosilados de *F. hepatica* comprendieron varios componentes de 14, 20, 30, 44 y 66 kDa y puntos isoeléctricos de 6,8 y 7.3. Los primeros fueron capaces de suprimir significativamente la producción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-12, mimetizando el efecto producido por el lisado total del parásito adulto. Además, modularon la producción de TNF $\alpha$  dependiendo del agonista de TLR utilizado. Sin embargo, mientras que con el enriquecido de glicoproteínas manosiladas se detectó inhibición de IL-6 e IL-12 inducidas por agonistas de TLR en CDs, en estas condiciones, no detectamos modificaciones significativas en la secreción de las citoquinas reguladoras IL-10 o TNF $\alpha$ .

Los resultados presentados en esta tesis expresan la complejidad de la respuesta del sistema inmune frente al parásito dependiendo de los receptores involucrados y contribuyen a comprender la función de las moléculas glicosiladas de *F. hepatica* en la modulación de la inmunidad del hospedero, en particular sobre CDs. Eventualmente, podrían ser útiles en el diseño de estrategias de control contra la fasciolosis.

## Tabla de Abreviaturas

BMDCs – Células dendríticas murinas derivadas de médula ósea  
CLR – Receptor Lectina Tipo C  
DC-SIGN – Receptor de ICAM3 no integrina específico de células dendríticas  
EGTA – Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N'-tetraacético  
EDTA – Ácido etilendiaminotetraacético  
ELISA – Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas  
EI-ConA – Eluido Alcalino obtenido con la columna de ConA  
EI-VF66- Eluido Alcalino obtenido con la columna del anticuerpo contra el péptido VF66  
Fc – Fracción constante de inmunoglobulinas  
FhTE – Extracto total de gusanos adultos de *Fasciola hepatica*  
FhTeg – Extracto tegumentario de gusanos adultos de *Fasciola hepatica*  
FhmPox – FhTE oxidado con meta-periodato de sodio  
FhCB – Control de oxidación con meta-periodato de sodio – Tratado únicamente con borhidruro de sodio.  
GalNAc/GlcNAc – N-acetil Galactosamina / N-acetil Glucosamina  
GAPDH – Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa  
GM-CSF – Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Monocitos  
HRP – Peroxidasa de rábano (Horse Raddish Peroxidase)  
IL- – Interleuquina  
IFN $\gamma$  – Interferón gamma  
i.m. - Intramuscular  
IRF4 – Factor 4 regulador de interferón  
LPS – Lipopolisacárido – Ligando de TLR4  
MFI – Media de intensidad de fluorescencia  
MGL – Lectina de macrófagos específico para Gal/GalNAc  
MHC – Complejo Mayor de Histocompatibilidad  
MR – Receptor de Manosa  
MTT – 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio  
NEJ – Juveniles recién desenquistados  
OMS – Organización Mundial de la Salud  
OSM – Mucina Submaxilar Ovina  
PAMP- Patrones moleculares asociados a patógenos  
PD-1 – Molécula asociada a la muerte programada tipo 1  
PD-L1/2 - Ligandos de PD-1  
PRR – Receptor de reconocimiento de patrones  
TCR – Receptor de Linfocitos T  
TGF $\beta$  – Factor de crecimiento tumoral beta  
Th – Linfocito T CD4+ colaborador  
Tn –Gal NAc unido a Ser/Thr  
TNF $\alpha$  – Factor de necrosis tumoral alfa  
TLR – Receptor de tipo Toll  
TIR – Receptor Toll/IL-1

## Tabla de lectinas, abreviaturas y especificidades de unión

No	Abbreviation	Origin	Species	Common name	Major Ligand(s)
1	AIA, Jacalin	Plant	<i>Artocarpus integrifolia</i>	Jack fruit lectin	Gal, Gal- $\beta$ -(1,3)-GalNAc (sialylation tolerant)
2	RPbAI	Plant	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Black locust lectin	Gal, GalNAc
3	PA-I	Bacteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pseudomonas lectin	Gal, Gal derivatives
4	SNA-II	Plant	<i>Sambucus nigra</i>	Sambucus lectin-II	Gal/GalNAc
5	SJA	Plant	<i>Sophora japonica</i>	Pagoda tree lectin	$\beta$ -GalNAc
6	DBA	Plant	<i>Dolichos biflorus</i>	Horse gram lectin	GalNAc
7	GHA	Plant	<i>Glechoma hederacea</i>	Ground ivy lectin	GalNAc
8	SBA	Plant	<i>Glycine max</i>	Soy bean lectin	GalNAc
9	VVA-B4	Plant	<i>Vicia villosa</i>	Hairy vetch lectin	GalNAc
10	BPA	Plant	<i>Bauhinia purpurea</i>	Camels foot tree lectin	GalNAc/Gal
11	WFA	Plant	<i>Wisteria floribunda</i>	Japanese wisteria lectin	GalNAc/sulfated GalNAc
12	HFA	Animal	<i>Helix pomatia</i>	Garden snail lectin	$\alpha$ -GalNAc
13	GSL-I-A4	Plant	<i>Griffonia simplicifolia</i>	Griffonia/Bandeiraea lectin-I	$\alpha$ -GalNAc
14	ACA	Plant	<i>Amaranthus caudatus</i>	Amaranthin	Sialylated/Gal- $\beta$ -(1,3)-GalNAc
15	ABL	Fungi	<i>Agaricus bisporus</i>	Edible mushroom lectin	Gal- $\beta$ -(1,3)-GalNAc, GlcNAc
16	PNA	Plant	<i>Arachis hypogaea</i>	Peanut lectin	Gal- $\beta$ -(1,3)-GalNAc
17	GSL-II	Plant	<i>Griffonia simplicifolia</i>	Griffonia/Bandeiraea lectin-II	GlcNAc
18	sWGA	Plant	<i>Triticum vulgare</i>	Succinyl WGA	GlcNAc
19	DSA	Plant	<i>Datura stramonium</i>	Jimson weed lectin	GlcNAc
20	STA	Plant	<i>Solanum tuberosum</i>	Potato lectin	GlcNAc oligomers
21	LEL	Plant	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Tomato lectin	GlcNAc- $\beta$ -(1,4)-GlcNAc
22	Cal s e pa	Plant	<i>Calystegia sepium</i>	Bindweed lectin	Man/Maltose
23	NPA	Plant	<i>Narcissus pseudonarcissus</i>	Daffodil lectin	$\alpha$ -(1,6)-Man
24	GNA	Plant	<i>Galanthus nivalis</i>	Snowdrop lectin	Man- $\alpha$ -(1,3)-
25	HHA	Plant	<i>Hipeastrum hybrid</i>	Amaryllis agglutinin	Man- $\alpha$ -(1,3)-Man- $\alpha$ -(1,6)-
26	ConA	Plant	<i>Canavalia ensiformis</i>	Jack bean lectin	$\alpha$ -linked Man, Glc, GlcNAc
27	Lch-B	Plant	<i>Lens culinaris</i>	Lentil isolectin B	Man, core fucosylated, agalactosylated biantennary N-glycans
28	Lch-A	Plant	<i>Lens culinaris</i>	Lentil isolectin A	Man/ Glc
29	PSA	Plant	<i>Pisum sativum</i>	Pea lectin	Man, core fucosylated trimannosyl N-glycans
30	WGA	Plant	<i>Triticum vulgare</i>	Wheat germ agglutinin	NeuAc/GlcNAc
31	MAA	Plant	<i>Maackia amurensis</i>	Maackia agglutinin	Sialic acid- $\alpha$ -(2,3)-GalNAc
32	SNA-I	Plant	<i>Sambucus nigra</i>	Sambucus lectin-I	Sialic acid- $\alpha$ -(2,6)-GalNAc
33	CCA	Animal	<i>Cancer antennarius</i>	California crab	O-acetylated sialic acids
34	PHA-L	Plant	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Kidney bean leukoagglutinin	tri-tetra-antennary $\beta$ -Gal/Gal- $\beta$ -(1,4)-GlcNAc
35	PCA	Plant	<i>Phaseolus coccineus</i>	Scarlet runner bean lectin	GlcNAc in complex oligosaccharides
36	PHA-E	Plant	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Kidney bean erythroagglutinin	biantennary, bisecting GlcNAc, $\beta$ -Gal/Gal- $\beta$ -(1,4)-GlcNAc
37	RCA-I/M20	Plant	<i>Ricinus communis</i>	Castor bean lectin I	Gal- $\beta$ -(1,4)-GlcNAc
38	CPA	Plant	<i>Cicer arietinum</i>	Chickpea lectin	Complex oligosaccharides
39	CAA	Plant	<i>Caragana arborescens</i>	Pea tree lectin	Gal- $\beta$ -(1,4)-GlcNAc
40	ECA	Plant	<i>Erythrina cristagalli</i>	Cocks comb/coral tree lectin	Gal- $\beta$ -(1,4)-GlcNAc oligomers
41	AAL	Fungi	<i>Aleuria aurantia</i>	Orange peel fungus lectin	Fuc- $\alpha$ -(1,6)- and Fuc- $\alpha$ -(1,3)-linked
42	LTA	Plant	<i>Lotus tetragonolobus</i>	Lotus lectin	Fuc- $\alpha$ -(1,3)-, Fuc- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)- and Fuc- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-linked
43	UEA-I	Plant	<i>Ulex europaeus</i>	Goose lectin-I	Fuc- $\alpha$ -(1,2)-linked
44	EEA	Plant	<i>Euonymus europaeus</i>	Spindle tree lectin	Terminal $\alpha$ -linked Gal
45	GSL-I-B4	Plant	<i>Griffonia simplicifolia</i>	Griffonia/Bandeiraea lectin-I	Terminal $\alpha$ -linked Gal
46	MPA	Plant	<i>Maclura pomifera</i>	Osage orange lectin	Terminal $\alpha$ -linked Gal
47	VRA	Plant	<i>Vigna radiata</i>	Mung bean lectin	Terminal $\alpha$ -linked Gal
48	MOA	Fungi	<i>Marasmius oreades</i>	Fairy ring mushroom lectin	Terminal $\alpha$ -linked Gal
49	BSA		Bovine serum albumin		
50	PBS		Phosphate buffered saline		



## Introducción

### Fasciolosis

La fasciolosis es una enfermedad zoonótica principalmente del ganado doméstico ocasionada por la infección con el parásito helminto tremátodo *Fasciola hepatica* ó *Fasciola gigantica*<sup>1</sup>.

Las dos especies de *Fasciola* se distribuyen de manera global. *F. hepatica* se distribuye principalmente en zonas templadas mientras que *F. gigantica* se encuentra principalmente en zonas tropicales de África y Asia (Figura 1)<sup>2</sup>.

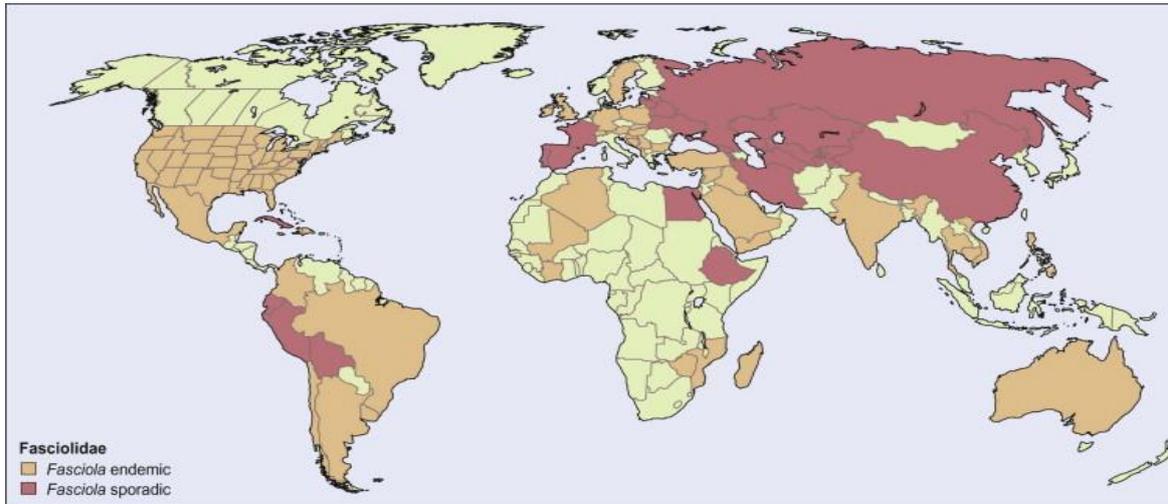
En los últimos años se ha reportado un incremento en la frecuencia de fasciolosis y se presume, se debe al aumento en el movimiento de ganado en pie, y a los cambios climáticos<sup>3</sup>.

La enfermedad es responsable de pérdidas económicas considerables en el área de la producción agropecuaria, debidas en gran medida a la aumentada mortalidad, decomiso de hígados en los frigoríficos, reducción en la producción de carne, leche, lana, así como los gastos relacionados al uso de anti-helmínticos<sup>4</sup>. Se estima que anualmente genera un costo de producción incrementado en 3.2 billones de dólares<sup>4</sup>. En relación a la fasciolosis en humanos, se estima que 17 millones de personas están infectadas y 180 millones viven en áreas endémicas para la infección<sup>5-7</sup>.

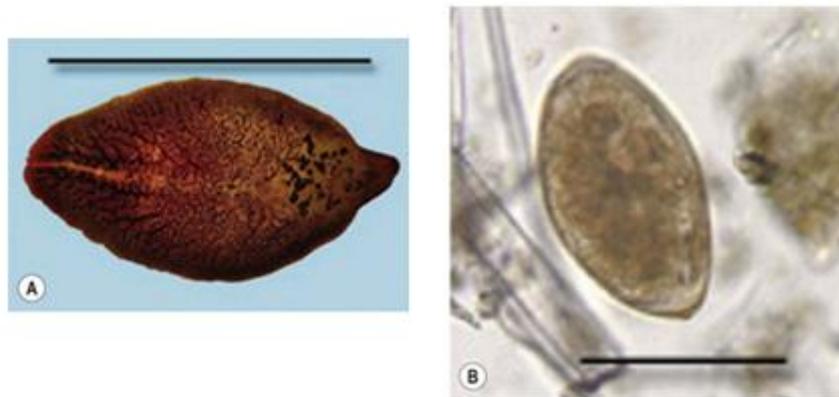
### *F. hepatica* y su Ciclo de Vida

*F. hepatica* es una especie de platelminto trematodo, perteneciente a la subclase *Digenea*. Se caracteriza por su forma lanceolada aplanada (Figura 2). Tiene dos ventosas, una bucal y otra ventral y un ciclo biológico diogéneo en dos hospederos, un molusco y un mamífero. El adulto se encuentra en los canales biliares y la vesícula biliar de herbívoros y omnívoros, incluido el hombre.

El estado adulto del gusano presenta una forma plana sin segmentos de aproximadamente 2 x 3.5 cm de largo y 1 - 1.5 cm de ancho. Es de color rosa pálido o grisáceo. La porción cefálica presenta una ventosa bucal de 1 mm aproximadamente y otra ventral de 1.6 mm.



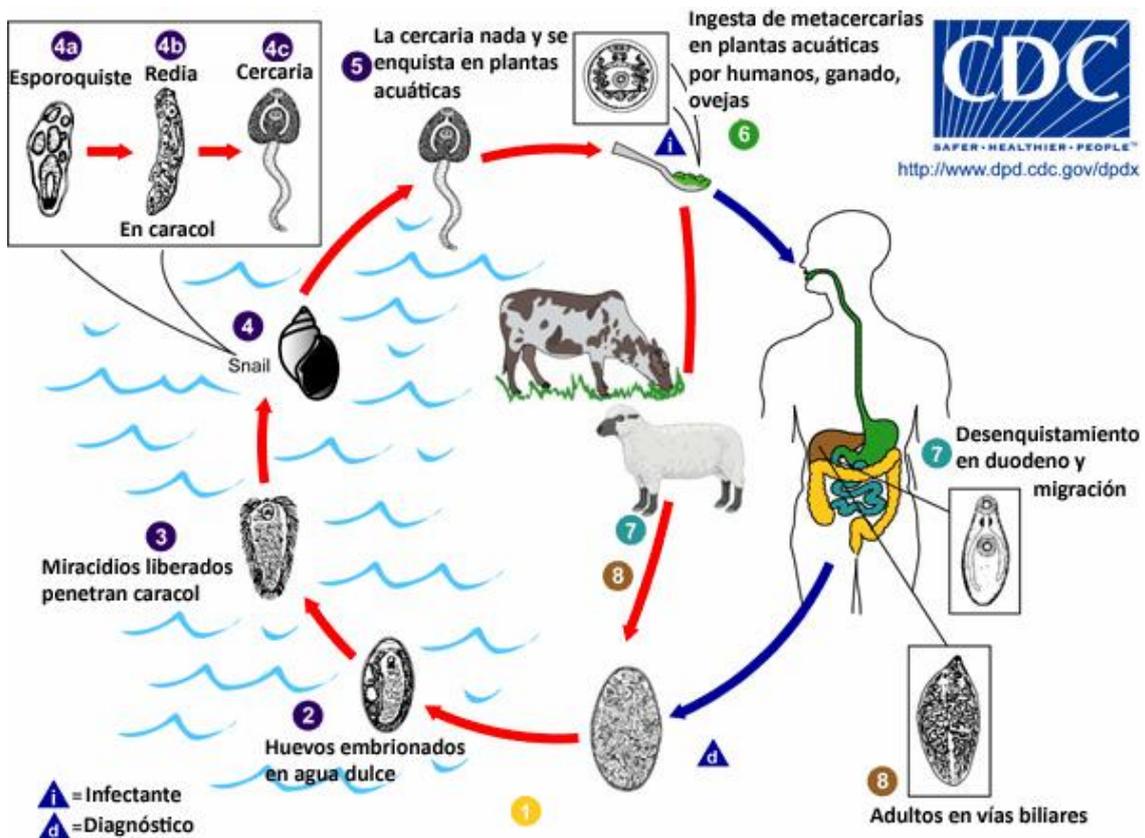
**Figura 1- Áreas endémicas para fasciolosis causada por *F. hepatica* y *F. gigantica* a nivel mundial.** Se muestra en rojo las zonas donde se ha detectado la presencia esporádica y en anaranjado la presencia endémica de *F. hepatica* y *F. gigantica* a nivel mundial. Extraído de <http://www.bvgh.org/>



**Figura 2 - Morfología de *F. hepatica*.** En la figura se ilustra una fotografía del gusano en su forma adulta y su forma como huevo (A) Adulto (tamaño 30 × 15 mm). La barra representa 3 cm. (B) Huevo (tamaño 130–150 × 60–90 μm). La barra representa 100 μm. Extraído de sitio oficial de la Division of Parasitic Diseases, National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA.

*F. hepatica* tiene un tubo digestivo incompleto formado por la cavidad bucal, faringe, y esófago que se bifurca formando dos ramas laterales que continúan hacia la parte posterior del parásito y terminan en los ciegos intestinales. Es un parásito hermafrodita con un útero corto y ovario situado a la derecha de la línea media en posición anterior con respecto a los dos testículos. Los huevos son depositados en los

conductos biliares del hígado. Tienen aproximadamente 130-150  $\mu\text{m}$  de largo y 60-90  $\mu\text{m}$  de ancho (Figura 2). La *Fasciola* adulta puede producir aproximadamente de 20.000 a 50.000 huevos por día. Los mismos son eliminados con las heces pero no contienen embrión. La maduración será posterior (9-15 días) cuando los huevos encuentren ambientes húmedos con temperaturas de entre 22 y 25°C<sup>1</sup>.



**Figura 3 - Ciclo biológico de la *F. hepatica*.** Tras la eclosión de los huevos surge una larva ciliada llamada miracidio que logra emerger del huevo por medio de enzimas que degradan y desprenden el opérculo del huevo. Si la larva encuentra el hospedero intermediario, un caracol pulmonado de agua dulce, perfora su epitelio y entra en el mismo. En nuestro país el principal caracol encontrado es el denominado *Lymnea viatrix*. Dentro del caracol se generan los esporocistes, que se transforman en redias y que luego se transforman en cercarias. Las cercarias abandonan el caracol y en el medio ambiente se enquistan transformándose en metacercarias. Las metacercarias en el medio exterior pueden permanecer viables por semanas. Cuando los animales ingieren pasturas contaminadas con metacercarias, las mismas desinquistan a nivel del estómago, emergiendo la larva juvenil o NEJ (por su sigla en inglés Newly Excysted Juveniles). Las mismas desinquistan a nivel del intestino delgado en donde penetran la pared intestinal y la atraviesan llegando a la cavidad abdominal desde donde son capaces de migrar hasta alcanzar la cápsula del hígado y penetrar en el tejido hepático. Imagen de División de Enfermedades parasitarias, Centro de Control y Prevención, Atlanta, GA.

*F. hepatica* tiene un ciclo que incluye dos hospederos (Figura 3), uno definitivo y otro intermediario. El huésped intermediario es un caracol de agua dulce y el huésped definitivo puede ser el hombre el ovino, bovino y otros mamíferos herbívoros<sup>1</sup>.

Tras la eclosión de los huevos surge una larva ciliada llamada miracidio que logra emerger del huevo por medio de enzimas que degradan y desprenden el opérculo del huevo. Una vez libres nadan libremente mediante movimientos estimulados por la luz solar. Este es un punto crítico del ciclo, ya que si el miracidio no encuentra en un período de 24 horas al hospedero intermediario, el ciclo no continúa. Si la larva encuentra el hospedero intermediario, un caracol pulmonado de agua dulce, perfora el tegumento y entra en el caracol. En nuestro país el principal caracol encontrado es el denominado *Lymnaea viatrix*<sup>1</sup>. Dichos caracoles son anfibios, viven y se desarrollan en aguas poco profundas, como ser orillas de manantiales, tajamares y cañadas de corriente suave, encontrándose también en canales de drenajes y arrozceras<sup>1</sup>.

Dentro del caracol se generan los esporocistos, que darán lugar a redias y éstas últimas a cercarias. Estas son los estadios del ciclo que se desarrollan dentro del caracol. Todo este período lleva de 5 a 6 semanas<sup>1</sup>. Esta fase del ciclo se produce a temperaturas superiores a los 10 °C y a medida que se aumenta la temperatura la velocidad de desarrollo aumenta<sup>1</sup>.

Las cercarias abandonan el caracol y en el medio ambiente se enquistan transformándose en metacercarias. En su ciclo natural se ha visto que en condiciones adecuadas, de un miracidio que entra en el caracol, se pueden generar más de 4.000 metacercarias. Las metacercarias en el medio exterior pueden permanecer viables por muchas semanas dependiendo de la temperatura y humedad. Altas temperaturas y la desecación las destruyen en un corto período, mientras que sobreviven tiempos prolongados a temperaturas menores de 20°C<sup>1</sup>.

Cuando los animales ingieren pasturas contaminadas con metacercarias, las mismas desenquistan a nivel del estómago, emergiendo la larva juvenil o NEJ (por su sigla en inglés Newly Excysted Juveniles). Una vez en el duodeno las larvas liberadas penetran la pared del duodeno escapando hacia la cavidad peritoneal<sup>8</sup>. Posteriormente ingresan a la cápsula de Glisson para finalmente entrar en el parénquima del hígado donde generan pequeñas cavidades generando inflamación, abscesos, necrosis, granulación y fibrosis. Las larvas inmaduras migran en el parénquima hepático por 6-8 semanas

antes de penetrar en los ductos biliares y comenzar a producir huevos. Las larvas jóvenes en proceso de migración a través del parénquima hepático miden unos pocos milímetros, mientras que los adultos encontrados en los ductos biliares miden 20-40 mm de largo y 8-13 mm de ancho<sup>8</sup>. El estadio hepático del parásito puede permanecer dos o más meses, mientras que una vez en el ducto biliar el parásito puede permanecer durante décadas. En los casos de infección crónica inclusive puede observarse una calcificación del parénquima<sup>9</sup>.

### Control actual de la fasciolosis

Las políticas de control se basan en el uso de anti-helmínticos. Principalmente el Triclabendazol que es efectivo frente a las formas juveniles y adultas, aunque se ha reportado resistencia a esta droga cada vez con mayor frecuencia en América del Sur, Australia y Europa<sup>10</sup>. En la Figura 4 se detallan algunas de las fórmulas anti-helmínticas que han sido utilizadas para el control de la infección por *F. hepatica*.

La utilización de vacunas en lugar de fasciolidas químicos podrían mejorar los efectos adversos descritos para los tratamientos tradicionales dado que son seguras, no generan residuos químicos en carne, no contaminan el medio ambiente y lo más importante producen protección frente a futuras infecciones<sup>11</sup>.

A pesar de que no existe actualmente una vacuna comercial disponible en el mercado para tratar la fasciolosis, se han realizado muchos avances en el desarrollo de las mismas. Se han evaluado diversos antígenos como posibles candidatos de vacunas contra la fasciolosis. Las mismas se han ensayado en múltiples modelos animales, desde ratas a ovejas, con niveles de protección que van del 33 al 96.7%. Se han utilizado proteínas nativas y recombinantes como agentes antigénicos para el desarrollo de protección. Entre éstas se destaca por los altos porcentajes de protección la leucina aminopeptidasa y la tiorredoxina glutatión reductasa con tasas de protección 84% y 97% respectivamente<sup>12-22</sup>.

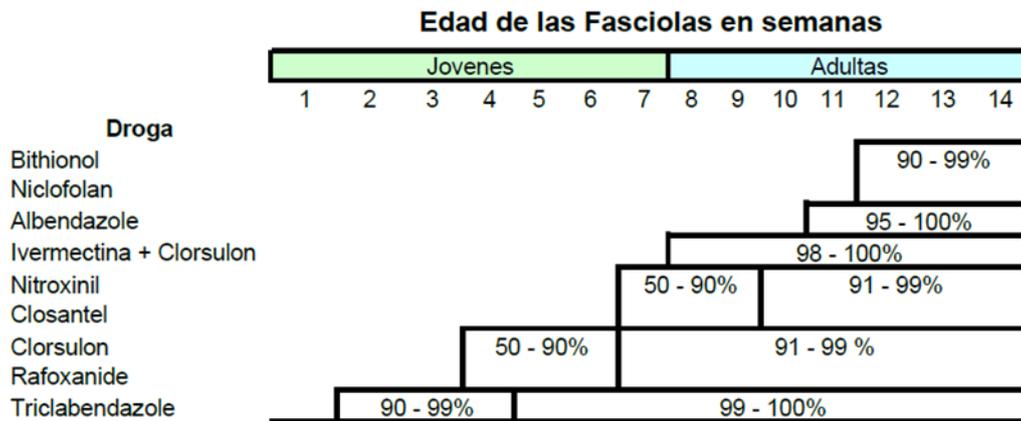
Anti-helmínticos y espectro de acción contra *F. hepatica*

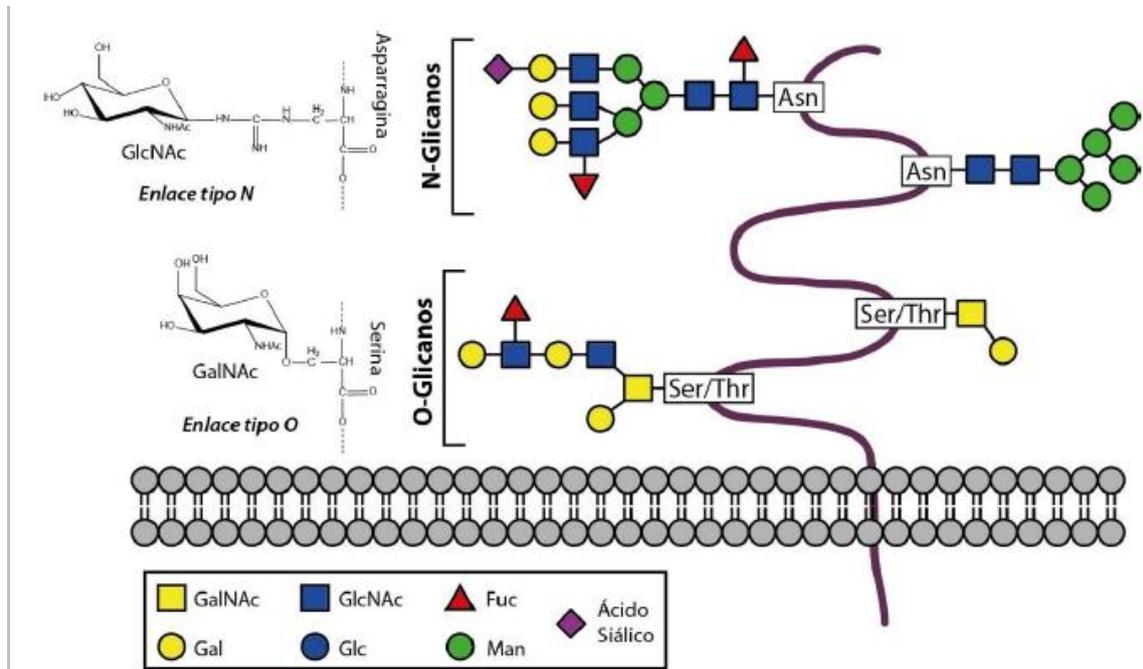
Figura 4- Antihelmínticos utilizados en el tratamiento contra *F. hepatica*. Se detallan en la tablas anti-helmínticos más usados y su acción en las distintas edades del parásito. Extraído de César, 2004<sup>9</sup>.

### Glicanos de *F. hepatica*

Los glicanos que forman parte de las glicoproteínas y los glicolípidos participan en importantes procesos biológicos tanto a nivel estructural como funcional. A nivel estructural cumplen un papel fundamental en la composición de la matriz extracelular y tienen la capacidad de conferir estabilidad, resistencia proteolítica y solubilidad a diversas proteínas secretadas. Por otro lado, a nivel funcional, estos glicococonjugados participan en procesos enzimáticos o de reconocimiento biológico como la interacción célula-célula y célula-matriz extracelular, fundamentales en la modulación de la respuesta inmune, desarrollo embrionario, diferenciación, cáncer e interacción huésped-patógeno<sup>23-25</sup>.

En las glicoproteínas, uno o más glicanos están unidos covalentemente al esqueleto polipeptídico, en general a través enlaces N- u O- glicosídicos. De esta forma, existen dos tipos principales de glicosilación de proteínas: la N- y la O-glicosilación, dependiendo del tipo de enlace de unión entre el esqueleto peptídico y el glúcido (Figura 5). En las N-glicoproteínas los carbohidratos se unen al grupo amino de la cadena lateral del aminoácido asparragina. En O-glicoproteínas el punto de unión es el grupo hidroxilo de las cadenas laterales de los aminoácidos serina y treonina (Figura 5).

Los carbohidratos que se unen directamente a estos sitios son normalmente N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina, respectivamente <sup>26</sup>.



**Figura 5 - Clasificación de los tipos de glicosilación más comunes en glicoproteínas presentes en tejidos animales.**

Los glicanos presentes en glicoproteínas pueden clasificarse según el enlace de unión entre las estructuras glucídicas y el esqueleto peptídico. Si bien existen diferentes tipos de glicosilación, nos centraremos en los dos tipos más comunes y mejor caracterizados en células animales: los N- y los O- glicanos. En los primeros, los glicanos se encuentran unidos mediante un enlace N-glicosídico formado entre el carbono anomérico del carbohidrato en cuestión (generalmente un residuo de GlcNAc) y la amina presente en la cadena lateral del aminoácido asparagina. En los O-glicanos, se encuentra presente un enlace O-glicosídico entre el grupo hidroxilo de los aminoácidos Serina o Tronina y el carbono anomérico del sacárido, siendo éste comúnmente GalNAc.

Asimismo, además de las glicoproteínas, se pueden encontrar otras estructuras glicosiladas de gran importancia biológica, como los glicolípidos <sup>26</sup>. Éstos representan compuestos que contienen uno o más monosacáridos unidos mediante un enlace glicosídico a una estructura hidrofóbica como un acilglicerol, una ceramida o un prenil fosfato <sup>27</sup>. La mayoría de ellos se encuentran en estructuras membranosas de la célula, con dos tercios presentes en membranas intracelulares como el aparato de Golgi, endosomas, lisosoma, membrana nuclear o mitocondria <sup>28,29</sup>.

Resultados de nuestro grupo de trabajo han identificado la presencia de estructuras glucídicas conteniendo Man/Glc, GalNAc o GlcNAc en el extracto total del parásito adulto (FhTE), con una fuerte unión de las lectinas ConA, WGA and VV (ver tabla 1), respectivamente a cada uno de los glúcidos (Figura 6)<sup>29</sup>. La especificidad de la unión se demostró por la inhibición de la unión entre la lectina y el FhTE con los azúcares específicos. También se describió la presencia de residuos de Fucosa en el extracto total del parásito mediante el reconocimiento con Ulexeuropus agglutinin (UEA-1)<sup>29</sup>.

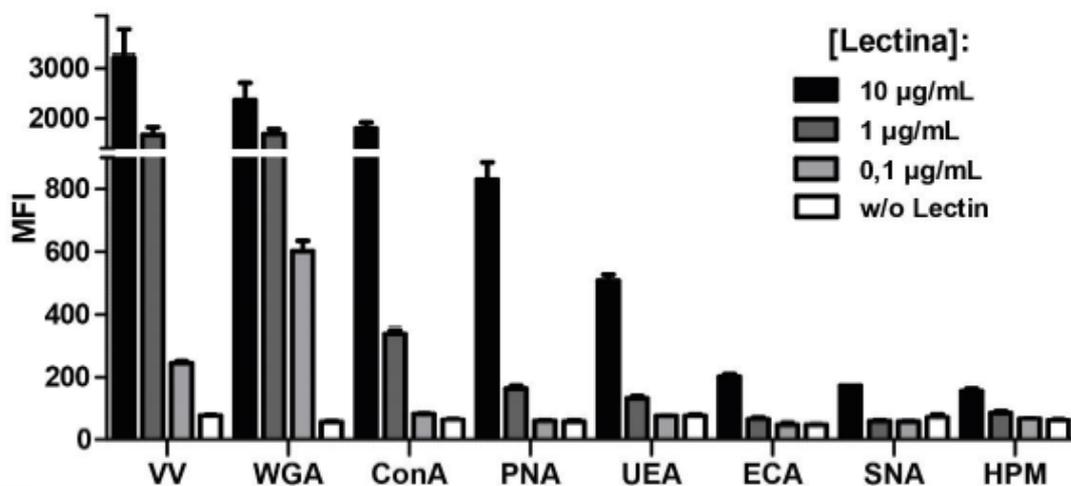


Figura 6 - Análisis de reconocimiento de lectinas en un extracto total de *F. hepatica* adulto. Se observa el reconocimiento del FhTE por diferentes lectinas (VV, WGA, ConA, PNA, UEA, ECA, SNA y HPM) a concentraciones cada vez menores (10, 1 y 0,1 µg/mL y el control sin lectina). Extraído de Rodríguez, et al 2016.<sup>29</sup>

Por otro lado, estudios más completos llevados a cabo a través de un microarray de lectinas, mostró que un lisado de tegumento de *F. hepatica* adulto presenta un perfil rico y complejo de oligosacáridos.<sup>30,31</sup> La reactividad de las lectinas NPA, GNA, HHA y ConA (Tabla 1), sugiere una predominancia de N-glicoproteínas conteniendo oligomanosa a nivel de la superficie del parásito. Se ha descrito la presencia de fucosa mediante el reconocimiento del FhTeg por lectinas como como AAL, LTA y UEA-I. La presencia de N-glicanos complejos se confirmó en estudios anteriores con la unión de PHA-L y-E y CPA. La unión a AIA y PNA en estos mismos estudios denota la presencia de O- glicanos en el FhTE, más específicamente del antígeno T y estructuras terminales con Gal reconocidas por PNA (Figura 7)<sup>30,31</sup>. En la Tabla 1, se muestra la reactividad de cada una de las lectinas mostradas en la Figura 7.

Tabla 1 - Especificidad de diferentes lectinas vegetales.

Abreviatura	Origen	Especificidad de Unión
ConA	<i>Concanavalia ensiformis</i>	$\alpha$ -linked Man, branched and terminal
LCA	<i>Lens Culinaris</i>	Core fucosylated terminal LacNAc, Man, GlcNAc
PSA	<i>Pisum sativum</i>	Core fucosylated terminal LacNAc, Man, GlcNAc
GNL	<i>Galanthus nivalis</i>	Man
AAL	<i>Aleuria aurantia</i>	Fuc- $\alpha$ -(1,6)-GlcNAc; Fuc- $\alpha$ -(1,3)-Gal- $\beta$ -(1,4)-GlcNAc
UEA-I	<i>Ulex europaeus</i>	Fuc- $\alpha$ -(1-2)-LacNAc
PHA-E	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Biantennary complex N-linked glycans
PHA-L	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Tri- and tetra-antennary complex oligosaccharides
sWGA	<i>Triticum vulgare</i>	GlcNAc
(succinylated WGA)		
Jacalin	<i>Artocarpus integrifolia</i>	GlcNAc- $\beta$ -(1,3)-Gal; Gal- $\beta$ -(1,3)-GalNAc- $\alpha$ -Thr/Ser
WGA	<i>Triticum vulgare</i>	GlcNAc; Neu5Ac
GSL-II	<i>Griffonia simplicifolia</i>	GlcNAc
SBA	Soybean	Terminal GalNAc
DBA	<i>Dolichos biflorus</i>	$\alpha$ -GalNAc
VVL	<i>Vicia villosa</i>	Terminal GalNAc
GSL-I	<i>Griffonia simplicifolia</i>	$\alpha$ -GalNAc; GalNAc $\alpha$ -Thr/Ser; $\alpha$ -Gal
MAL-II	<i>Maackia amurensis</i>	Neu5Ac- $\alpha$ (2,3)-Gal(NAc); sulfated glycans
MAL-I	<i>Maackia amurensis</i>	LacNAc; Neu5Ac- $\alpha$ -(2,3)-Gal(NAc)
SNA-I	<i>Sambucus nigra</i>	Neu5Ac- $\alpha$ -(2,6)-Gal(NAc)
PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	Gal- $\beta$ -(1,3)-GalNAc- $\alpha$ -Thr/Ser
RCA <sub>120</sub>	<i>Ricinus communis</i>	LacNAc
ECL	<i>Erythrina cristagalli</i>	LacNAc

Extraído de Ravidà, et al. 2016<sup>32</sup>.

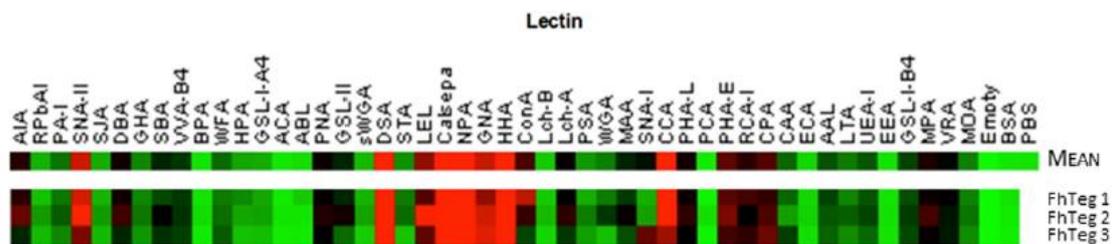


Figura 7 - Microarray de lectinas sobre un lisado proteico de tegumento del adulto de *F. hepatica* (FhTeg). Se marcó con fluorescencia el FhTE el cual se incubó con un microarray de lectinas y se escaneó a 543 nm en un scanner laser de micorarray. Las lectinas que se unen con mayor afinidad aparecen en rojo y en verdes las que se unen débilmente o no se unen. Extraído de Ravidà, et al 2016<sup>31</sup>.

## N- glicosilación

Análisis proteómicos recientes confirman la gran abundancia de glicoproteínas en el tegumento del parásito adulto<sup>30,31,33,34</sup> presentando dentro de los N-glicanos predominantemente oligomanosa y estructuras truncadas (Figura 8). Los glicanos manosilados están ampliamente distribuidos en el tegumento de fasciolas adultas con particular abundancia a nivel de las espinas y ventosas<sup>30</sup>(Figura 9). Por ser las partes del parásito más expuestas con el hospedero, se ha planteado que estas glicoproteínas podrían ser importantes en la adhesión celular o señalización celular desencadenada por el parásito<sup>30</sup>.

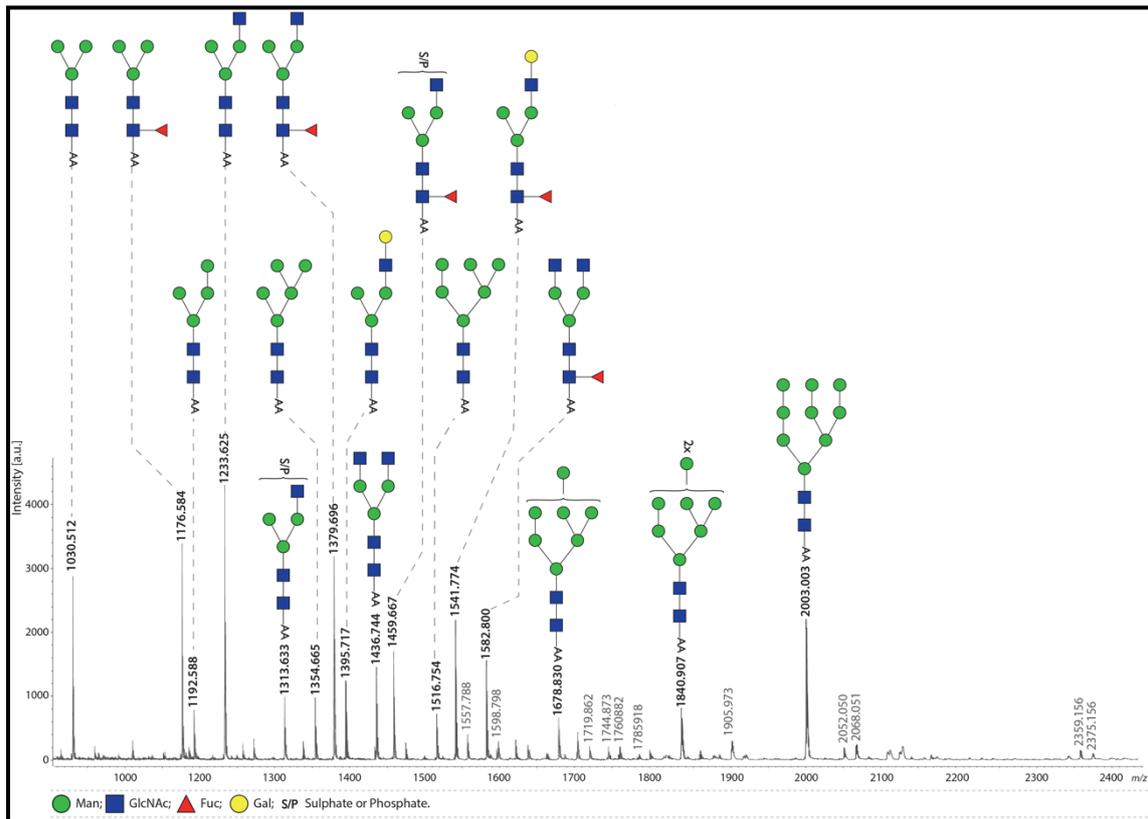


Figura 8 N-glicanos en *F. hepatica* Estudios de espectrometría de masa la presencia predominante de oligosacáridos con oligomanosa expresada en escamas, ventosas y cobertura tegumentaria del parásito adulto<sup>35</sup> Extraído de Ravidà, et al. 2016<sup>30</sup>

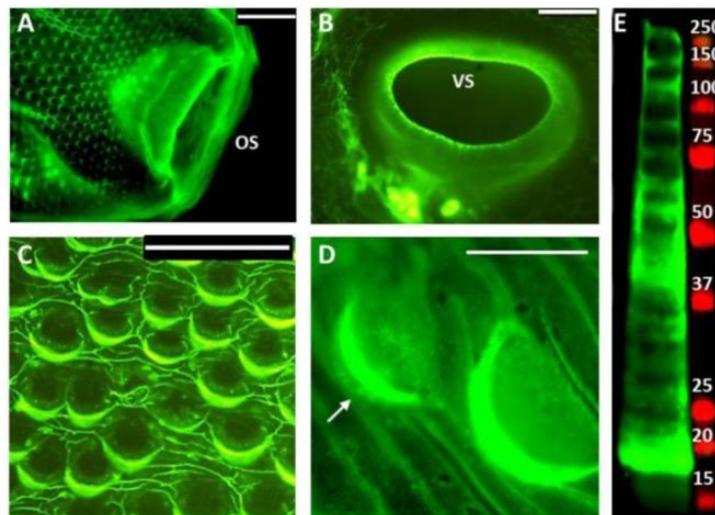
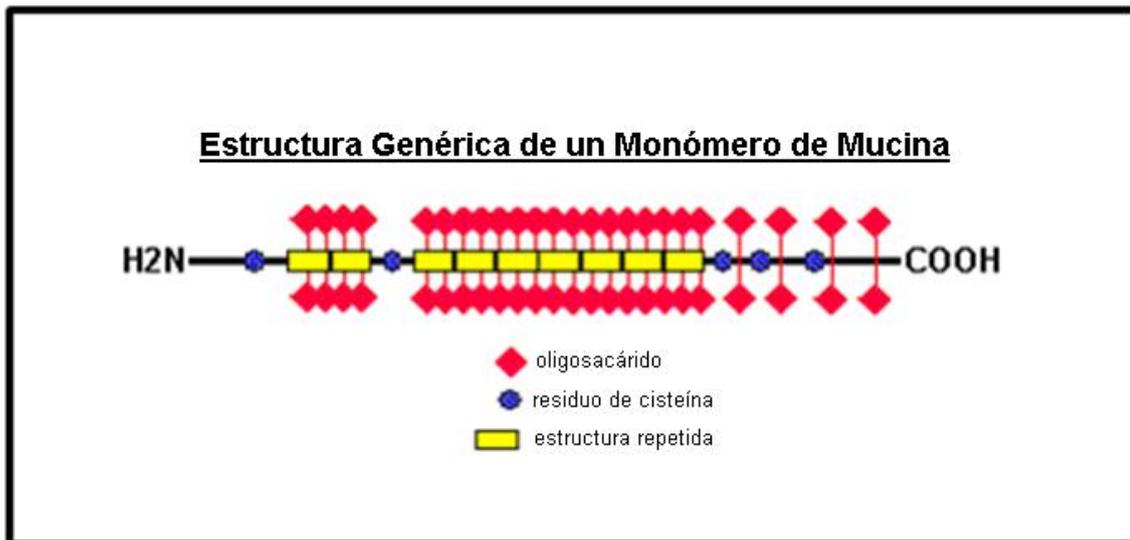


Figura 9 - Los oligosacáridos altamente manosilados están localizados predominantemente en las escamas y ventosas del parásito adulto. Se visualizan N-glicanos altamente manosilados mediante el reconocimiento con conA fluorescente (A-D) y lectin blot con ConA (E) de *F. hepatica* adulta. Las barras representan : 200  $\mu$ m (A-B), 100  $\mu$ m (C), 50  $\mu$ m (D) E: Un lisado del tegumento (15  $\mu$ g) reconocido por (green). Marcador PM (Rojo)<sup>30</sup>

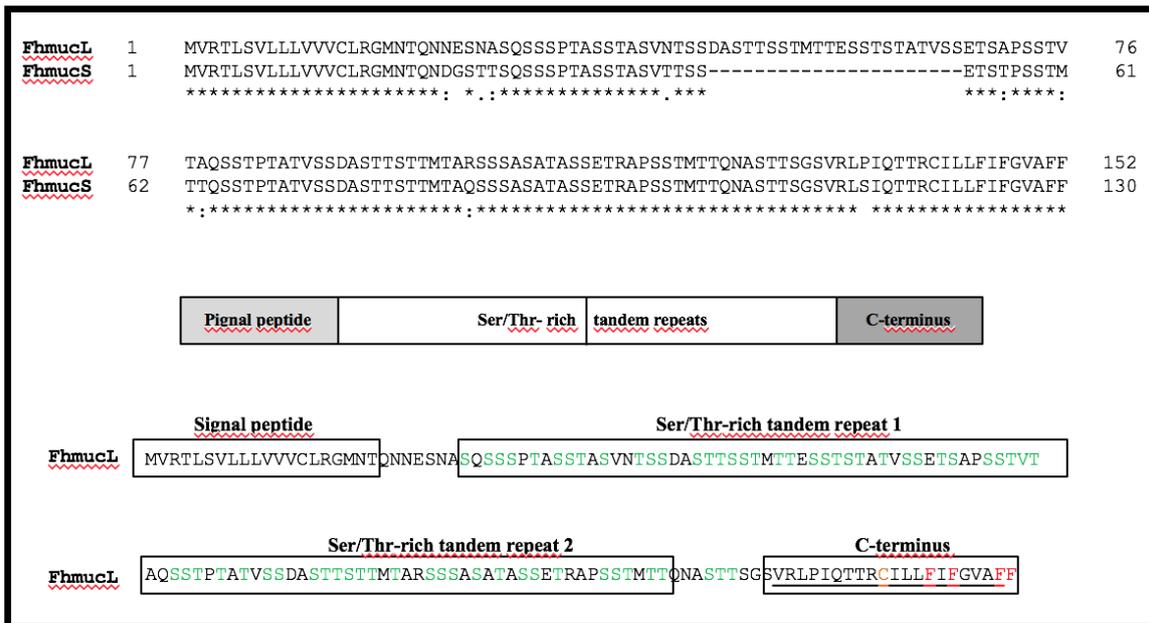
### O- glicanos y proteínas de tipo mucina de *F. hepatica*

A pesar de la reciente información y dilucidación de la estructura de los N-glicanos de *F.hepatica* abordada anteriormente no se conoce hasta el día de hoy la identidad de sus O-glicanos. Las mucinas de mamífero son proteínas de alto peso molecular caracterizadas por alto grado de O-glicosilación (Figura 10).



**Figura 10 - Estructura genérica de un monómero de mucina de mamífero.** Se observa un diagrama de la estructura genérica de un monómero de mucina. Extraído de <http://nrl.northumbria.ac.uk/2888/>

En particular las secuencias ricas en Ser y Thr constituyen potenciales sitios de O-glicosilación. En este contexto, resulta interesante destacar un hallazgo correspondiente a la identificación por parte de Cancela et al, 2010 de una familia de secuencia cuyo marco abierto de lectura se caracteriza por un alto contenido de residuos Ser y Thr, y que podrían constituir potenciales sitios de O-glicosilación (Figura 11) Además, los transcritos identificados se expresan altamente en el estadio invasivo (NEJ), por lo que podría tener relevancia en los mecanismos que llevan al establecimiento de la infección parasitaria<sup>36</sup>.



**Figura 11 – Secuencias proteicas traducidas de proteínas tipo mucina a partir de dos transcritos identificados por su alta expresión en el estadio NEJ de *F. hepatica*.** Se observa un alineamiento realizado con el Software Clustal w de las secuencias proteicas traducidas de los dos transcritos identificados: FhmuL y FhmuS. En el sector intermedio se observa la estructura de las proteínas putativas tipo mucina, conteniendo un péptido señal, dos tándems repetidos ricos en Ser y Thr y la región terminal. En el sector inferior se identifican dichos dominios en la secuencia proteica para FhmuL.

Por otro lado, la presencia de proteínas con este tipo de *O*-glicosilación, así como de las enzimas que llevan a cabo la *O*-glicosilación ha sido claramente demostrada en *F. hepatica* al identificarse el antígeno Tn (correspondiente a GalNAc- Ser/Thr) así como las enzimas responsables de su síntesis<sup>37,38</sup>. Por tanto, el hallazgo realizado por Cancela et al, en cuanto a la presencia de un transcrito correspondiente a una proteína de tipo mucina en el estadio NEJ, resulta de gran relevancia ya que al ser identificado en el estadio con mayor exposición en las fases iniciales de la infección resulta un blanco inmunológico interesante.

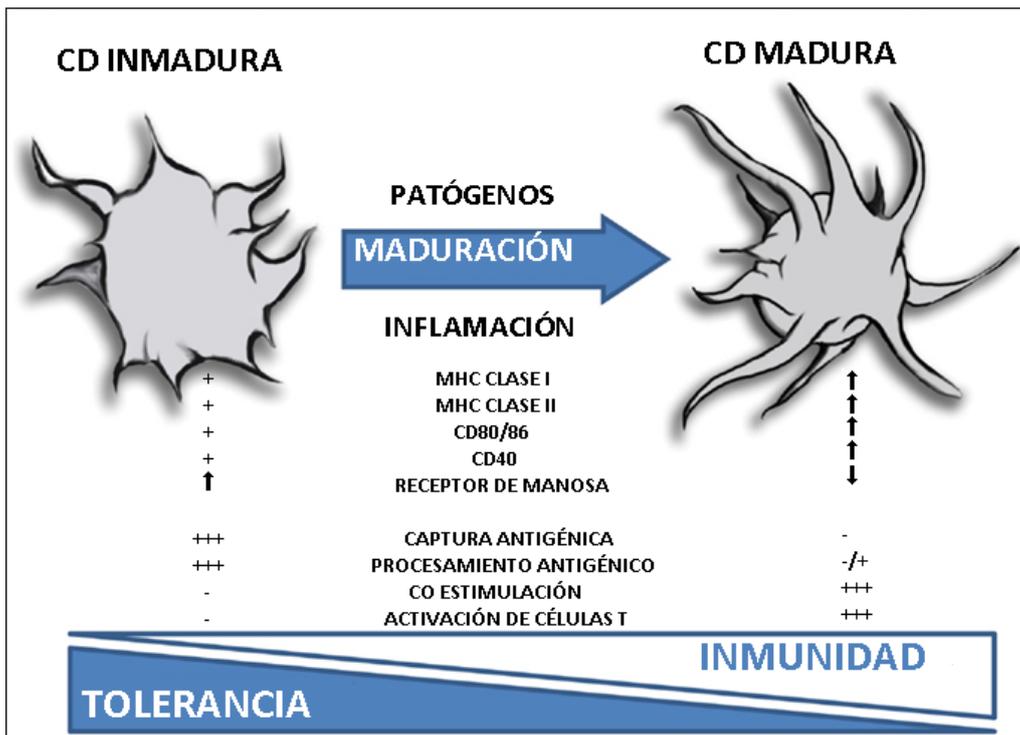
## Células Dendríticas

En esta tesis profundizaremos en los efectos inmunomoduladores de glicoproteínas de *F. hepatica* sobre células dendríticas (CD), las cuales pertenecen al sistema inmune innato. Las mismas se alojan en los ganglios linfáticos pero también en la periferia donde llevan a cabo sus funciones como centinelas. De manera muy simplista, las mismas pueden ser clasificadas en dos tipos: plasmocitoides (CDp) y convencionales (CDc).<sup>39</sup> Los precursores de las CDp se encuentran en la sangre y una vez estimuladas

viajan a los órganos linfoides y a los sitios de inflamación crónica. En cuanto a las CDc, existen dos tipos principalmente: las células dendríticas residentes en las zonas T de los ganglios linfáticos y las células dendríticas migratorias, que habitan los tejidos periféricos así como ganglios linfáticos locales. Las CD migratorias, proveen a los ganglios de antígenos derivados de patógenos y/o de tejidos en estados de inflamación o basales por el recambio celular<sup>39</sup>.

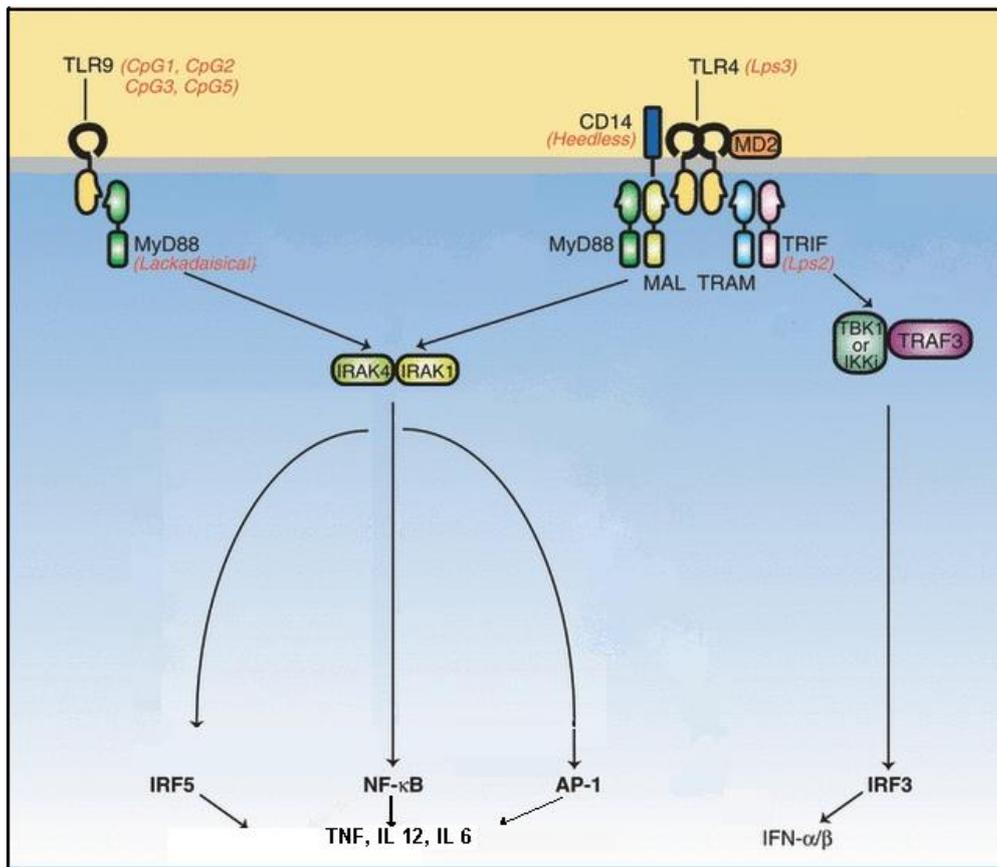
Las CDs se encuentran distribuidas en los tejidos periféricos y en los órganos linfoides donde permanecen en un estado inmaduro muestreando el ambiente mediante diversos mecanismos endocíticos<sup>39</sup>. A su vez estas células expresan una gran variedad de receptores de patógenos (como ser los receptores de tipo TLR). Una vez que los ligandos se unen a los receptores expresados por las CDs se desencadena un programa de señalización que culmina en la adquisición de un fenotipo maduro por parte de las CDs<sup>39</sup>. Dicho fenotipo se caracteriza por la alta expresión en membrana de la molécula MHCII y de las moléculas de co-estimulación (como ser CD80, CD86 y CD40) (Figura 12)<sup>3940</sup>. Una característica fundamental de las CDs maduras es que pueden presentar con gran eficiencia y por un período prolongado los antígenos capturados al momento del encuentro con los patógenos (Figura 12). A su vez, las CDs maduras pierden la capacidad de presentar antígenos presentes en el ambiente hallados posteriormente a dicho primer encuentro<sup>40</sup>.

Los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) presentes en las CDs entre otras células, son codificados a nivel germinal y son los responsables de monitorear la presencia de microorganismos<sup>41</sup>. Esto es posible dado que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) a nivel de los microbios. Los PRRs también son responsables de reconocer moléculas endógenas liberadas cuando existe daño celular. Dichas moléculas reciben el nombre de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs)<sup>41</sup>. A la fecha se conocen cuatro familias de PRRs: receptores de membrana tipo Toll (TLRs), receptores lectina tipo C de membrana (CLRs) y receptores proteicos citoplasmáticos como ser receptores helicasas tipo RIG y receptores tipo NOD (NLRs)<sup>41</sup>.



**Figura 12- Maduración de las células dendríticas.** Se muestra las diferencias fenotípicas y de función entre las CDs maduras e inmaduras. Modificado de Hubo, et al 2013<sup>42</sup>.

El reconocimiento de los PAMPs por los receptores de tipo TLR genera un aumento de la actividad transcripcional de diversos genes en función del tipo del receptor TLR y del tipo celular involucrado. Los TLR interactúan con las moléculas adaptadoras que contienen dominios tipo TIR que se encuentran reclutadas a sus dominios citoplasmáticos<sup>43</sup>. A pesar de la existencia de diversas moléculas adaptadoras, las vías de señalización de los TLR se distinguen básicamente de la participación de MyD88 y TRIF<sup>41</sup>. Por ejemplo, el TLR4, es el único TLR capaz de señalar por ambas vías, mientras que el TLR9 señala por MyD88 (Figura 13). El desencadenamiento de esta señalización conduce a la activación de intermediarios moleculares que concluye en la activación de factores de transcripción, como NF- $\kappa$ B, AP-1, IRF3 e IRF7, entre otros, y que regulan la producción de moléculas pro-inflamatorias (Figura 13)<sup>44</sup>.



**Figura 13 - Señalización a través de TLR.** Todos los TLR excepto TLR3 tienen una vía de señalización dependiente de MyD88. La señalización a través de MyD88 genera la activación y translocación al núcleo de AP-1, IRF5 y NF-κB. TLR4 también puede señalizar de manera MyD88 independiente, la cual utiliza la proteína adaptadora TRIF para activar e inducir la translocación de AP-1, NF-κB y otros factores de transcripción al núcleo. De manera alternativa TRIF puede desencadenar otras vías de activación: bien puede activar NF-κB ó interactuar con TRAF3 generando la translocación al núcleo de IRF3<sup>36</sup>. Modificado de Buetler, 2009<sup>44</sup>.

### Inmunomodulación de CDs

Los helmintos desarrollan mecanismos de evasión inmunológica estableciéndose una respuesta de tipo Th2 modificada<sup>45</sup>. Dichas capacidades immuno-moduladoras permiten a los parásitos permanecer en sus huéspedes e interferir con las respuestas inflamatorias así como con los mecanismos inmunes montados contra otro agente infeccioso, contra vacunas o en respuestas alérgicas o autoinmunes. Uno de los mecanismos immunomoduladores de los helmintos es a través de la modulación de la maduración y/o función de las CDs<sup>46,47</sup> lo cual detallamos a continuación.

### Inmunomodulación de las CDs por *F. hepatica*

Los juveniles recién desenquistados (NEJs) entran a la cavidad peritoneal penetrando a través de la pared intestinal con la ayuda de las catepsina B y L. La combinación de las alarminas liberadas por las células epiteliales del huésped con proteínas presentes en los productos de excreción/secreción (entre otras FhCL3, FhPrx, y FhHDM-1) así como con antígenos del tegumento, promueve el desarrollo de los macrófagos activados alternativamente (AAMs o M2) e interaccionan y activan parcialmente a las CDs, las cuales con un fenotipo inmaduro o semi - maduro favorecen una respuesta tolerogénica.<sup>48</sup> Paralelamente, los AAMs favorecen el desarrollo de una respuesta de tipo Th2 con un componente regulador, la cual se conoce como Th2 modificada<sup>48</sup>.

De esta manera, durante las etapas agudas de la infección, los animales infectados exhiben un aumento de IL-10, TGF $\beta$ , IL-4 e IFN $\gamma$ . Sin embargo, a medida que la infección progresa, las respuestas inmunológicas de tipo Th2/Treg se vuelven más dominantes<sup>49</sup>. Durante las fases crónicas posteriores, las células Treg liberan citoquinas que inhiben las citoquinas Th1/Th2 inflamatorias<sup>49</sup>.

Por otro lado, en modelos de infección experimentales, se ha determinado que las CD CD11c+, presentan con un fenotipo inmaduro o semi-madura<sup>48</sup>. Éstas presentan un aumento en la producción de IL-10 y en ensayos *ex vivo* se vio que suprimen la secreción de IL-17 e IFN $\gamma$  por parte de los linfocitos T CD4<sup>48</sup>. Nuestro grupo de investigación también ha obtenido evidencias en este sentido, demostrando que las células CD11c+ peritoneales de ratones infectados con *F. hepatica* secretan alto contenido de IL-10, polarizan linfocitos a Th2/reg que producen IL-10 y suprimen respuestas de tipo Th1<sup>46</sup>.

### Glicanos e inmunomodulación sobre las CDs

Muchas proteínas y lípidos de los helmintos se encuentran glicosilados, los cuales proveen potenciales ligandos de los receptores de lectinas tipo C (CLRs) presentes en las CDs, entre otras células de la inmunidad innata<sup>50,51</sup>. Además, se ha visto que los

CLRs están involucrados en mediar la regulación de la respuesta inmune desencadenada por glicoconjugados helmínticos<sup>52,53</sup>. De hecho, los antígenos solubles de los huevos de *Schistosoma mansoni* señalizan a través de CLRs, en particular MR (Receptor de Manosa por su sigla en inglés), inhibiendo la maduración de las CD<sub>s</sub>, mediante una RNAsa glicosilada la cual ingresaría por el MR y degradaría el mRNA de IL-12, promoviendo la diferenciación hacia un perfil Th2<sup>52</sup>.

Además, se ha reportado que glicanos de *Brugia malayi* participan en la inducción de una respuesta tipo Th2, visto que extractos parasitarios oxidados con meta-periodato de sodio inducen bajos niveles de IL – 4 en ganglios linfáticos<sup>54</sup>. En *Trichuris suis* se ha reportado recientemente la supresión de la producción de TNF $\alpha$  por las CD<sub>s</sub> estimuladas con LPS, a través del reconocimiento de residuos de Manosa o N acetil Galactosamina por CLRs específicos<sup>55</sup>. Estas evidencias demuestran que los glicanos parasitarios poseen una función esencial en el desarrollo de las respuestas Th2 modificadas inducidas por helmintos.

### **Modulación de CD<sub>s</sub> por glicanos de *F. hepatica***

Nuestro grupo de investigación fue el primero en reportar que los glicanos de *F. hepatica* poseen un papel fundamental en la modulación de la maduración y función de CD<sub>s</sub><sup>29</sup>. En efecto, las CD<sub>s</sub> provenientes de animales infectados poseen un estado semimaduro caracterizado por bajos niveles de MHCII y aumentando la producción de IL-10. Además, los glicanos de *F. hepatica* poseen un rol importante en la modulación de la maduración de las CD<sub>s</sub> inducida por LPS, disminuyendo así la producción de IL-6 e IL-12/23p40 y aumentando la de IL-10. Esta inhibición estaría al menos parcialmente mediada por el reconocimiento de CLR específicos de manosa que señalizan a través del reclutamiento de la fosfatasa Php2<sup>29</sup>.

Nuestros resultados también han sido corroborados por otros grupos de investigación. Se ha visto que los antígenos tegumentarios altamente glicosilados de *F. hepatica* (FhTeg) exhiben propiedades supresoras de Th1 *in vivo* al disminuir la producción de mediadores como IFN $\gamma$  y IL-12p70 en el modelo de shock séptico en el ratón<sup>56</sup>. Las CD<sub>s</sub>

---

y mastocitos activados por FhTeg responden de menor forma a la activación por TLRs al suprimir la producción de enzimas inflamatorias y moléculas coestimuladoras importantes para el desarrollo de respuestas adaptativas<sup>56,57</sup>. La vía de señalización desencadenada por FhTeg es independiente de TLR y ha sido asociada a la supresión de las vías NF- $\kappa$ B y MAPK<sup>58</sup>. Estas evidencias resaltan la importancia de los glicoconjugados en modular las CDs.



## Hipótesis de trabajo

En esta tesis, proponemos que las glicoproteínas de tipo mucina y las glicoproteínas altamente manosiladas de *F. hepatica* poseen propiedades inmunomoduladoras sobre la maduración de las CDs. Esta hipótesis se fundamenta por: i) el papel fundamental de los glicanos a nivel de la biología parasitaria<sup>59</sup>; ii) La gran variedad de evidencias que reportan propiedades inmunomoduladoras por parte de glicoproteínas, incluyendo a las mucinas, sobre la maduración, función y el procesamiento antigénico de las CDs<sup>56,60,61</sup>; iii) la identificación de transcritos que codifican para proteínas de tipo mucina en el estadio invasivo del parásito<sup>36</sup>; y iv) la presencia de alto contenido de manosa en los glicoconjugados parasitarios<sup>30,31</sup>.



## Objetivos generales y específicos

El objetivo general de esta tesis comprendió la purificación y caracterización de glicoproteínas de tipo mucina y glicoproteínas altamente manosiladas de *F. hepatica* y la evaluación de su capacidad de inmunomodular la maduración de CD4.

En particular, como objetivos específicos nos planteamos:

- Identificar y obtener glicoproteínas de tipo mucina así como glicoproteínas altamente manosiladas producidas por *F. hepatica*.
- Caracterizar bioquímicamente las glicoproteínas purificadas, a través de la identificación de su peso molecular aparente y punto isoeléctrico.
- Determinar el perfil de estructuras carbohidratadas expresados por las glicoproteínas obtenidas a través de su reconocimiento por lectinas.
- Evaluar la modulación de la maduración de las CD4 por parte de las glicoproteínas obtenidas.



## Materiales y Métodos

### Ratones

Se utilizaron ratones hembras BALB/c de 6 a 8 semanas de edad. Los ratones fueron adquiridos en la División de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Éstos fueron mantenidos en la Unidad de Reactivos para Biomodelos de Experimentación (URBE - Facultad de Medicina), en un ambiente controlado, con temperatura entre 19 y 21°C y ciclos de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Los animales fueron alojados en jaulas con filtro y recibieron agua y ración estéril, administradas en condiciones *ad libitum*. Todos los experimentos animales fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA, UdelaR, Protocolo No. 071140-000143-12). Las infecciones de ratones con *F. hepatica* se realizaron de la siguiente manera. Grupos de 5 ratones BALB/c fueron infectados oralmente con 10 metacercarias de *F. hepatica* (DILAVE). Transcurridas las 3 semanas de infección los animales fueron sangrados y para la obtención de suero.

### Preparación del Extracto Total de *F. hepatica* (FhTE)

Los gusanos adultos de *F. hepatica* fueron obtenidos durante visitas a la playa de faena del Frigorífico Carrasco, recolectados de los ductos biliares de hígados bovinos infectados. Para producir el extracto total, los gusanos adultos fueron lavados en buffer fosfato salino (PBS) pH 7,4, disgregados mecánicamente en presencia de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich, P2714) con la ayuda de un homogenizador y ultrasonicador y posteriormente centrifugado a 40.000 g por 60 min. El sobrenadante fue dializado contra PBS por al menos 48 horas. Posteriormente, fue almacenado a -80°C. La concentración proteica del lisado obtenido (FhTE) fue cuantificada utilizando el método del ácido Bicinconínico (BCA – Sigma-Aldrich, US). Los niveles de endotoxinas fueron determinados usando el kit Limulus Amebocyte Lysate Pyrochrome (Associates of Cape Cod). Los lisados presentaron niveles de endotoxinas bajos que no activaron a las CDs.

### Análisis por SDS-PAGE

El análisis de las fracciones proteicas se realizó por SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio) utilizando el método Lambli. Las muestras proteicas se trataron con agentes desnaturalizantes (SDS), reductores (beta-mercaptoetanol 5%), y calor (1 min a 100°C). Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida del 15%.

Luego de la corrida electroforética las proteínas fueron visualizadas con la utilización de un colorante, Coomassie brilliant Blue R (Sigma- Aldrich, US).

### Análisis por método de Western Blot

La identificación de las cadenas liviana y pesada de anticuerpos purificados, se llevó a cabo mediante Western Blot. Las proteínas se separaron en un SDS-PAGE al 15% y transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham, Francia) a 45 V durante 16-24 horas en buffer Tris-HCl 20mM pH 8,3, Glicina 192 mM y Etanol 10%. Las membranas se bloquearon durante toda la noche a 4°C con BSA 1% en PBS. Luego se hicieron 3 lavados con PBS/Tween-20 0.1% (solución de lavado) durante 10 minutos en agitación. Posteriormente, las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente con anticuerpos de cerdo multilink biotinilados 1/2000 (DAKO, E0453).

Luego de los correspondientes lavados, se realizó una incubación con streptavidina dye-lite 800nm con una dilución 1/5000 en PBS BSA 1%. El revelado se realizó mediante detección de fluorescencia con el equipo **Odyssey**®.

### Estudio de glicoproteínas de FhTE mediante Lectin Blot

La identificación del perfil de bandas correspondientes a componentes manosilados en el FhTE se llevó a cabo mediante Lectin Blot. Las proteínas se separaron en un SDS-PAGE al 15% y transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham, Francia) a 45 V durante 16-24 horas en *buffer* Tris-HCl 20mM pH 8,3, Glicina 192 mM y Etanol 10%. Las membranas se bloquearon durante toda la noche a 4°C con BSA 1% en PBS. Luego se

hicieron 3 lavados con PBS/Tween-20 0.1% (solución de lavado) durante 10 minutos en agitación. Posteriormente, las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente con lectina ConA HRP a una concentración de 2.4µg/mL. Se realizaron 5 lavados con solución de lavado de 10 minutos cada uno. El revelado se realizó mediante quimioluminiscencia (Amersham, Sclay, Francia).

Previo a su utilización en el Lectin blot, la ConA fue conjugada a la peroxidasa de rábano (HRP). Se utilizó HRP (2 mg, Sigma-Adlrich) para conjugar 1 mg de ConA. Para ello se activó la HRP con NaIO<sub>4</sub> 0,01 M pH 6,8 por 10min. La ConA se preservó en buffer fosfato 0,01 M pH 8.4. Se agregó la HRP activada a la solución del ConA a una concentración de 1 mg/mL. Se incubó a temperatura ambiente durante 1h. Posteriormente se agregó 0,01 M de glicina y posteriormente se dializó el conjugado contra PBS. Se alicuotó y preservó a -20°C.

### **Análisis por técnica de ELISA**

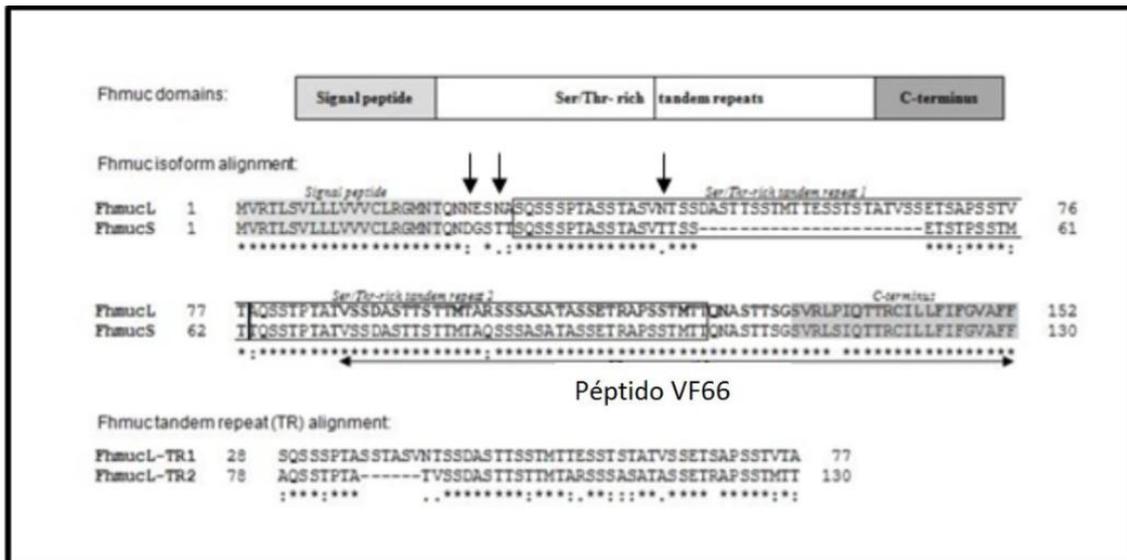
El reconocimiento de las glicoproteínas parasitarias obtenidas por parte de anticuerpos específicos de *F. hepatica* se realizó a través de un ensayo de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) utilizando anticuerpos de animales infectados. Para ello, se sensibilizaron placas de 96 pocillos (NUNC, Dinamarca) con 100 µL de las diferentes mestras en buffer carbonato de sodio 0,1 M pH 9, toda la noche a 4°C. Posteriormente, se efectuaron 3 lavados con solución de lavado, seguido del bloqueo, el cual se realizó con gelatina 1% en PBS (PG) durante una hora a 37°C. Luego de 3 lavados se incubaron las muestras de suero provenientes ratones infectados con *F. hepatica* o sueros control de ratones no infectados diluidos en PBS conteniendo 0.5% de gelatina y 0.05% de Tween 20 (PTG) por una hora a 37°C a diferentes concentraciones (1/100, 1/200, 1/400). A continuación se lavó 3 veces, para luego incubar durante 1 hora a 37°C con anticuerpo secundario. El anticuerpo secundario en cada oportunidad varió dependiendo del diseño experimental, pero a grandes rasgos consistió en un anti-IgG conjugado con biotina de la especie en la que provino del anticuerpo primario. Luego, se llevaron a cabo 5 lavados adicionales para posteriormente incubar con la solución de revelado, que consistió en o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Sigma-Aldrich, EE.UU) y peróxido de

hidrogeno (4  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) en buffer citrato-fosfato 0.1 M pH 5, y el desarrollo de color fue cuantificado con un lector de ELISA (Labsystems Multiskan MS) midiendo absorbancia a 492 nm. Se incluyeron los controles negativos y positivos pertinentes en cada ensayo.

### **Péptido VF66**

VF66 (Figura 14) es un péptido sintético (Peptide 2.0 Inc.) de 66 aminoácidos que proviene de la secuencia predicha de un transcrito (contig FH00023) recientemente identificado a partir de una biblioteca de ADNc28. Este péptido, al igual que las proteínas de tipo mucina tiene un alto contenido de repeticiones de residuos hidroxilados que constituyen sitios potenciales de O-glicosilación (serinas y treoninas).

Se conocen dos isoformas, FhmuL y FhmucS, que comparten gran homología de secuencia excepto por una inserción de 22 aminoácidos. Tal como se detalla en la Figura 14, la predicción de la proteína Fhmuc, comienza con un péptido señal hidrofóbico de 20 aminoácidos, donde el sitio de corte del péptido señal se encuentra luego de la Thr precediendo la Glu en la posición 1 de la proteína madura. La porción que sigue al péptido señal es rica en residuos de Ser y Thr. La isoforma FhmuL posee dos tandem repetidos, conteniendo alta densidad de residuos de Ser y Thr de alta probabilidad a ser O-glicosilados (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc>). Por último la región C terminal es de 22 residuos y se compone principalmente de aminoácidos hidrofóbicos.



**Figura 14- Representación esquemática de las dos isoformas identificadas para Fhmuc.** Se detallan las secuencias de las dos isoformas de la Fhmuc, L y S. Se señalan los amino-ácidos compartidos (\*) Ambas regiones cuentan con una secuencia correspondiente a un péptido señal, un secuencia abundante en repeticiones de serina y treonina y un dominio C-terminal. Las flechas indican los sitios potenciales de N-glicosilación. La flecha horizontal indica donde se encuentra el péptido VF66.

Teniendo en cuenta el alto grado de homología entre ambas isoformas de Fhmuc, se eligió un péptido más corto, que contiene la secuencia entre los amino ácidos 87 y 172 que incluye la mayor parte de las repeticiones en tándem y la región C-terminal de FhmucL. Este péptido se refiere en esta tesis como VF66, fue sintetizado por Peptide 2.0, Inc, US.

### Obtención de anticuerpos policlonales específicos de VF66

El suero policlonal anti-VF66 fue obtenido a partir de conejos inmunizados 3 veces subcutáneo con 500 µg del péptido en adyuvante de Freund cada 15 días. La primera inmunización se realizó en adyuvante de Freund completo, mientras que los refuerzos fueron en adyuvante de Freund incompleto. También se obtuvo un suero control a partir de conejos inmunizados con PBS en lugar del péptido VF66. El suero se obtuvo a partir de sangre extraída de los conejos un mes luego de la última inmunización.

Para purificar los anticuerpos IgG presentes en los sueros de conejos, se realizó una cromatografía de intercambio iónico en batch. Para ello, se resuspendió el Dietilaminoetil Celulosa (DE52, Whatman No. 4057050) en buffer fosfato pH 8. Se filtró con embudo Buchner. Se pasó 2,5 g de DE52 (peso húmedo) para 500 µL de dilución del suero. Se realizaron diluciones ¼ del suero de interés en agua destilada y se

mezclaron con el DE52. Se dejaron 1 hora a 4°C en agitación. Posteriormente se centrifugó la mezcla a 1500 rpm durante 4 minutos. Se guardó el sobrenadante. Se adicionaron 500 µl de buffer fosfato, dejando en agitación durante 5 minutos a 4 °C, se centrifugó a 1500 rpm y se guardó el sobrenadante (L1). Se repitió este último paso 2 veces más (obteniéndose L2 y L3). La elución final fue con NaCl 0,5M. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE y Western Blot de la forma explicada previamente. Se determinó la presencia de IgGs de conejo purificadas mediante Western Blot utilizando anticuerpos policlonales biotinilados anti -cabra, anti-ratón y anti-conejo (multi-link, Dako). El revelado fue

### **Evaluación del reconocimiento de FhTE por anticuerpos $\alpha$ VF66**

La evaluación del reconocimiento de FhTE por los anticuerpos anti-VF66 fue realizada por ELISA. En particular, se sensibilizaron placas con FhTE a una concentración de 100 ng/ml en buffer carbonato 0.1 M pH 9. Luego del bloqueo, se incubaron los anticuerpos anti-VF66 y el control diluido en PTG por una hora a 37°C a diferentes concentraciones (1/100, 1/200, 1/400). El anticuerpo secundario utilizado en este ensayo fue el anti-conejo polivalente conjugado a la peroxidasa (SIGMA, EE.UU) diluido 1500 veces en PTG. Como controles negativos de la técnica se consideraron los valores de absorbancia sin antígeno, y/o sin anticuerpo secundario. El control positivo correspondió al reconocimiento del péptido sintético VF66 por el anticuerpo generado anti-VF66.

### **Enriquecimiento en glicoproteínas por cromatografía de afinidad utilizando anticuerpos anti-VF66.**

#### **Generación de la columna de afinidad con anticuerpos anti-VF66**

Para la generación de la columna de afinidad inicialmente se diluyeron los anticuerpos purificados en buffer bicarbonato 0.1 M pH 8.7. Una vez hidratada la agarosa activada con bromuro de cianógeno (Pharmacia No. 17-0430-01) con HCl 0.1 M, se adicionó 8

mg de anticuerpos purificados anti-Fhmuc por 2.5 ml de gel. Posteriormente, se bloquearon los sitios activos del gel que no se unieron al anticuerpo con glicina 0,2 M pH 8. Se realizaron lavados posteriores con buffer bicarbonato 0.1 M pH 8,3 controlando la absorbancia de los mismos a 280 nm hasta que la misma fuera menor a 0,05. Seguidamente se realizaron lavados con buffer acetato pH 4,0 procediendo de igual manera que en la etapa anterior. La columna se preservó con buffer bicarbonato 0,1 M pH 8,3 a 4°C conteniendo azida de sodio 0,02%. Con iguales indicaciones se generó una columna control, en esta oportunidad con el conjugado de IgGs purificadas a partir del suero control (conejos inmunizados con PBS).

### **Obtención de componentes mucínicos por cromatografía de afinidad**

Se incubó 1 ml de FhTE (a 12,5 mg/ml) con la columna por recirculación toda la noche a 4°C. La fracción no unida a la columna se denominó percolado. La columna se lavó con buffer fosfato 10 mM pH 6.5 (lavados ácidos) para luego realizar eluciones a pH ácido con buffer glicina 100 mM pH 2.5 (eluidos ácidos). Se realizaron lavados nuevamente pero con buffer fosfato 10 mM pH 8 (lavados básicos) y finalmente se eluyó a pH alcalino con buffer trietilamina 100 mM pH 11.5 (eluidos básicos). Todos los lavados y eluciones fueron llevados a pH 7 inmediatamente luego de obtenidos. Posteriormente, se regeneró la columna con PBS conteniendo NaCl 0.5 M. La elución se monitoreó a través de la medida de la absorbancia a 280 nm y por ELISA utilizando anticuerpos presentes en sueros de ratones infectados con anti-*F. hepatica*. Con el objetivo de evitar la presencia de endotoxinas en los extractos los mismos fueron sometidos a columnas de polimixina B (Detoxigel, Pierce).

### **Concentración de EI-VF66 por precipitación con ácido tricloroacético (TCA)**

A las diferentes muestras obtenidas se dializaron ON contra PBS 0,05 X. Se les agregó ácido tricloroacético para alcanzar una concentración final del 13%. Se incubó toda la noche a -20°C y luego 15 minutos a 4°C. Las muestras se centrifugaron 15 minutos a 4°C a 15000 g. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en agua

destilada de manera de concentrar 20 veces el material. Se dializaron nuevamente contra PBS. Se analizaron por SDS PAGE como se explicó anteriormente. Posteriormente, se estimó la concentración del EI-VF66 mediante el método del BCA.

## Obtención de fracciones parasitarias reconocidas por la lectina ConA

### Generación de la columna con ConA: Activación de agarosa

El gel agarosa 4B, se activó utilizando el agente cianilante ciano-4-dimetil-amino-piridinio tetrafluoro borato (CDAP-BF<sub>4</sub>) de forma de introducir grupos cianato éster<sup>62</sup>. Todos los reactivos utilizados fueron pre-enfriados a 4°C. Se lavaron 3 g de agarosa 4B con: 50 ml de agua destilada, 50 ml de acetona:agua (3:7) y 50 ml de acetona:agua (6:4). Se escurrió el gel haciendo vacío, se suspendió en 2 ml de acetona:agua (6:4) y se colocó en baño de hielo. Posteriormente, se agregaron a la suspensión de gel 2 ml de CDAP 160 mM en acetona:agua (6:4) bajo agitación vigorosa durante 3 minutos. A continuación, se agregaron 240 µl de una solución de trietilamina (TEA) 0,2 M gota a gota durante un periodo de 2 a 3 minutos. Después de 3 minutos de agitación continua, se transfirió rápidamente la mezcla de reacción a un recipiente conteniendo 50 ml de HCl 50 mM enfriado a 4°C. Luego de un máximo de dos minutos el gel se lavó rápidamente en una placa filtrante con 50 ml de agua a 4°C y se utilizó en forma inmediata para la inmovilización de la lectina ConA.

### Generación de la columna con Con A: Inmovilización de la lectina

Para la inmovilización de la lectina ConA, se incubó 1 g de agarosa activada con 5 ml (4 mg/mL) de Conavalina A (Sigma Aldrich) en buffer fosfato de sodio 100 mM pH 7,5 suplementado con 0,1 mM de acetato de zinc (buffer de inmovilización) durante 4 horas a temperatura ambiente y agitación suave en roto-torque. Se separó el sobrenadante, se lavó el derivado inmovilizado con buffer de inmovilización y se guardó a 4°C. La cuantificación de la ConA inmovilizada en agarosa se determinó por diferencia entre la proteína aplicada y la recuperada en el sobrenadante mediante la

técnica de BCA. Los resultados se expresaron en mg/mL para la enzima soluble y mg/g para los derivados inmovilizados.

### Purificación de glicoproteínas manosiladas por cromatografía de afinidad

Una vez generada la columna de afinidad se equilibró con 4 mL de PBS pH 7,4 0,4 M NaCl, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub> y 1 mM MgCl<sub>2</sub>. Adsorbimos FhTE (12,5 mg) obteniéndose diferentes fracciones: percolado, lavados (en PBS NaCl pH 7,4 0,4 M, MnCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM y MgCl<sub>2</sub> 1 mM), eluciones con manosa 0,5 M, eluciones básicas con buffer carbonato 0,1 M pH 8,5 y eluciones ácidas con buffer acetato de sodio 0,1 M, NaCl 0,4 M, MnCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM y MgCl<sub>2</sub> 1 mM pH 4,5). Se realizan lavados posteriores con buffer acetato de sodio pH 6,0. Se analizaron las diferentes fracciones midiendo su absorbancia a 280 nm. No se cambió el agente de elución hasta que la absorbancia en las fracciones obtenidas fuera inferior a 0,1.

### Evaluación del reconocimiento de fracciones parasitarias por parte de lectinas

Para la evaluación del reconocimiento de las fracciones obtenidas por lectinas se realizó un ensayo de tipo ELISA las placas se sensibilizaron con 10µg de FhTE/Percolado por well o sensibilizando con el material obtenido en las purificaciones diluido al medio en *buffer* carbonato de sodio 0,1 M pH 9, toda la noche a 4°C. Posteriormente, se efectuaron 3 lavados con solución de lavado, seguido del bloqueo, el cual se realizó con BSA 1% en PBS durante una hora a 37°C. Luego de 3 lavados se incubaron las muestras con diferentes concentraciones de lectinas biotiniladas (20, 10, 1 y 0,1 µg/mL) durante 1 hora a 37°C. En el presente trabajo se utilizaron las lectinas provenientes de: *Vicia Villosa* isolectina B4 (VVL: GalNAc, Antígeno Tn), *Triticum vulgare* (WGA: GlcNAc), *Candavulina ensiformis* (ConA: αMan>αGlc), *Arachis hipogaea* (PNA: βGal(1→3)GalNAc, Antígeno T). Posteriormente, se adicionó estreptavidina-HRP (horse raddish peroxidase) y se reveló con OPD 0,4mg/MI (Sigma-Aldrich) como fue anteriormente descrito.

Previamente a su uso en el ELISA las lectinas fueron conjugadas a biotina. Para ello se incubó 100 µg de biotina por cada miligramo de lectina en *buffer* carbonato 100 µM pH 8.4 ON a 4°C en rotación. Luego se dializó contra PBS en una membrana con poro de 10 kDa. Se cuantificó mediante método de BCA y se probó reactividad mediante ensayo tipo ELISA.

### **Oxidación de FhTE y OSM con meta-periodato de sodio**

Los dioles vecinales presentes en los carbohidratos de presentes en las fracciones parasitarias y el FhTE fueron oxidados con metaperiodato de sodio (10 mM) en PBS pH 6,5, a temperatura ambiente por 45 min en la oscuridad. Posteriormente, los grupos aldehídos formados fueron reducidos con borhidruro de sodio (50 mM). Finalmente, los lisados fueron dializados contra PBS. El lisado oxidado resultante es referido como FhTEox. Asimismo, se utilizó el control buffer trietilamina (BT) oxidado, consistiendo en el buffer de partida sujeto a todo el tratamiento.

### **Generación de CDs derivadas de médula ósea (BMDCs)**

Ratones de 6 a 8 semanas fueron sacrificados y sus fémures fueron extraídos. Luego de lavar los fémures en PBS los mismos fueron colocados en medio RPMI 1640 (PAA Laboratories, Austria) completo con suero fetal bovino (FBS) al 10% previamente inactivado a 56°C, 50 mM de 2-mercaptoetanol, 100 U/ml penicilina y 100 U/mg estreptomicina (Sigma-Aldrich). Utilizando una jeringa se extrajo la médula ósea y se resuspendió en medio RPMI completo complementando al 1% con sobrenadante de células J558 conteniendo GM-CSF (factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos) para diferenciar los precursores hematopoyéticos a BMDC en una concentración de  $1 \times 10^6$  céls/ml. Los precursores fueron incubados por 6 días a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> en placas de Petri de 20 ml. En el día 3 se agregó 4 ml de medio RPMI completo suplementado con 1% de GM-CSF. Al día 7 las células en suspensión fueron colectadas. Se centrifugaron 5 min a 1500 rpm a 4°C y se resuspendieron en medio RPMI completo a la concentración deseada.

## Maduración de BMDCs

Las BMDC generadas fueron depositadas en placas de 96 pocillos a una concentración de  $5.0 \times 10^5$  células/pocillo. Posteriormente se incubaron con el FhTE (75 µg/ml), fracciones correspondientes a percolados (75 µg/ml) y eluidos (20 µg/ml) o medio toda la noche a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. El sobrenadante de las células incubadas fue colectado para evaluar los niveles de citoquinas por ELISA (IL-6, IL -12, IL -10, TNFα) en presencia o ausencia de LPS (1 µg/pocillo) o CpG (0.5 µg/pocillo) como se detalla en la sección siguiente.

## Medición de citoquinas por ELISA

La detección de citoquinas producidas por las BMDC se realizó mediante ELISA de tipo sándwich. Para ello se sensibilizaron placas NUNC Maxisorp con anticuerpos anti-citoquina de interés en buffer fostato 100 mM pH 9 (excepcionalmente para IL-10 pH 6.5), durante una noche a 4°C, posteriormente se lavaron las placas con una solución de solución de lavado para proceder al bloqueo de las mismas en solución de BSA 1% en PBS, durante 1 hora a 37°C. Luego de 3 lavados con solución de lavado, se incubaron los sobrenadantes provenientes de los cultivos de las BMDC diluidos en PBS BSA 0.5% Tween-20 0.05% por 1 hora a 37°C. A continuación, se lavó 3 veces con solución de lavado y se incubaron por 1 hora a 37°C los anticuerpos secundarios en solución PBS BSA 0.5% Tween-20 0.05%. Se reveló de la misma forma que se explicó para otros ensayos de ELISA. Los valores fueron convertidos a concentración mediante la utilización de un estándar que fue tratado del mismo modo que la muestra problema.

## Estudio de viabilidad celular

Para evaluar si el tratamiento de las BMDC con las diferentes fracciones parasitarias altera su viabilidad, las BMDC tratadas como se describió previamente fueron incubadas con 100 µL de medio RPMI completo conteniendo una solución de 50 mg/mL de MTT ((3-[4,5- dimethylthiazol-2-yl]-2,5- diphenyl tetrazolium bromide; thiazolyl blue) a 37°C por 3 a 4 horas. Posteriormente, se disolvieron los cristales formados con 100 µL de una solución de HCl 0.1 N en alcohol isopropílico. Se cuantificó

---

la viabilidad midiendo la absorbancia a 570 nm en un lector de ELISA (Labsystems Multiskan MS). El control de 100% de viabilidad fueron pocillos en los cuales las células no sufrieron ningún tratamiento. Cada condición se realizó por triplicado.

### **Análisis estadístico**

Los resultados fueron analizados utilizando el test de t de Student o el test ANOVA de una vía seguido del test de múltiple comparación de Bonferroni utilizando el software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Los resultados fueron considerados significativamente diferente cuando  $p < 0,05$ .



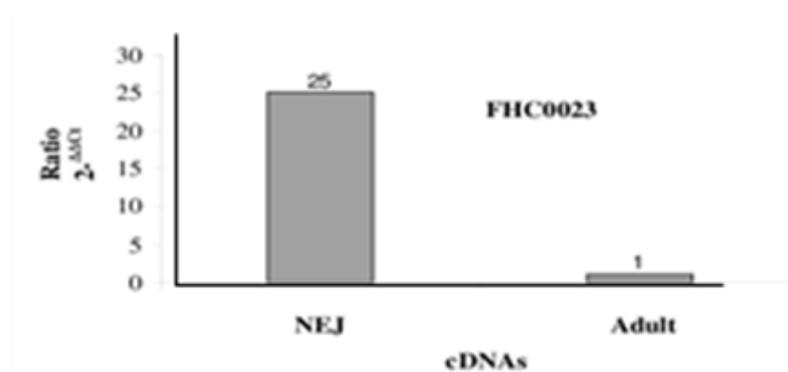
## Resultados

Los resultados se expondrán en dos partes. El eje de la primera parte es la obtención de proteínas de tipo mucina de *F. hepatica* y su estudio bioquímico e inmunológico. La segunda parte corresponde a la obtención de glicoproteínas manosiladas y el estudio de esta fracción desde el punto de vista bioquímico e inmunológico.

### Parte I: Obtención de proteínas de tipo mucina de *F. hepatica* y evaluación de sus propiedades inmunomoduladoras sobre CDs

#### Desarrollo de la columna de afinidad

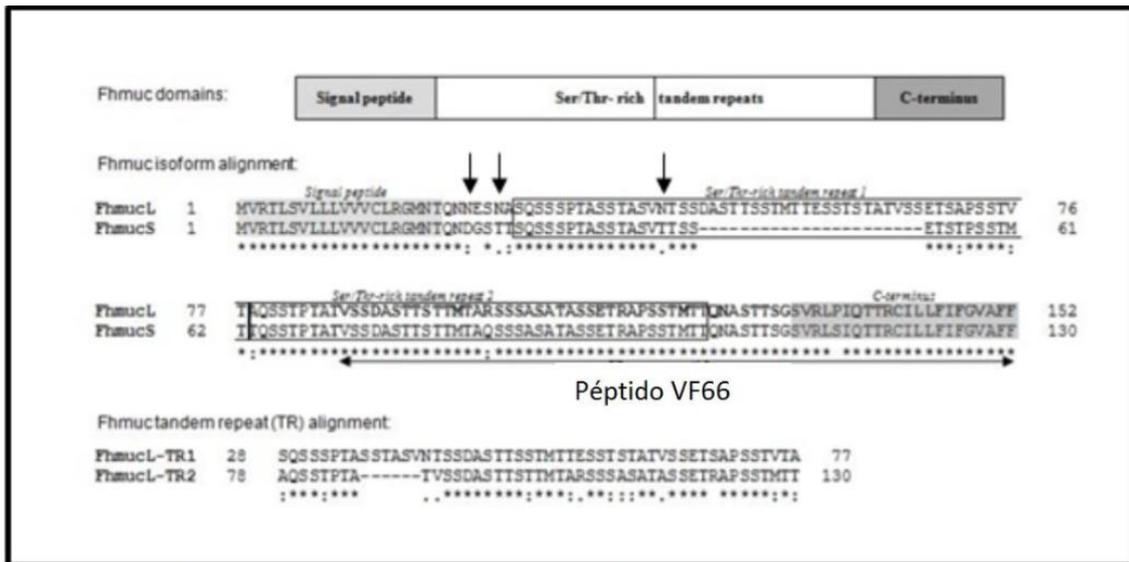
En este trabajo de maestría hipotetizamos que las proteínas de tipo mucina de *F. hepatica* poseen la capacidad de modular la maduración de CDs. Ello se fundamenta, no solamente en su alta expresión en el estadio invasivo del parásito<sup>36</sup> (Figura 15), sino además por el hecho de que: i) las glicoproteínas de tipo mucina parasitarias participan en diferentes procesos esenciales para la vida parasitaria, como infección, migración parasitaria, adhesión<sup>63</sup>, ii) existe gran variedad de evidencia sobre las propiedades inmunomoduladoras de CDs de mucinas humanas a través de la modulación de la función de las CDs, así como del procesamiento antigénico<sup>63</sup>, iii) los glicanos de *F. hepatica* pueden inhibir la maduración de las CDs<sup>29</sup>.



**Figura 15-** Expresión génica de Fhmuc (FHC0023) en el gusano adulto y en el juvenil (NEJ: Newly Excysted Juvenile) de *F. hepatica*. qRT-PCR realizada con primers específicos. Extraído de Cancela et al, 2010<sup>36</sup>.

Con el objetivo de evaluar las propiedades inmunomoduladoras sobre las CDs, primeramente nos propusimos la obtención de glicoproteínas de tipo mucina de *F. hepatica* a partir de un lisado total del parásito adulto (FhTE). Estudios anteriores de nuestro grupo de investigación han confirmado que dicho lisado inhibe la maduración de CDs<sup>29</sup>. Teniendo en cuenta que los transcritos de Fhmuc son altamente expresados en el estadio NEJ parasitario (Figura 15), un lisado total de NEJ hubiera constituido el preparado ideal de partida. Sin embargo, la cantidad de lisado obtenida a partir de NEJ es escasa y resulta incompatible con cantidades semi-preparativas necesarias para un enriquecimiento por cromatografía de afinidad. Además, los transcritos de Fhmuc también son expresados en el estadio adulto parasitario, aunque 25 veces menos (Figura 15) Por ello, nos propusimos el enriquecimiento en proteínas de tipo mucina utilizando como herramienta anticuerpos policlonales específicos de un péptido que corresponde a una parte de la secuencia de Fhmuc (Figura 16), denominado VF66. Este péptido está formado por 66 aminoácidos y fue diseñado a partir de transcritos codificantes para una proteína de tipo mucina (contig FH00023) recientemente identificado realización de una biblioteca de ADNc<sup>32</sup>.

Al igual que otra glicoproteínas de tipo mucina, FhmuL y FhmucS tienen un alto contenido de repeticiones Ser/Thr (Figura 16). Las dos isoformas identificadas por Cancela et al, 2010<sup>36</sup> comparten gran homología de secuencia excepto por una inserción de 22 aminoácidos. Tal como se detalla en la Figura 16 la secuencia proteica predicha de Fhmuc está caracterizada por la presencia de: i) un péptido señal hidrofóbico de 20 aminoácidos; ii) una región de corte del péptido señal luego de la Thr precediendo la Glu en la posición 1 de la proteína madura; iii) una porción rica en residuos de Ser y Thr. La isoforma FhmuL posee dos tandem en los que los residuos de Ser y Thr estarían glicosilados (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc>); y, por último iv) la región C terminal de 22 residuos, se compone principalmente de aminoácidos hidrofóbicos.

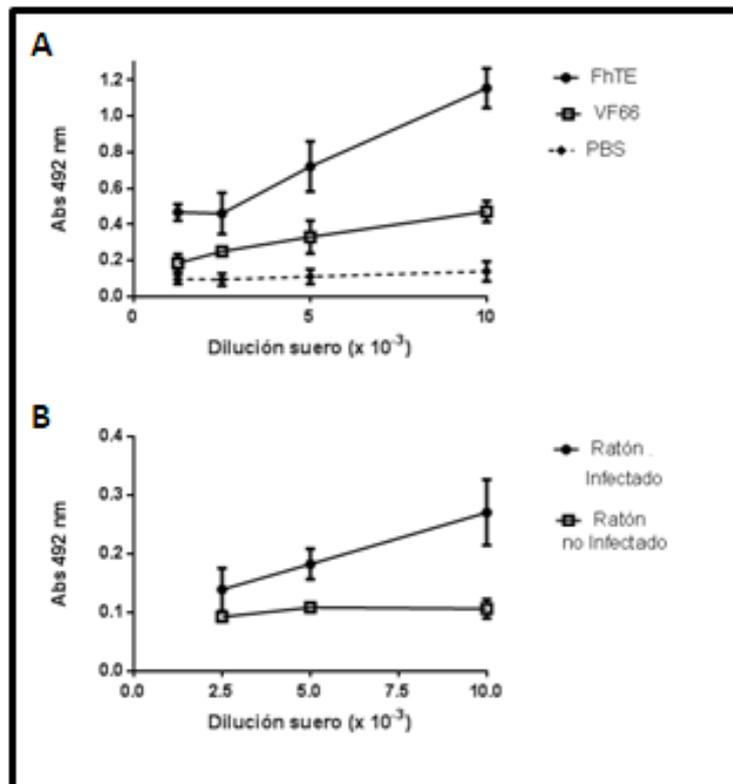


**Figura 16 - Representación esquemática de las dos isoformas identificadas para Fhmuc. y del péptido VF66** Se detallan las secuencias de las dos isoformas de la Fhmuc, L y S. Se señalan los aminoácidos compartidos (\*) Ambas regiones cuentan con una secuencia correspondiente a un péptido señal, un secuencia abundante en repeticiones de serina y treonina y un dominio C-terminal. Las flechas indican los sitios potenciales de N-glicosilación.

Teniendo en cuenta el alto grado de homología entre ambas isoformas de Fhmuc, se eligió un péptido más corto, que contiene la secuencia entre los aminoácidos 87 y 152 que incluye la mayor parte de las repeticiones en tándem y la región C-terminal de FhmucL. Este péptido se refiere en esta tesis como VF66.

Para determinar si el péptido sintético VF66 puede constituir una buena herramienta para purificar glicoproteínas de tipo mucina nativas de *F. hepatica*, analizamos si el mismo es reconocido por anticuerpos específicos de componentes inmunogénicos parasitarios por medio de la evaluación de su antigenicidad utilizando anticuerpos desarrollados durante una infección por *F. hepatica*. De esta forma, obtuvimos suero de ratones infectados con *F. hepatica* y de ratones no infectados (suero control) y evaluamos si los mismos reconocen al péptido VF66 por un ensayo de tipo ELISA. Como control positivo de este ensayo utilizamos FhTE. Como puede observarse en la Figura 17 A, el suero proveniente de ratones infectados reconoció el péptido VF66, aunque en menor proporción que el FhTE, el cual suministra una gran variedad de moléculas parasitarias. Sin embargo, el suero de animales no infectados (control) no

reconoció a dicho péptido (Figura 17 B), indicando que VF66 es reconocido por anticuerpos específicos de componentes parasitarios. Este resultado sugiere que la utilización de anticuerpos anti-VF66 puede constituir una estrategia interesante para enriquecer en proteínas de tipo mucina por cromatografía de afinidad.



**Figura 17 - Antigenicidad de VF66.** A- ELISA evaluando el reconocimiento de VF66 por parte de un pool de sueros provenientes de ratones infectados con *F. hepatica*. Como control positivo y negativo se evaluó el reconocimiento por FhTE y PBS, respectivamente. B- Reactividad de anticuerpos IgG presentes en sueros provenientes de ratones infectados con *F. hepatica* o ratones no infectados (control) por VF66 por ELISA.

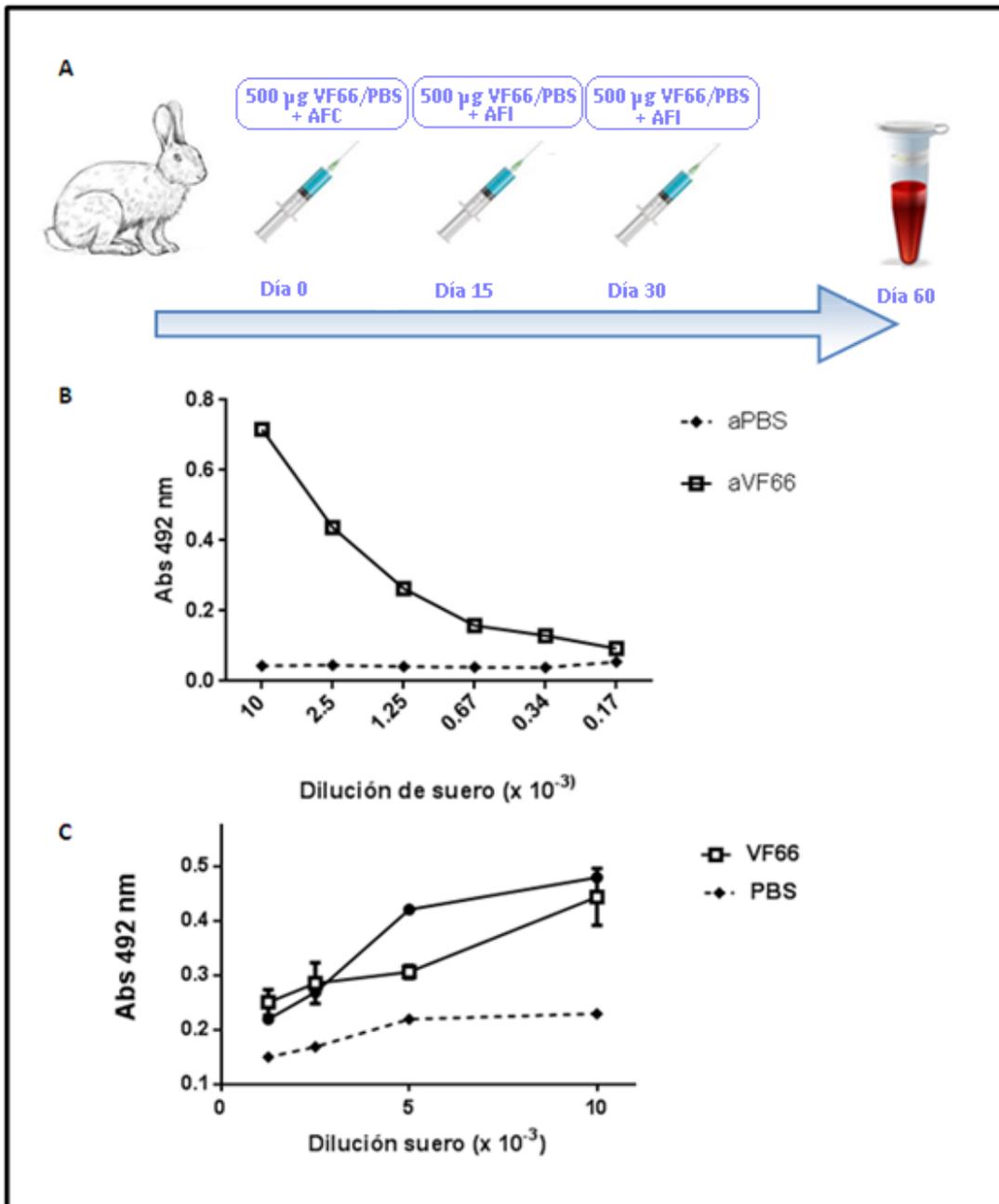
Posteriormente, procedimos a la generación de anticuerpos anti-VF66. Para obtener gran cantidad de suero con anticuerpos específicos contra VF66, decidimos generar dichos anticuerpos en conejos mediante la inmunización subcutánea en 3 oportunidades separadas por 15 días entre sí, con 500 µg del péptido VF66 en adyuvante de Freund completo (AFC) para la inmunización inicial e incompleto (AFI) para los refuerzos. Además, y con el fin de descartar cualquier reactividad cruzada con anticuerpos específicos de *Mycobacterium tuberculosis* (ya que el ACF posee componentes de dicha bacteria) también obtuvimos un suero control a partir de

conejos inoculados con PBS/AFC y PBS/AFI, siguiendo el mismo esquema de inmunización (Figura 18A).

El suero se obtuvo a partir de sangre extraída de los conejos un mes luego de la última inmunización. En la Figura 18 B se observa que únicamente el suero conteniendo los anticuerpos anti-VF66 reconoció al péptido correspondiente. Además, los anticuerpos anti-VF66, además de reconocer al péptido VF66, como era esperado, también reconocieron al lisado parasitario FhTE (Figura 18C), indicando que los anticuerpos anti-VF66 constituyen una herramienta para enriquecer en proteínas de tipo mucina por cromatografía de afinidad a partir de FhTE.

Una vez generados los sueros de interés (procedentes de los conejos inmunizados con VF66 y con PBS como control) y evaluada su reactividad contra VF66 y el lisado total del extracto procedimos a la purificación de las IgGs totales a partir de los mismos. Esto se realizó mediante purificación por intercambio iónico en batch. En la Figura 19A se observa la absorbancia a 280 nm de las fracciones de la purificación en batch, destacándose una disminución gradual en la misma en los sucesivos lavados con buffer fosfato a pH 8, donde esperamos encontrar los anticuerpos purificados por su punto isoeléctrico aproximado de 8,7. Al presentarse cargados negativamente éstos no se unirían a la matriz cargada negativamente a pH 8. Sin embargo, el resto de las proteínas del plasma sérico, con puntos isoeléctricos menores a 8 en su mayoría permanecerían unidas a la resina de intercambio. Esto es congruente con el marcado aumento de la absorbancia a 280 nm que se observa al eluir con NaCl 1M. Por otro lado, evaluamos la presencia de IgG en los lavados y eluidos mediante ELISA utilizando un anticuerpo anti-IgG de conejo. Este ensayo permitió detectar mayor reactividad en los lavados, la cual disminuyó en los eluidos (Figura 19 B) confirmando la presencia de IgGs en los lavados. Por último, caracterizamos los anticuerpos IgG purificados por SDS-PAGE (Figura 19 C). Las fracciones correspondientes a los lavados se separaron en 2 bandas mayoritarias a nivel de los 50 y 25 kDa, que podrían corresponder con las cadenas pesadas y livianas de las IgGs respectivamente. Posteriormente, a fin de verificar si estas bandas correspondían efectivamente a las cadenas pesadas y livianas de los anticuerpos purificados realizamos un ensayo de Western Blot, utilizando un anticuerpo secundario específico contra IgGs de conejo, el cual reconoció principalmente las cadenas livianas de las IgG (Figura 19 D). De esta forma logramos

exitosamente la purificación de IgGs de los sueros de conejo. El mismo procedimiento se realizó con los anticuerpos provenientes del suero de los conejos inoculados con PBS/Adyuvante, obteniendo resultados similares (no mostrados).



**Figura 18- Inducción de anticuerpos  $\alpha$  VF66 en conejo.** A- Esquema de Inmunización de los conejos. Los conejos fueron inmunizados cada 15 días con 500 µg de VF66 en adyuvante de Freund. Como control se utilizó suero de animales inoculados con PBS en adyuvante de Freund. Al mes de la última inmunización se sacrificaron los conejos y se obtuvo el suero a partir de la sangre. B- Reconocimiento de VF66 por suero con anticuerpos anti-VF66 y suero control C- Reconocimiento de FhTE y VF66 por el suero conteniendo anticuerpos anti-VF66. Como control se utilizó PBS. Las fracciones de IgG purificadas a partir de sueros de conejos inoculados con VF66/adyuvante (que a partir de ahora llamaremos "anticuerpos anti-VF66") y con PBS/adyuvante (que denominaremos "anticuerpos control") fueron utilizadas para preparar columnas de agarosa que sirvieron que herramienta para realizar una posterior cromatografía de afinidad. Para ello, incubamos las IgG diluidas en buffer bicarbonato la agarosa activada (adicionó 8 mg de anticuerpos purificados anti-Fhmuc por 2.5 ml de gel). Se bloquearon los sitios activos del gel que no se unieron al anticuerpo con glicina 0,2M, pH 8.0. Se realizaron lavados posteriores con buffer bicarbonato.

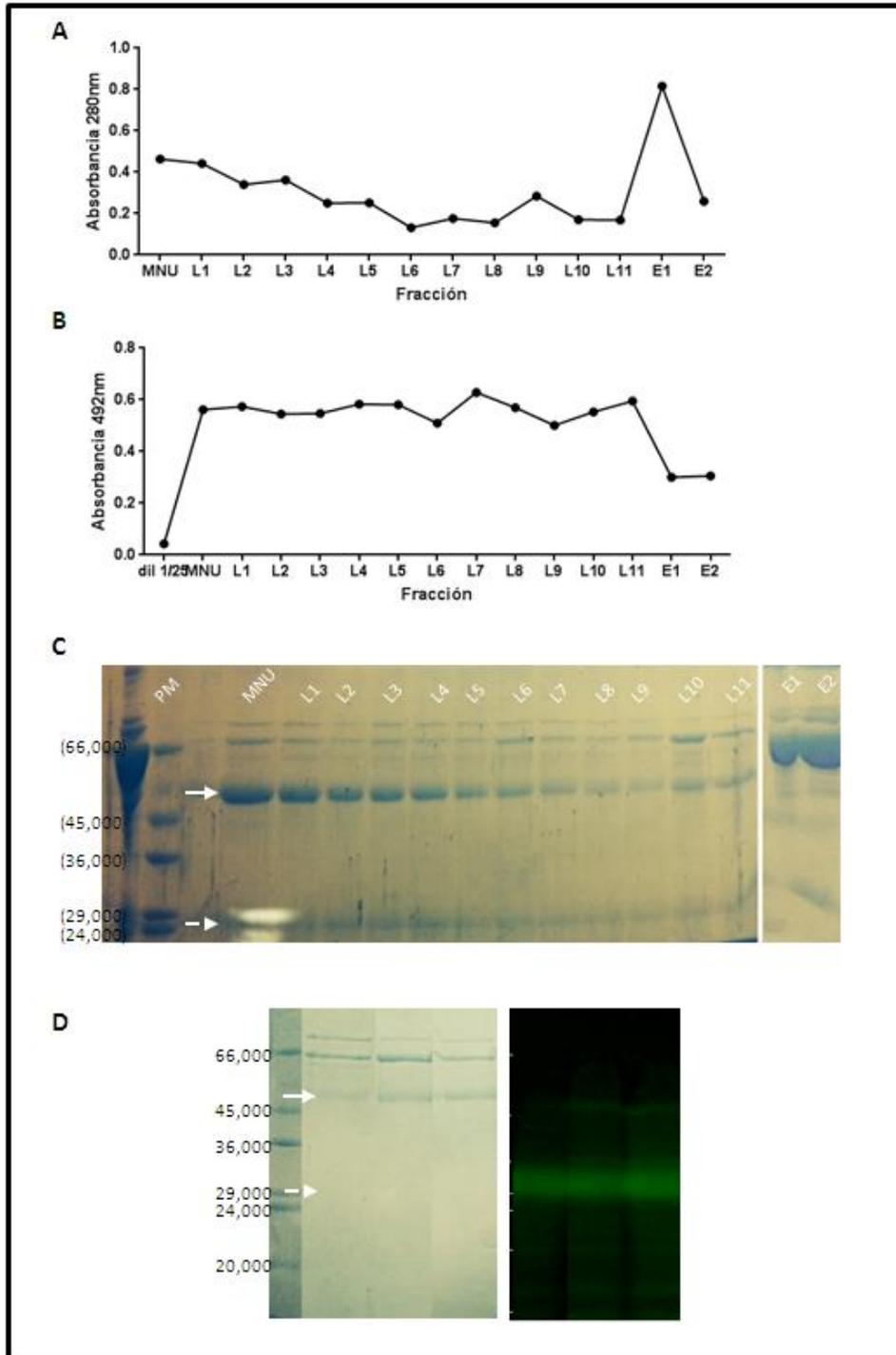


Figura 19 -

**Purificación de IgG específicas del péptido VF66 a partir del suero de conejo inmunizados.** **A)** Determinación de la Absorbancia a 280 nm de cada fracción de la purificación de suero de conejo mediante intercambio iónico. **B)** Reconocimiento de las distintas fracciones mediante técnica de ELISA obtenidas por anticuerpo anti IgG de conejo. **C-** SDS-PAGE 15% de las fracciones purificadas teñidos con coomasie blue. PM corresponde al peso molecular (Sigma- Aldrich SigmaMarker low range), MNU: Material no unido, L1-L11: Lavados con buffer carbonato donde se encuentran las IgG, E1-2: Eluidos con NaCl 0,5M **D)** Western Blot utilizando un anticuerpo de cerdo anti-conejo biotinilado el revelado fue con el equipo Odyssey mediante el uso de streptavidina dye lite 800nm. La flecha completa y punteada indican respectivamente dónde se encuentra el peso molecular esperado para la cadena pesada y liviana de IgG.

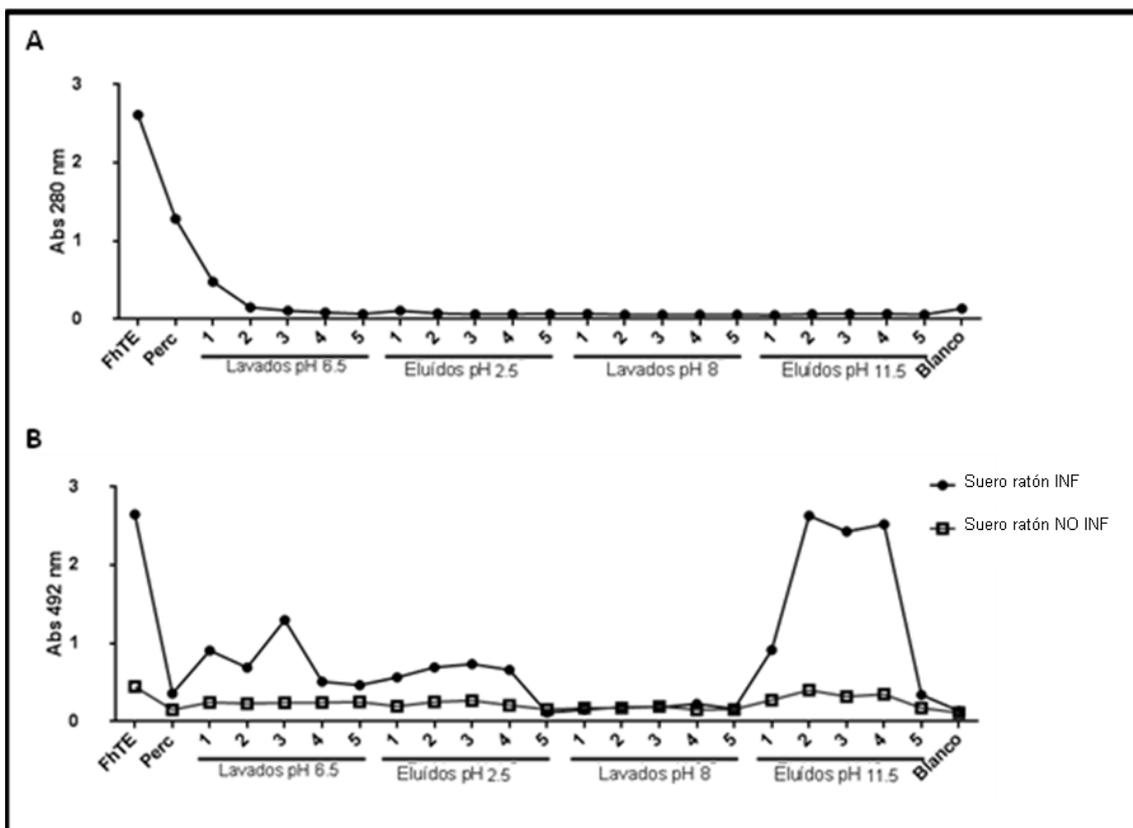
### Obtención de glicoproteínas con los anticuerpos $\alpha$ VF66 (E1 $\alpha$ VF66)

Con el objetivo de obtener fracciones del extracto parasitario reconocidas por el pool de anticuerpos policlonales contra el péptido VF66, generamos una columna de agarosa a la cual unimos las IgGs purificadas como se explicó en la sección correspondiente de Materiales y Métodos. De la misma forma generamos una columna control utilizando el suero del conejo inmunizado con PBS de manera de poder determinar cualquier reactividad cruzada con componentes del lisado parasitario que pudieran ser reconocidos por anticuerpos no específicos de VF66 presentes en el suero. Con esta herramienta procedimos a la obtención de distintas fracciones del extracto parasitario correspondientes al material no unido a la columna (percolado), y a lavados y eluciones a distintos pH. Se midió la absorbancia a 280 nm de cada fracción, como forma estimativa de cuantificar la presencia de proteínas. La misma fue máxima como era esperable en la fracción correspondiente al FhTE, menor en el percolado y en el primer lavado. Sin embargo, no hubo valores detectables de absorbancia a 280 nm en el resto de las fracciones (Figura 20 A). Sabemos que este método de detección de proteínas en las muestras presenta una cierta variabilidad dependiendo de los componentes presentes en la misma. De forma aproximada, una concentración de 0,1  $\mu$ g/ml ya puede ser detectado mediante este método por lo que este resultado nos traduce que el material parasitario obtenido tanto en los lavados como eluidos estaría en muy baja concentración. Otra posibilidad es que modificaciones post-traduccionales de la proteína enmascaren la presencia de cadenas polipeptídicas, evitando su detección por la absorbancia 280 nm.

A continuación, y con el objetivo de detectar si alguna de las fracciones obtenidas tenían alguna relevancia antigénica, evaluamos si éstas eran reconocidas por anticuerpos específicos contra *F. hepatica*. Para ello, realizamos un ELISA utilizando suero de ratones infectados y como control un pool de sueros de ratones controles (no infectado). Las fracciones fueron inmediatamente llevadas a pH neutro una vez obtenidas de manera de no generar variaciones en la generación de color en este ensayo por diferencias en el pH inicial de las muestras. En la Figura 20 B observamos que hay un fuerte reconocimiento tanto del lisado total, como se vio anteriormente, pero además el suero de ratones infectados reconocieron fuertemente el material presente en las fracciones correspondientes a los eluidos, siendo el eluido obtenido a

pH alcalino aquel que reaccionó más. Por el contrario el suero del ratón no infectado no presenta reactividad contra ninguna de las fracciones obtenidas (Figura 20 B). Esto dirigió nuestra atención a caracterizar bioquímica e inmunológicamente el material presente en dichas eluciones. Para ello seleccionamos el eluido básico el que de ahora en adelante es denominado EI-VF66.

Es importante destacar que también generamos una columna control utilizando el suero del conejo inmunizado con PBS de manera de poder determinar cualquier reactividad cruzada con componentes del lisado parasitario que pudieran ser reconocidos por anticuerpos no específicos de VF66 presentes en el suero. Con esta herramienta realizamos los mismos pasos descritos anteriormente para la cromatografía de afinidad con los anticuerpos anti-VF66. La determinación de la absorbancia a 280 nm de cada fracción así como la evaluación de la antigenicidad no permitió detectar señal por ninguno de los métodos (resultados no mostrados).



**Figura 20 - Obtención del EI $\alpha$ VF66.** A) Se realizó una columna de afinidad con anticuerpos policlonales específicos. Se obtuvieron diferentes fracciones parasitarias: percolato (fracción no unida), lavados a pH 6,5, eluidos pH 2,5, lavados a pH 8, eluidos pH 11,5 a los cuales se les midió la absorbancia a 280 nm. B) Se determinó la reactividad del suero de ratones infectados y no infectados con *F. hepatica* contra las diferentes fracciones parasitarias obtenidas.

### Caracterización bioquímica del El $\alpha$ VF66

Con el objetivo de caracterizar bioquímicamente el material presente en la fracción más antigénica, constituida por el eluido básico (al cual llamaremos El-VF66), primeramente debimos concentrar el material obtenido. Para ello, se dializaron las muestras contra PBS 0,05 X ON, y se concentraron 20 veces por precipitación con ácido tricloroacético y se dializaron finalmente contra PBS. Posteriormente, se estimó la concentración del El-VF66 mediante el método del BCA obteniendo una concentración final de 0,1 mg/ml. Con el objetivo de analizar los componentes presentes en la muestra se realizó luego una corrida electroforética en un gel de policarilamida con SDS al 15% y se tiñó con azul de Coomasie. Como se aprecia en la Figura 21, se obtuvo una banda mayoritaria de aproximadamente 45 kDa. Basándonos en el peso molecular estimado de la secuencia aminoacídica correspondiente a Fhmuc L y Fhmuc S los cuales serían de 15,3 kDa y 13,2 kDa, respectivamente, consideramos es posible que en el caso de presentar cadenas de glicanos, su masa molecular sería mayor a estos valores. Es importante destacar que se obtuvo una única banda, algo que resulta sorprendente en las glicoproteínas ya que en general se caracterizan por poseer una variación en la glicosilación dando lugar a un conjunto de bandas de próximo peso molecular, a veces evidenciado como un “smear”.

### Caracterización glucídica del El $\alpha$ VF66

La caracterización de los posibles glicanos presentes en el El- VF66 se realizó mediante el uso de lectinas vegetales específicas de diferentes estructuras carbohidratas (Tabla 2). Para ello se realizó un procedimiento de conjugación a biotina de las cuatro lectinas seleccionadas por su alta reactividad por FhTE, previamente evaluada por E. Rodríguez en el contexto de su Tesis de Doctorado.

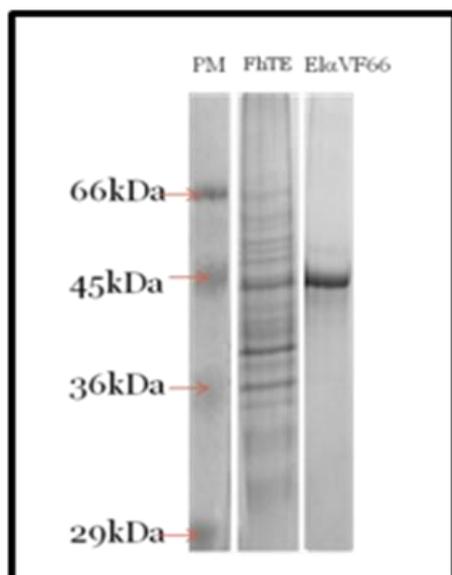


Figura 21- SDS-PAGE 10% del pool de la fracción purificada El- $\alpha$ VF66 Se observa: el standard de peso molecular (carril 1), el extracto total FhTE (carril 2) y el El-VF66 (carril 3). Las bandas se revelaron con tinción de azul de Coomasie R.

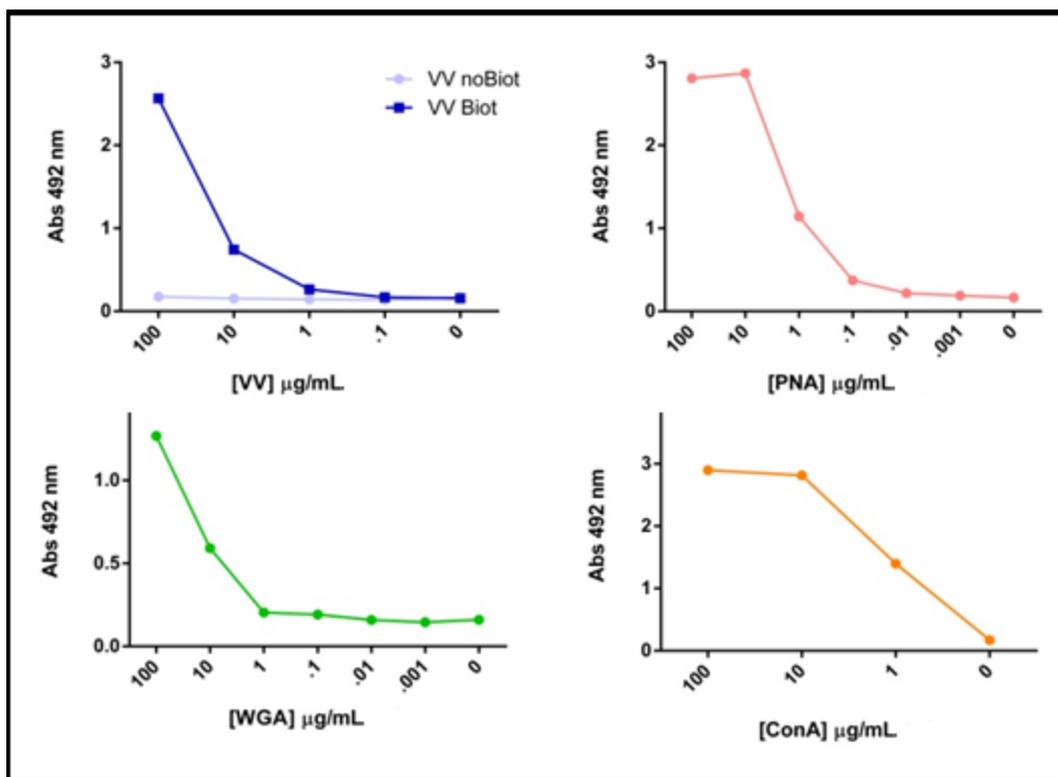
Tabla 2 - Lectinas utilizadas para la identificación de carbohidratos.

Abreviación	Origen	Especificidad de Unión
ConA	<i>Concanavalia ensiformis</i>	$\alpha$ -Man,Glc
WGA	<i>Triticum vulgare</i>	GlcNAc; Neu5Ac
PNA	<i>Arachis hypogea</i>	Gal- $\beta$ -(1,3)-GalNAc- $\alpha$ -Thr/Ser
VVL	<i>Vicia villosa</i>	Terminal GalNAc

En la Figura 22 se evidencia que las lectinas fueron efectivamente biotiniladas, al mostrar la reactividad dosis-dependiente obtenida tras la incubación con estreptavidina-HRP.

Una vez biotiniladas las lectinas de interés, y determinada la concentración a utilizar, procedimos a estudiar con las mismas el perfil glucídico del FhTE. Esta caracterización ya se había realizado y publicado previamente reportándose el reconocimiento del FhTE por las 4 lectinas citadas anteriormente<sup>29</sup>.

Como se observa en la Figura 23 se destaca el mayor reconocimiento del FhTE por las lectinas ConA y PNA lo que sugiere la presencia  $\alpha$ Manosas terminales y/o Glucosas así como también de  $\beta$ Gal(1 $\rightarrow$ 3)GalNAc, y un reconocimiento menor de VVL y WGA (reconocen GalNAc y GlcNAc respectivamente), apoyando lo reportado en la literatura<sup>30</sup>.



**Figura 22 - Confirmación de la conjugación de lectinas con biotina.** Se sensibilizaron placas con las diferentes lectinas biotiniladas por 1 h a 37°C, se bloqueó y se incubó con estreptavidina-HRP por 30 min a 37°C. El revelado se realizó con OPD/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Seguidamente, con el objetivo de caracterizar los glúcidos presentes en nuestro material de interés realizamos el mismo ensayo sobre el El $\alpha$ VF66 en relación al FhTE. El eluido fue fuertemente reconocido por ConA principalmente, y en menor grado por PNA, WGA y VV como se ilustra en la Figura 24. Dada la especificidad de la ConA por  $\alpha$ Manosas terminales/ Glucosas pensamos que esta fracción podría ser rica en este tipo de glúcido. Sin embargo, las cuatro lectinas utilizadas reconocieron en la misma relación (30-40%) el El $\alpha$ VF66 en relación al FhTE, sugiriendo que las estructuras que son reconocidas por las mismas se encuentran presentes en la fracción enriquecida. Es interesante notar que la PNA y VV estarían detectados O-glicanos, mientras que la ConA detectaría N-glicanos. Por otro lado la WGA podría detectar GlcNAc tanto en N- como en O-glicanos. En nuestro grupo de trabajo se estudió el potencial inmunoregulador de la manosa sobre las CDs, lo que es de gran relevancia visto las características glucídicas del El $\alpha$ VF66 y planteando la hipótesis de un papel inmunoregulador de nuestro propio material de estudio.

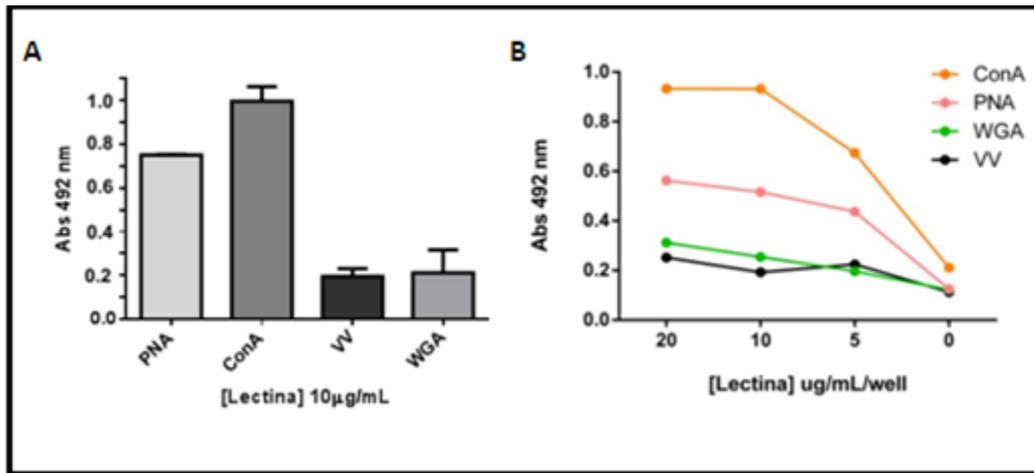


Figura 23- Reconocimiento de FhTE por las lectinas PNA, ConA, VV y WGA. Se realizó un ensayo de tipo ELISA sensibilizando con FhTE, incubando con diluciones seriadas de lectinas biotiniladas, seguido de estreptavidina-HRP. En A se observa la reactividad de las lectinas a 10 µg/mL o a diferentes concentraciones seriadas (B).

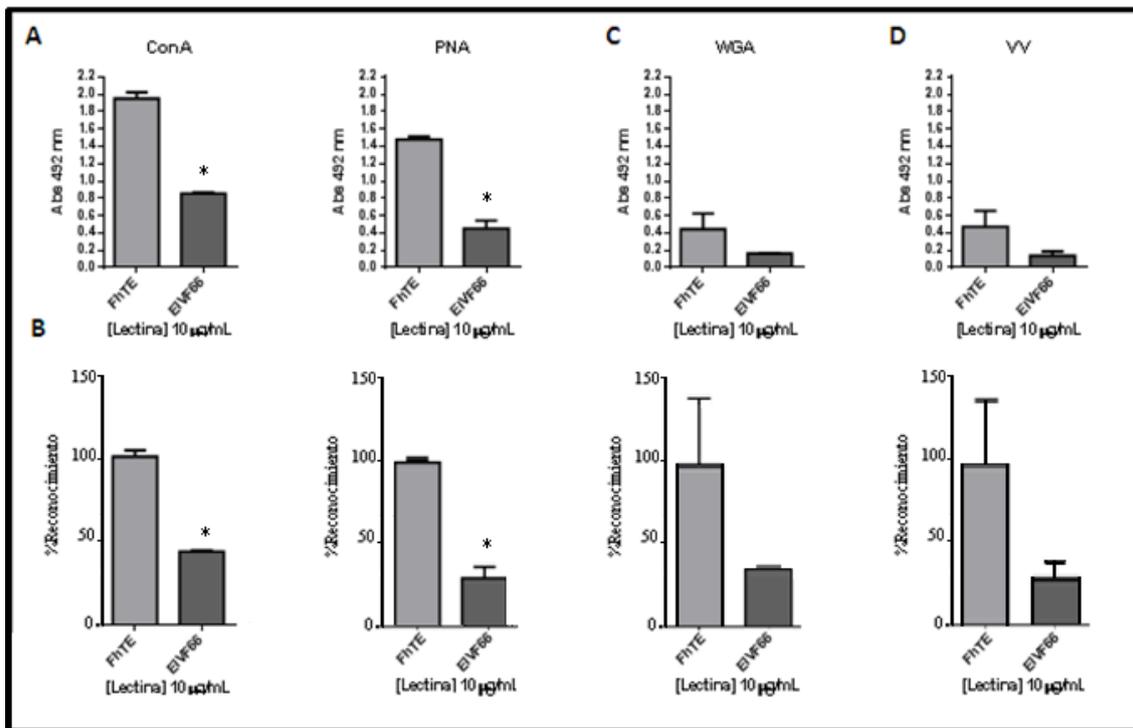
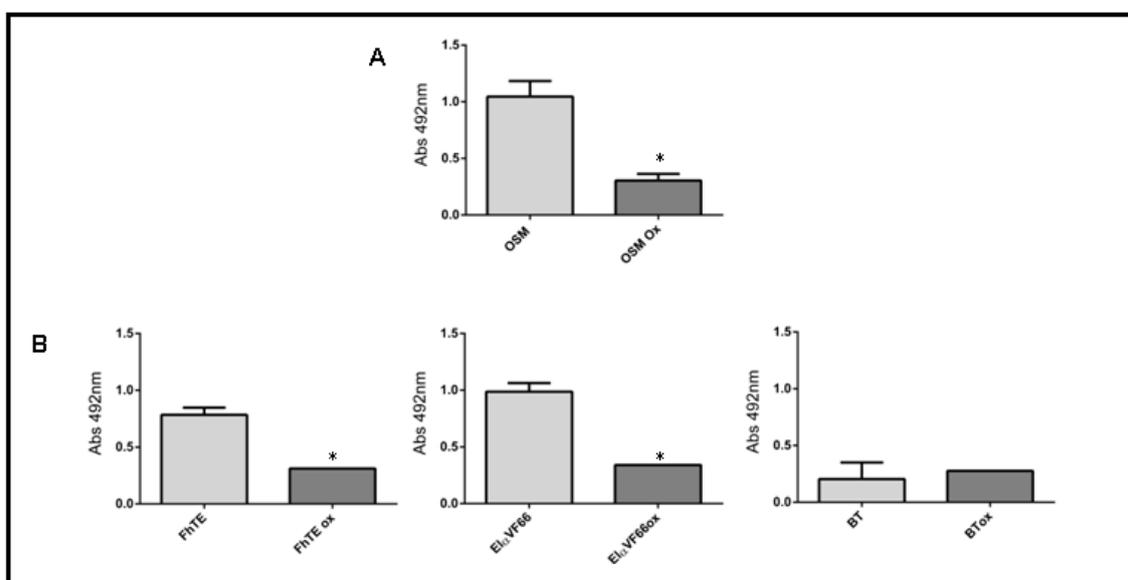


Figura 24 - Reconocimiento del FhTE y ElαVF66 por diferentes lectinas. Se evaluó el reconocimiento de FhTE y el ElαVF66 por diferentes lectinas (ConA, WGA, PNA, VV) por ELISA. En la parte A se observa el reconocimiento en valores absolutos de absorbancia a 492 nm. En la parte B se graficó el porcentaje de reconocimiento del ElαVF66 en relación al reconocimiento del FhTE para las 4 lectinas seleccionadas.

### Oxidación del FhTE y El - VF66

Posteriormente, y de forma de confirmar que el reconocimiento por la lectina ConA fuera específico de la porción glucídica del material purificado, procedimos a la oxidación del mismo con metaperiodato. Se puede observar en Figura 25 A, la puesta a punto del método de oxidación utilizando una glicoproteína modelo como lo es la OSM (mucina submaxilar ovina) y utilizando como método de detección el anticuerpo B72.3, el cual reconoce los sialil-Tn presente en la OSM <sup>64</sup>. En dicha figura se puede observar que la oxidación de los glúcidos terminales con meta-peirodato de sodio presentes en la OSM disminuye considerablemente la reactividad del anticuerpo B72.3 por la OSM (Figura 25A). Se concluye que la técnica de oxidación con metaperiodato era efectiva para abrogar el reconocimiento de sus glúcidos terminales.

Una vez probado el método de oxidación, procedimos a confirmar que la lectina ConA reconocía los glúcidos presentes tanto en FhTE, como en el El- VF66 mediante un lectin blot luego de tratar las muestras con meta periodato. Se utilizó como control la oxidación y reconocimiento del buffer trietilamina en el que se encuentra el El –VF66. Como esperado, el reconocimiento del tanto del FhTE como de El – VF66 por ConA fue ampliamente menor cuando las muestras son oxidadas, confirmando la unión de la lectina a la porción glucídica de estas fracciones (Figura 25B).



**Figura 25 - Oxidación del FhTE y El-VF66.** Las diferentes proteínas fueron oxidadas con meta-periodato de sodio una vez adsorbidas a la placa de ELISA. En la parte A se muestra la reactividad de un anticuerpo monoclonal específico de Sialil-GalNAc presente en la proteína modelo OSM. En la parte B se muestra el reconocimiento por ConA

de FhTE, E $\alpha$ VF66 y el buffer control antes y después de la oxidación de los mismos. El asterisco corresponde a diferencia con significación estadística con valor de  $p \leq 0.05$

### Evaluación de la inhibición de la maduración de las células dendríticas por el FhTE y el E $\alpha$ VF66

Con el objetivo de caracterizar el efecto del FhTE en las células dendríticas se obtuvieron células hematopoyéticas de la médula ósea de ratones BALB/c las cuales se diferenciaron en células dendríticas *in vitro* mediante el agregado de GMCSF como se explicó en la sección correspondiente de Materiales y Métodos.

Inicialmente evaluamos la maduración de BMDCs frente a la estimulación con agonistas TLRs. Se cuantificó la producción de TNF $\alpha$ , IL-12, IL-6 e IL-10 por BMDCs luego de la incubación con LPS o CpG. En la Figura 26 se observa que las BMDCs incubadas con LPS y CpG provocaron un aumento en la producción de las citoquinas pro-inflamatorias evaluadas (Figura 26), indicando que los mismos constituyeron un estímulo para su maduración. Sin embargo, la producción de IL-10 mostró tendencia a disminuir en estas circunstancias (Figura 26). Esto es esperable ya que sabemos que el LPS y CpG corresponden a ligandos de los TLR 4 y 9 respectivamente y llevan a un aumento de citoquinas pro-inflamatorias y disminución de citoquinas reguladoras como IL-10<sup>65</sup>.

Posteriormente, procedimos a confirmar el efecto inmunomodulador de FhTE sobre la maduración de las CDs en este mismo sistema. Como observamos en la Figura 27 el agregado de FhTE a una concentración final de 75  $\mu$ g/ml, inhibió parcialmente la producción de IL-12, IL-6 y TNF $\alpha$ , mientras que aumentó la de la IL-10, confirmando los resultados previamente reportados por nuestro grupo de investigación<sup>29</sup>.

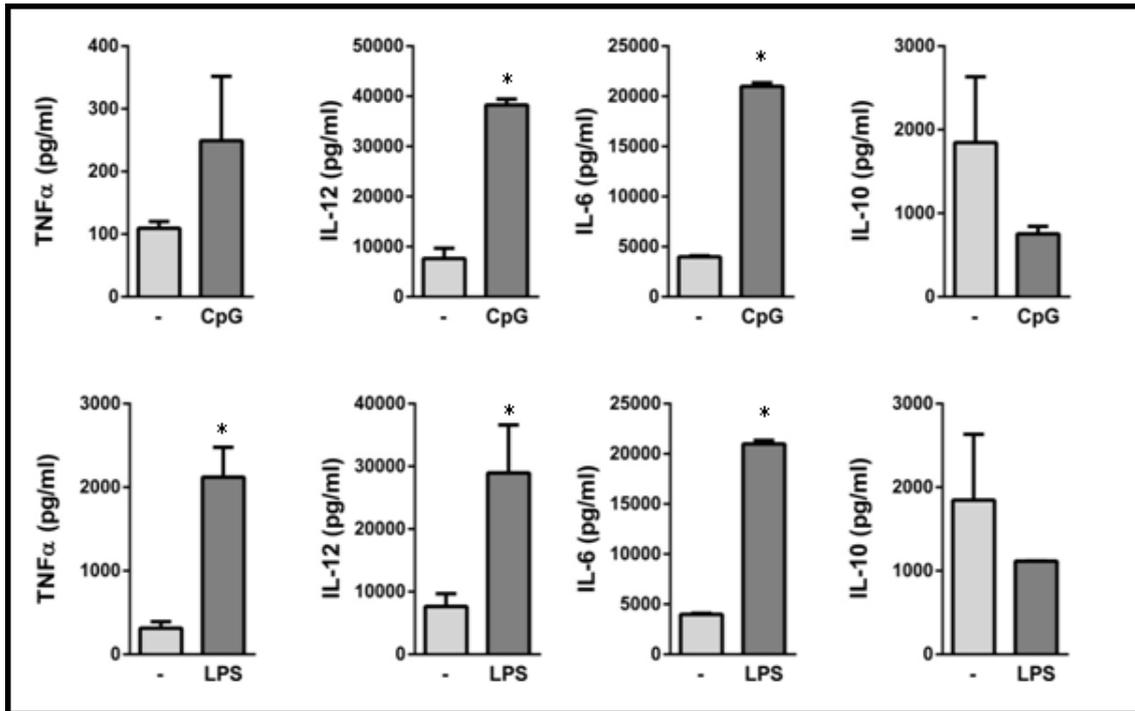


Figura 26 - Evaluación de la maduración de BMDCs frente a la estimulación con agonistas TLRs. Se evaluó la producción de TNF $\alpha$ , IL-12 e IL-6 por BMDCs luego del agregado de LPS (1  $\mu$ g) o CpG (0.5  $\mu$ g) por pocillo. Las BMDCs generadas fueron depositadas en placas de 96 pocillos a una concentración de  $5.0 \times 10^5$  células/pocillo. El asterisco corresponde a diferencia con significación estadística con valor de  $p \leq 0.05$

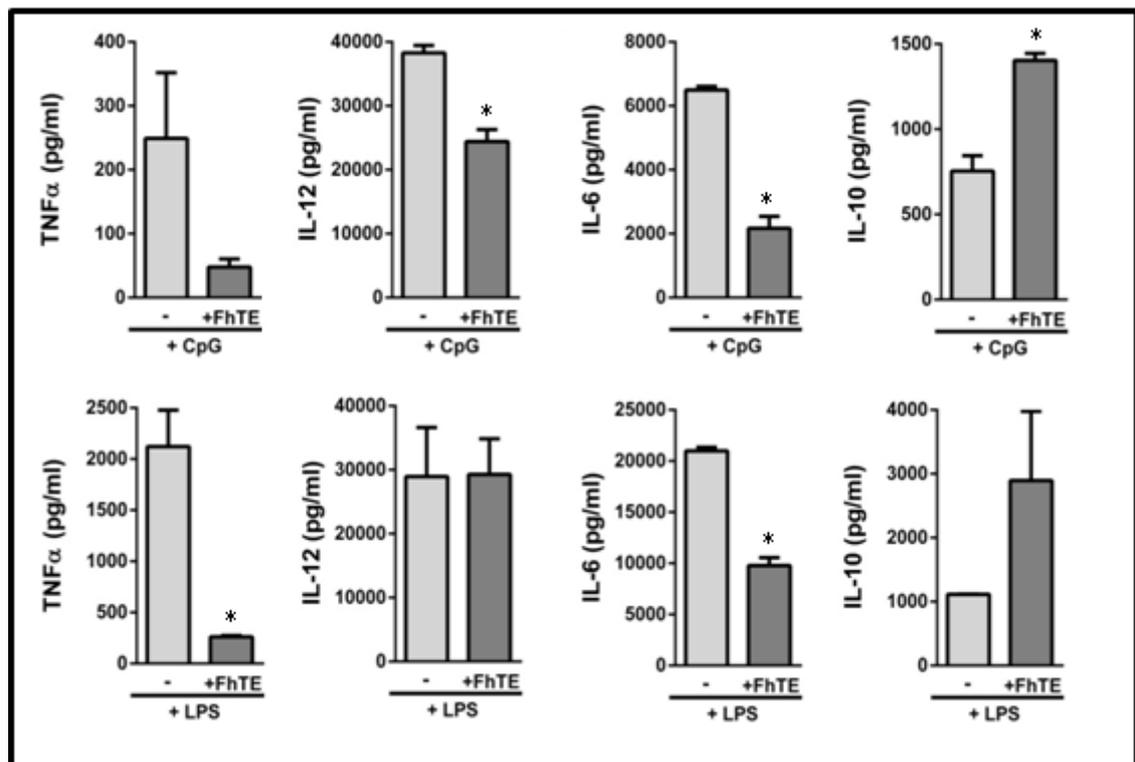
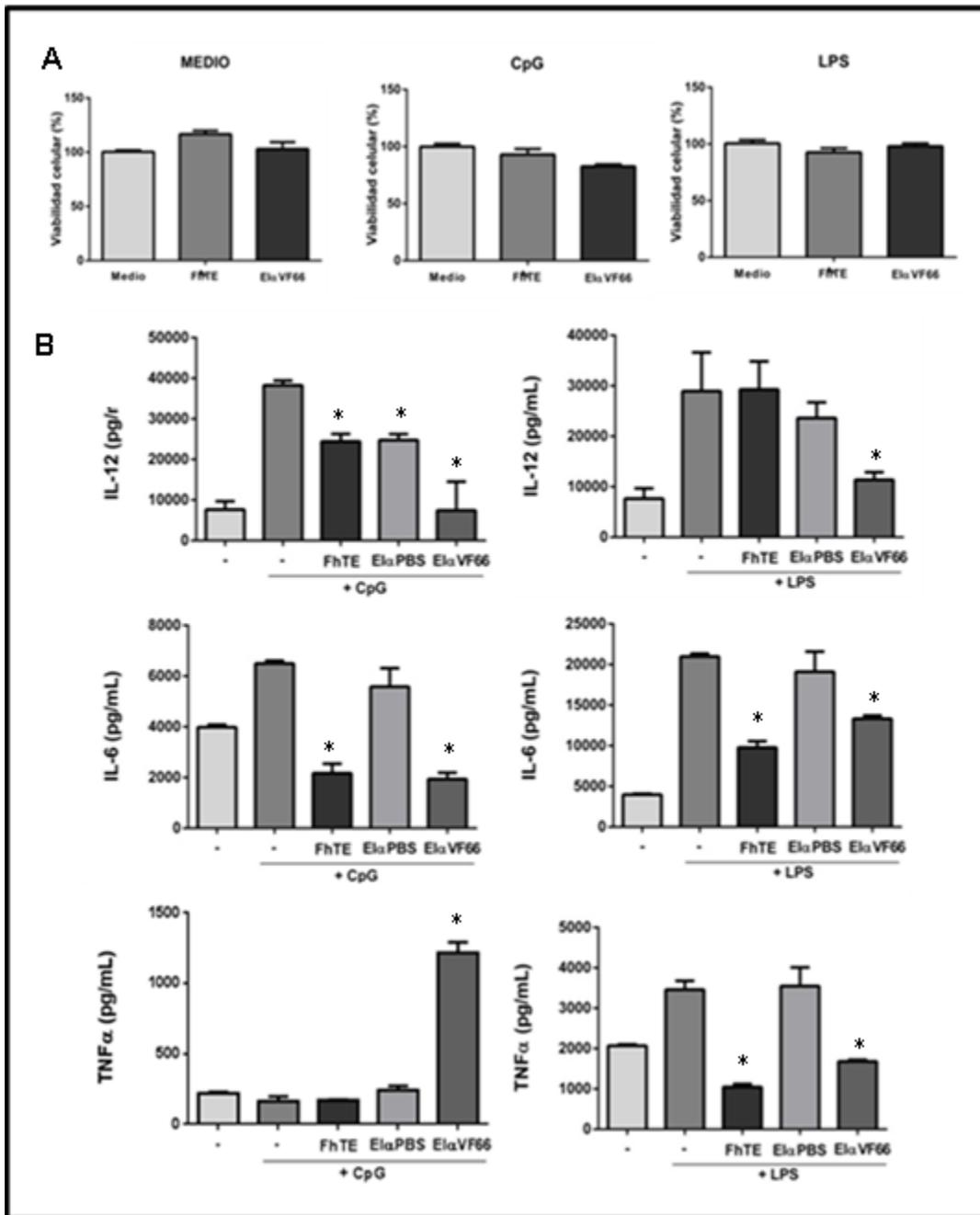


Figura 27 - Evaluación de la inhibición de la maduración de BMDCs inducida por LPS y CpG por FhTE. Las BMDCs fueron incubadas con FhTE (75  $\mu$ g/ml) toda la noche en presencia de LPS o CpG. Posteriormente se cuantificó los niveles de IL-6, IL-12, IL-10 y TNF $\alpha$  en el medio de cultivo mediante técnica de ELISA.

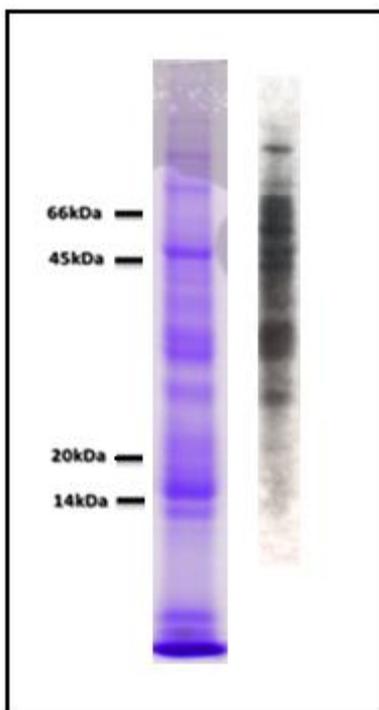
A continuación, las BMDCs fueron incubadas con FhTE, percolado, EI- $\alpha$ VF66, así como también con la fracción correspondiente al eluido control (obtenida con los anticuerpos purificados de suero de conejos inmunizados con PBS/adjuvante) en presencia o ausencia de LPS o CpG. Primeramente verificamos que la viabilidad celular no se viera comprometida en las condiciones ensayadas (Figura 28 A). En segundo lugar, recuperamos el sobrenadante del medio de cultivo y evaluamos los niveles de IL-6, IL-12, y TNF $\alpha$  por ELISA (Figura 28 B). Observamos que el agregado de EI- $\alpha$ VF66 provocó, al igual que FhTE, una disminución de la producción de IL-6 e IL-12 tanto en presencia de LPS como de CpG. Sin embargo, la producción de TNF $\alpha$  por BMDC incubadas con EI- $\alpha$ VF66 en presencia de CpG aumentó notoriamente (Figura 28 B). En sus conjunto, estos resultados sugieren que la fracción parasitaria obtenida denominada EI- $\alpha$ VF66 mimetiza, al menos en parte, la inhibición de la maduración de BMDC inducida por ligandos de TLRs inducida por FhTE.



**Figura 28** - Evaluación de la inhibición de la maduración de BMDCs inducida por LPS y CpG por ElaVF66. Las BMDCs fueron incubadas con FhTE (75 µg/ml), El-αPBS (control) El-αVF66 toda la noche en presencia o ausencia de LPS o CpG. Posteriormente se cuantificó los niveles de IL-6, IL-12 y TNFα en el medio de cultivo. Posteriormente se incubaron con el FhTE (75 µg/ml), fracciones correspondientes a percolados (75 µg/ml) y eluidos (20 µg/ml) o medio en presencia o ausencia de LPS (1 µg/pocillo) o CpG (0.5 µg/pocillo) toda la noche a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. El sobrenadante de las células incubadas fue colectado para evaluar los niveles de citoquinas por ELISA (IL-6, IL-12, IL-10, TNFα). El asterisco corresponde a diferencia con significación estadística con valor de p ≤ 0.05

## Parte II: Obtención de glicoproteínas de *F. hepatica* reconocidas por ConA y evaluación de sus propiedades inmunomoduladoras sobre CDs

Visto que el EI- $\alpha$ VF66 fue fuertemente reconocido por Conavalina-A (ConA), la cual reconoce con alta afinidad y especificidad la  $\alpha$ Man terminal y en menor grado las  $\alpha$ Glc; y en conocimiento de la importancia que presentan los glicoconjugados ricos en manosa en el efecto inhibitor de FhTE sobre las BMDCs reportado previamente por nuestro equipo de trabajo<sup>29</sup>, decidimos ampliar nuestro abordaje mediante el estudio de glicoconjugados ricos en motivos manosilados. Primeramente evaluamos el reconocimiento del FhTE por la ConA mediante un ensayo de tipo lectin-Blot. Para esto se realizó un lectin blot sobre FhTE utilizando una ConA conjugada a HRP y se reveló mediante quimioluminiscencia. Como control negativo se usó un duplicado de la membrana el cual se incubó sin lectina y no mostró reactividad (Figura no mostrada). En la Figura 29 se observa en la izquierda los distintos componentes proteicos del FhTE con tinción de Azul de Coomasie y en la derecha las bandas que son reconocidas por la ConA-HRP. Estas figuras permiten observar la abundancia de componentes parasitarios reconocidos por la lectina de interés traduciendo una gran abundancia de glicosilaciones con manosas terminales y/o glucosa.



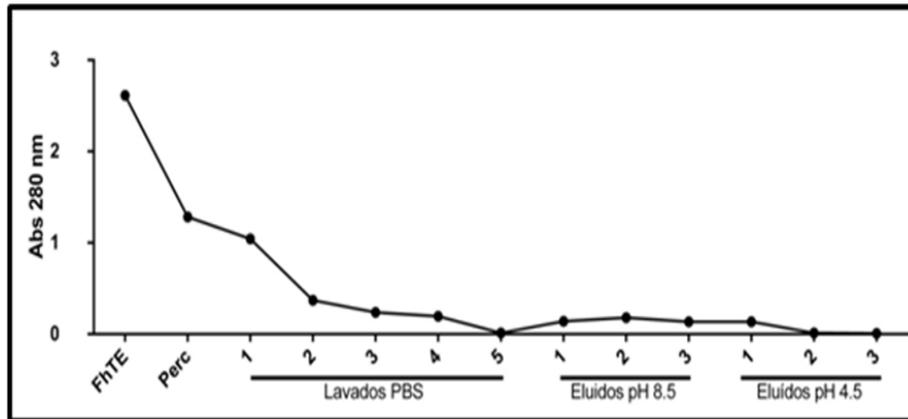
**Figura 29 – Reconocimiento del FhTE por ConA-HRP.** A la izquierda se observa una electroforesis en gel de acrilamida al 15% de FhTE con tinción de Azul de Coomasie. A la derecha se evaluó la reactividad de ConA-HRP con una concentración de 1  $\mu$ g/ml sobre el FhTE mediante lectin blot.

Posteriormente, utilizamos como herramienta la lectina ConA para realizar una cromatografía de afinidad. Por lo tanto, procedimos a la conjugación de ConA a una matriz de agarosa de manera de poder aislar todos los componentes en FhTE reconocidos por esta lectina y poder estudiarlos desde el punto de vista bioquímico e inmunológico.

### **Purificación del El-ConA**

Con el objetivo de separar la fracción parasitaria reconocida por ConA, nos planteamos inmovilizar la lectina de interés en una columna de agarosa, de la misma forma que lo hicimos anteriormente con los anticuerpos anti-VF66. Para esto se incubó 1 g de agarosa activada con 20 mg de ConA en buffer fosfato de sodio 100 mM pH 7,5 suplementado con 0,1 mM de acetato de zinc (buffer de inmovilización). La cuantificación de la ConA inmovilizada en agarosa se determinó por diferencia entre la proteína aplicada y la recuperada en el sobrenadante. No se detectó la presencia de ConA por BCA en el sobrenadante por lo que se estimó que toda la lectina se unió a la agarosa (resultados no mostrados).

Una vez generada la columna se equilibró con 4 mL del buffer de unión (PBS pH 7,4 0,4 M NaCl, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub> y 1 mM MgCl<sub>2</sub>) y se incubó con FhTE (12,5 mg) seguido de lavados en el buffer de unión. Las eluciones se realizaron por competencia con manosa o por pH (eluciones básicas con buffer carbonato 0,1 M pH 8,5 y eluciones ácidas con buffer acetato de sodio 0,1 M pH 4,5). Las diferentes fracciones obtenidas fueron analizadas por espectrometría para determinar su absorbancia a 280 nm. No se cambió el agente de elución hasta que la absorbancia en las fracciones obtenidas fuera inferior a 0,1. De esta forma, obtuvimos diferentes fracciones: percolado, eluciones básicas y eluciones ácidas. El cromatograma de A 280 nm destacó la presencia de un discreto pico de absorbancia correspondiente a las eluciones básicas, a las que llamaremos desde ahora El-ConA (Figura 30). Esto traduce la presencia de glicoconjugados con motivos carbohidratos reconocidos por ConA, es decir manosilados y/o glucosilados.



**Figura 30 Obtención del El-ConA.** Se realizó una cromatografía de afinidad sobre FhTE utilizando agarosa conjugada a ConA. Luego de la obtención de las diferentes fracciones, se determinó la absorbancia a 280 nm.

### Caracterización bioquímica del El-ConA

Una vez obtenidas las diferentes fracciones nos propusimos el objetivo de determinar mediante una corrida electroforética la presencia de bandas correspondientes a los componentes presentes en las mismas. Para ello se analizaron las diferentes fracciones en un gel SDS-PAGE. De éste se desprende la presencia de una banda prioritaria de aproximadamente 28 kDa en los eluidos alcalinos, presentando cuatro bandas de menor intensidad con un peso molecular aparente de 66, 45, 21 y 17kDa (Figura 31). Por otro lado, destacamos que cuando se realizó la elución por competición utilizando Manosa 0,5 M, los mismos componentes fueron observados por SDS-PAGE, aunque de menor intensidad (resultados no mostrados). Esto podría indicar que con la elución a pH alcalino estaríamos probablemente obteniendo los mismos componentes en el El-ConA excepto que con mayor concentración por ser una elución más agresiva.

Con el objetivo de verificar que los componentes obtenidos por cromatografía de afinidad utilizando la lectina ConA son efectivamente reconocidos por la misma, procedimos a la realización de un lectin Blot con las fracciones eluidas (El-ConA) de la misma forma que descrito anteriormente. El lectin blot determinó la presencia de 4 bandas mayoritarias correspondientes a pesos moleculares aparentes aproximados a los 66, 45, 21 y 17 kDa, previamente identificados por tinción de azul de Coomassie.

Sin embargo, el componente mayoritario de 28 kDa no fue reconocido por la lectina en estas condiciones (Figura 32).

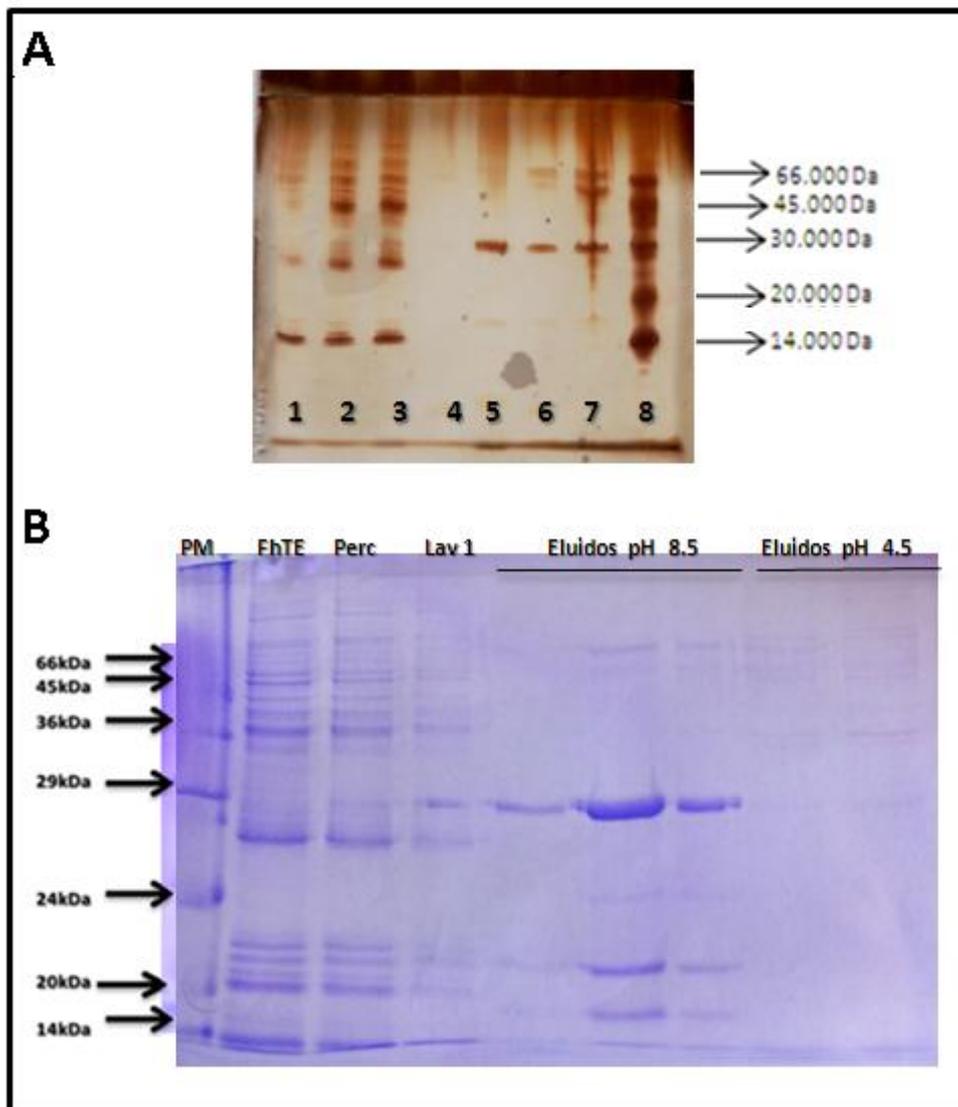
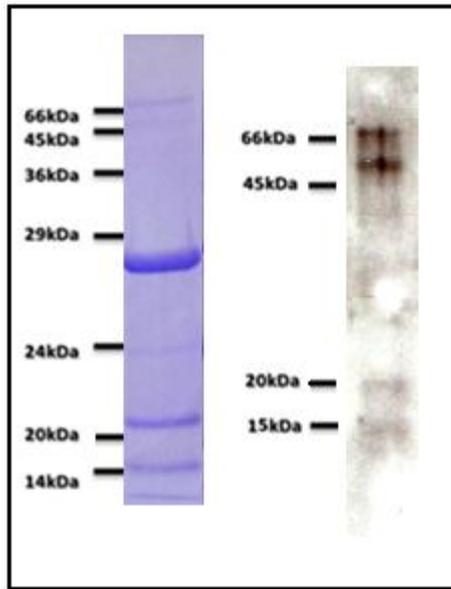
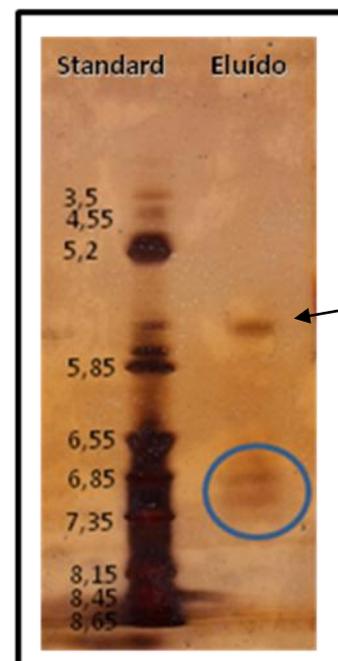


Figura 31 Identificación de los componentes presentes en el El- $\alpha$ ConA por SDS-PAGE. A) SDS-PAGE en gel de acrilamida al 20% con tinción de plata. Los carrillos corresponden a: 1) FhTE, 2) Percolado 3) primer lavado, 5, 6 y 7) eluidos alcalinos, 8) marcador de peso molecular. B) SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 15% con tinción de azul de coomassie.



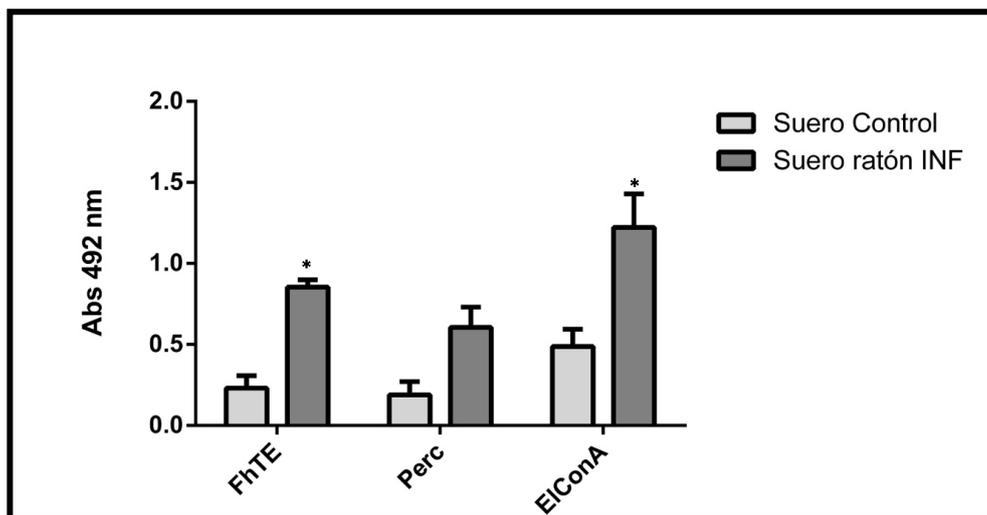
**Figura 32 – Reconocimiento del EI-ConA por ConA-HRP por lectin-Blot.** A la izquierda se observa una electroforesis en gel de acrilamida al 15% del EI-ConA con tinción de coomasie. A la derecha se evalúa la reactividad de ConA HRP con una concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  sobre el EI-ConA mediante lectin blot.

Adicionalmente, y con el objetivo de continuar la caracterización del material presente en el EI-ConA estudiamos el punto isoeléctrico (PI) de los componentes identificados por SDS-PAGE presentes en los eluidos alcalinos. En la Figura 33 se observan los pi determinados experimentalmente a través de un isoelectroenfoque, con posterior tinción con nitrato de plata, mostrando dos PI ubicados entre el rango de 6.85 y 7.35.



**Figura 33 - Isoelectroenfoque de EI-ConA.** Se determinó el punto isoeléctrico de los componentes presentes en EI-ConA mediante la realización de un isoelectroenfoque con tinción de nitrato de plata. El componente que se señala con la flecha corresponde al lugar de sembrado de la muestra y se considera inespecífico.

Con el objetivo de determinar si el El-ConA era antigénico, es decir puede ser reconocido por anticuerpos específicos de *F. hepatica*, evaluamos el reconocimiento de anticuerpos provenientes de ratones infectados por ELISA, utilizando como control aquellos presentes en un animal no infectado. Nuestros resultados indican que existen componentes antigénicos en dos de las tres fracciones parasitarias utilizadas: FhTE y El-ConA, ya que los dos fueron reconocidos por los anticuerpos presentes en el suero de animales infectados, mientras que el suero proveniente de los animales control los reconoció en menor medida (Figura 34). Este resultado es indicativo de que la fracción purificada es fuertemente anitgénica, resaltando su papel en la respuesta del hospedero durante la infección y subrayando su relevancia biológica.

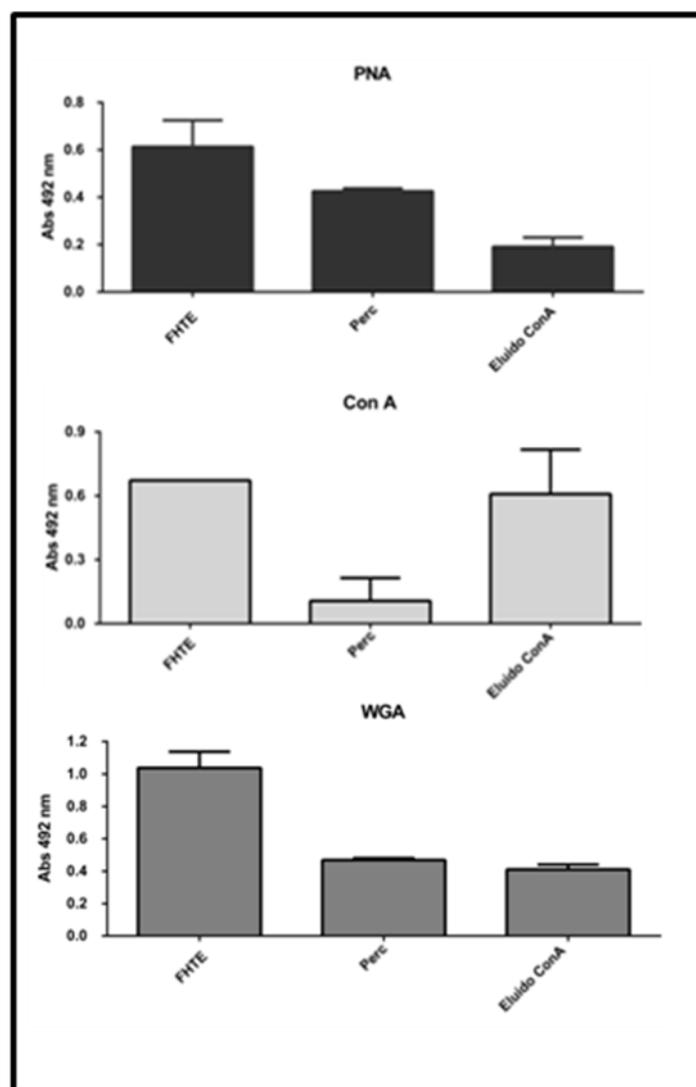


**Figura 34 - Reconocimiento del El-ConA por el suero de ratón infectado y no infectado con *Fasciola hepatica*.** Se evaluó la antigenicidad del El-ConA, mediante la realización de un ensayo tipo ELISA sensibilizando con las diferentes fracciones parasitarias e incubando con los sueros de animales infectados y controles, seguidos de un anticuerpo anti-IgG-HRP.

### Caracterización de la composición de carbohidratos de El-ConA

Visto nuestro interés en separar aquellos componentes parasitarios con glicosilaciones de tipo manosa terminal, resultó especialmente importante la confirmación del reconocimiento del El-ConA por la lectina ConA, así como continuar la caracterización de otros glúcidos posiblemente presente mediante la determinación de la reactividad con lectinas adicionales. Se caracterizó el reconocimiento del El-ConA por las lectinas detalladas en la tabla 2 (no se utilizó VV). En la Figura 35 se aprecia que el El-ConA fue

reconocido fuertemente por ConA, como era esperable, mientras que el percolado no tiene reactividad por esta lectina. A su vez, el El-ConA fue moderadamente reconocido por PNA, pero en menor medida que el el percolado. Por último, el El-ConA fue reconocido en menor grado por WGA en una proporción similar al percolado. De forma interesante, el reconocimiento de percolados y El-ConA por las lectinas en todos los casos fue complementario, resultando en el reconocimiento de FhTE (Figura 35). Estos resultados sugieren la alta presencia de  $\alpha$ Man/ $\alpha$ Glc, GlcNAc y en menor medida de  $\beta$ Gal(1 $\rightarrow$ 3)GalNAc.



**Figura 35 - Reconocimiento del FhTE, Percolado y El-ConA por diferentes lectinas.** Se determinó la reactividad de WGA, PNA y ConA sobre el FhTE, el Percolado y nuestro material de interés (El-ConA) mediante un ensayo tipo ELISA sensibilizando con FhTE, Percolado o El-ConA y agregando 10  $\mu$ g/mL de lectina biotinilada seguida de estraptavidina -HRP.

### Evaluación de la inhibición de la maduración de las células dendríticas por el El-ConA

Posteriormente, estudiamos la modulación de la maduración de las BMDCs por parte del El-ConA y se las comparó al efecto inducido por FhTE y el percolado obtenido. Para ello, realizamos experimentos de incubación con BMDC con las fracciones parasitarias en presencia o ausencia de los ligandos de TLR 4 y 9, LPS y CpG respectivamente, como ya se describió anteriormente. En la Figura 36 se muestran los resultados obtenidos. Para facilitar la descripción y comprensión de estos resultados primeramente analizaremos los resultados obtenidos en las BMDCs maduras en presencia de LPS. La producción de IL-6 estimulada por LPS fue inhibida por FhTE, como esperado. Interesantemente, esta inhibición también se evidenció al incubar las BMDCs en presencia de El-ConA. Sin embargo, el percolado tuvo efectos variados, ya que inhibió la producción de IL-6 estimulada por LPS, mientras que no modificó la de IL-12. El efecto de El-ConA sobre la producción de TNF $\alpha$  inducida por LPS fue diferente. FhTE y el percolado se comportaron similares, inhibiendo la producción de TNF $\alpha$  en niveles similares. Sin embargo, el El-ConA inhibió la producción de esta citoquina pero en menor proporción. Por último, la producción de IL-10 inducida por LPS vio una tendencia al aumento en presencia de FhTE o el percolado, mientras que El-ConA no modificó la producción de la misma. Estos resultados sugieren que el El-ConA comparte algunas, pero no todas, de las propiedades inmunomoduladoras sobre la maduración de BMDC inducida por LPS.

Con respecto al efecto de estas fracciones parasitarias sobre las citoquinas producidas por BMDC maduras por CpG, se muestra que tanto el FhTE, el percolado como El-ConA inhibieron de forma similar la producción de IL-6 e IL-12 por BMDCs inducida por CpG (Figura 36) Sin embargo, su efecto fue diferente sobre la producción de IL-10 y TNF $\alpha$ . Mientras que FhTE y el percolado potenciaron la producción de IL-10, el El-ConA no la modificó, sugiriendo que el componente parasitario que potencia la producción de IL-10 permaneció en el percolado y no tiene reactividad por ConA. Por otro lado, FhTE inhibió la producción de TNF $\alpha$  así como también el percolado, mientras que el El-ConA no la modificó. En su conjunto estos resultados sugieren que el El-ConA posee propiedades inmunomoduladoras sobre la maduración de BMDCs, pero no mantiene las mismas identificadas para FhTE, sugiriendo que diferentes glicoconjugados participan en el efecto inmunomodulador observado para FhTE.

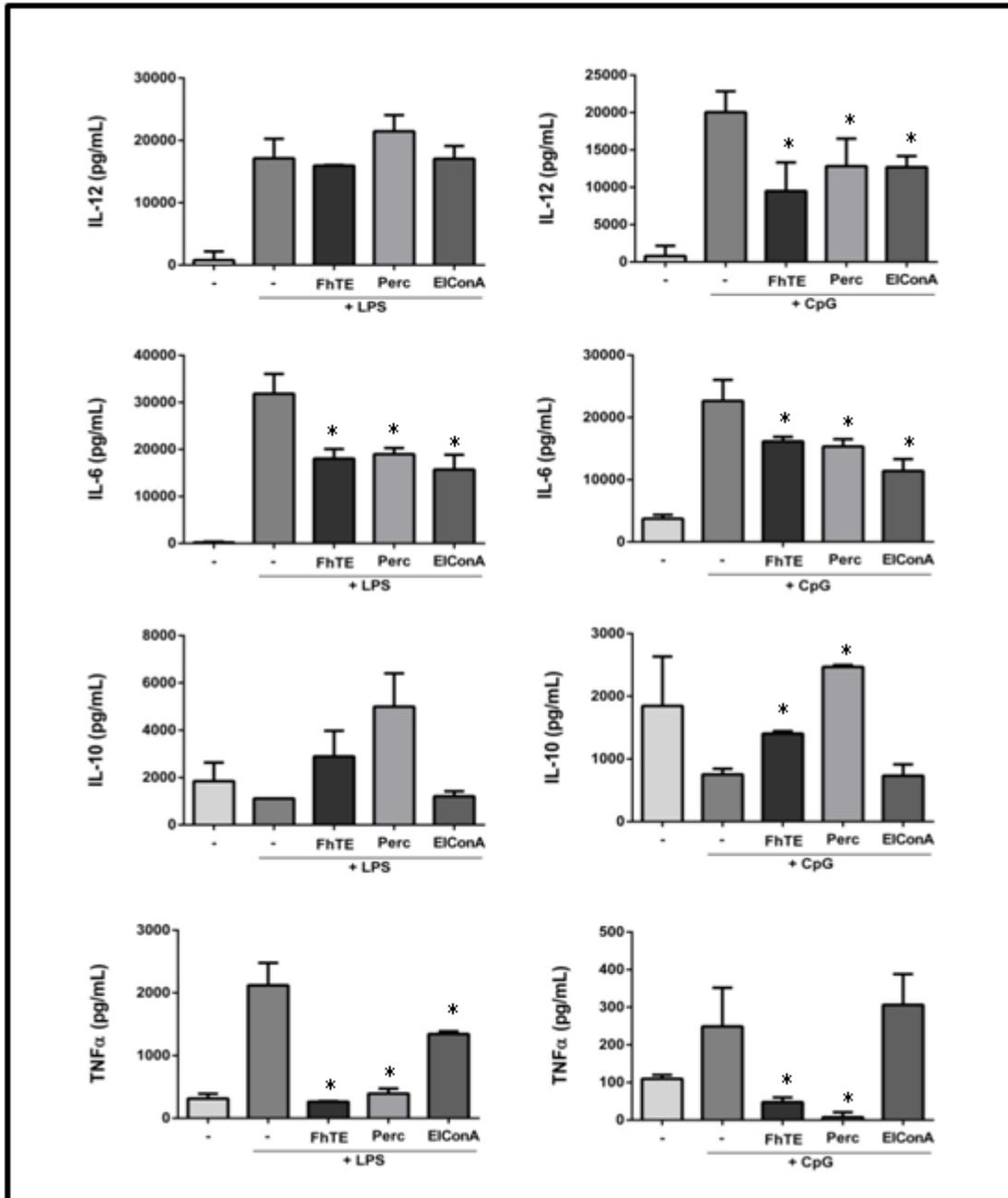


Figura 36 - Evaluación de la inhibición de la maduración de BMDCs por el FhTE, el Percolado y el El-ConA. Las BMDc fueron depositadas en placas de 96 pocillos a una concentración de  $1.0 \times 10^6$  células/pocillo. Posteriormente se incubaron con FhTE, percolado, El-ConA a 37°C toda la noche. Transcurridas dos horas se adicionó el LPS (1 µg) o CpG (0.5 µg) o medio. El sobrenadante de las células incubadas fue colectado para evaluar citoquinas por ELISA (IL-6, IL- 12, IL- 10, TNFα).



## Discusión

En esta tesis evaluamos la capacidad de glicoproteínas de *F. hepatica* de modular la maduración de las CDs. Los glicanos pueden ejercer diferentes funciones en la biología parasitaria. Diferentes tipos de evidencias indican que los glicoconjugados tendrían un rol fundamental en la supervivencia parasitaria al influenciar la respuesta del huésped<sup>66,67</sup>. Al momento de iniciar esta tesis se desconocía mayormente el tipo de glicanos de *F. hepatica* y el efecto de los mismos sobre las CDs. Sin embargo, en los meses siguientes, nuestro equipo de investigación reportaría la presencia de estructuras glucídicas en el lisado de *F. hepatica* conteniendo Man/Glc, GalNAc, GlcNAc confirmado por la unión de lectinas a estas estructuras (ConA, WGA and VV, respectivamente)<sup>29</sup>. Además, durante su tesis doctoral, Ernesto Rodríguez caracterizó los N-glicanos presentes en el lisado total parasitario (FhTE) identificando N-glicanos manosilados cortos e híbridos, algunos de los cuales contienen GlcNAc terminal y Fucosa en core central<sup>68</sup>. En el mismo sentido, estudios de otros grupos de investigación han indicado mediante estudios de espectrometría de masa la presencia de oligosacáridos con oligomanosa expresadas en escamas, ventosas y cobertura tegumentaria del parásito adulto<sup>35</sup>.

En este trabajo de maestría logramos obtener glicoproteínas utilizando anticuerpos específicos de proteína de tipo mucina (El-VF66) y glicoproteínas manosiladas (El-ConA), a partir del lisado total del parásito adulto (FhTE). Las mismas fueron caracterizadas desde el punto de vista bioquímico e inmunológico, demostrando que:

i) La fracción El-VF66, que resultó ser altamente antigénica (ya que fue reconocida por anticuerpos desarrollados durante el transcurso de la infección por *F. hepatica*) se caracterizó por poseer un peso molecular aparente aproximado de 45 kDa, presentó N-glicanos conteniendo Man (porque fue fuertemente reconocido por la lectina ConA) y GlcNAc (por su reactividad con WGA) y demostró mimetizar el efecto inhibitorio de la maduración de BMDCs por FhTE.

ii) La fracción El-ConA, también antigénica, caracterizada por estar constituida por 5 componentes de peso molecular aparente aproximado de 66, 44, 28, 21 y 17 kDa, con

pl de 6.85 y 7.35, altamente reactivo con ConA, y reconocido en menor medida por WGA. A diferencia del EI-VF66, el EI-ConA inhibió únicamente en parte la maduración de las CDs.

A pesar de que la ConA posee alto reconocimiento por Man seguido de Glc, nuestros resultados permitirían a priori afirmar que la reactividad de la ConA se da a través del reconocimiento de Man y no de Glc en los N-glicanos, ya que los estudios analíticos llevados previamente a cabo por nuestro y otros grupos de investigación han demostrado que los N-glicanos de *F. hepatica* carecen de residuos de Glc<sup>35,68,69</sup> a diferencia de lo que sucede en las células de mamífero. Por lo tanto, la reactividad de las lectinas ConA y WGA por el EI-VF66 sugiere la presencia de N-glicanos manosilados y GlcNAc silados, coherente con lo ya reportado para los N-glicanos de *F. hepatica*<sup>35,68,69</sup>. Además, esta observación también es consistente con el hecho de que Fhmucl presenta 3 sitios de N-glicosilación (determinados por el algoritmo NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>))(Figura 14).

Una estrategia a futuro para profundizar en el análisis glucídico del EI-VF66 y verificar la presencia de N-glicanos constituiría en la remoción de los N-glicanos utilizando PNGasa, los cuales podrían ser analizados posteriormente por espectrometría de masa. En este tema, nuestro grupo de investigación se encuentra actualmente trabajando gracias a una colaboración que mantenemos con el grupo del Dr. J. García-Vallejo en la VUMC University de Amsterdam (Holanda).

Por otro lado, el reconocimiento por PNA (Gal-GalNAc-Thr/Ser) y VV (con especificidad contra GalNAc-Thr/Ser, también conocido como antígeno Tn) del EI-VF66 sugiere la presencia de O-glicanos en esta proteína. La presencia del antígeno Tn en *F. hepatica* ya ha sido previamente reportada<sup>37</sup>, y considerando el alto contenido de Ser y Thr presentes en el péptido VF66, utilizado para la generación de anticuerpos policlonales que sirvieron para la obtención del EI-VF66, es altamente probable que dicha fracción contenga O-glicanos truncados.

A pesar de la información reportada en los últimos meses sobre los N-glicanos de *F. hepatica*, aún no se ha abordado el estudio de sus O-glicanos. Considerando las evidencias que sugieren la presencia de O-glicanos en el EI-VF66, podríamos proponer realizar su identificación a través del uso de exoglicosidasas secuenciales seguidas por una O-glicosidasa<sup>70</sup> y el análisis del azúcar liberado por cromatografía en capa fina utilizando estándares correspondientes. Estas son estrategias que nos encontramos actualmente abordando con el grupo de la Dra. Mariño quién dirige el Laboratorio de Glicómica funcional y Molecular en el IByME (Buenos Aires, Argentina).

Con respecto a la fracción obtenida EI-ConA, podemos afirmar, análogamente a lo descrito anteriormente para EI-VF66, que posee N-glicanos manosilados conteniendo GlcNAc. La poca reactividad encontrada con PNA sugiere que los O-glicanos están poco representados en la fracción, o incluso ausentes.

Considerando además que identificamos 5 componentes en el EI-ConA por SDS/PAGE, podríamos hipotetizar que el componente de 44 kDa presente en el EI-ConA corresponde al componente identificado en el EI-VF66 (de 45 kDa). Para poder demostrarlo podríamos mediante un ensayo de western blot con anticuerpos anti-VF66 identificar si hay un reconocimiento específico de esta banda sobre el material obtenido por la columna de ConA.

Por otro lado, para determinar la identidad de los componentes obtenidos en el EI-VF66 y EI-ConA, podríamos abordar la pregunta mediante el análisis de proteómica. Los mismos consisten en evaluar mediante espectrometría de masa MALDI-TOF/TOF la masa de péptidos generados tras la proteólisis de proteínas lo que permite identificar la identidad de proteínas luego de consultar una base datos según el perfil de masas de péptidos obtenidos<sup>31</sup>. En este contexto, y considerando que nuestros componentes son glicoproteínas, deberíamos eliminar los N- y O-glicanos previamente, utilizando PNGasaF y  $\beta$ -eliminación, respectivamente. De esta forma, y para confirmar los resultados encontrados en esta tesis, se podría realizar una SDS/PAGE en 2 dimensiones para identificar “spots” de acuerdo a su peso molecular aparente y punto isoeléctrico, deglicosilar, proteolizar y analizar por espectrometría de masa.

Cabe resaltar que hace unos meses el grupo liderado por Sandra O'Neill (Irlanda) realizó estudios de proteómica con el fin de identificar las glicoproteínas manosiladas presentes en una fracción tegumentaria de *F. hepatica*<sup>31</sup>.

En este trabajo se detallan las proteínas manosiladas (previamente purificadas por afinidad utilizando, al igual que nosotros, la lectina ConA) presentes en el tegumento de *F. hepatica*. Identifican 341 proteínas glicoproteínas manosiladas, de las cuales 28 fueron las más abundantes, con funciones estructurales y metabólicas, proteínas de shock térmico y cisteín proteasas<sup>31</sup>. Dentro de éstas se identificaron las siguientes proteínas:

- Catepsina-L2 (BN1106\_s8098B000020) con un peso molecular (PM) de 37 kDa y un punto isoeléctrico (pI) de 5.44;
- la Actina (BN1106\_s2907B000133) con PM=42 kDa y pI=5.43;
- La Catepsina-L1 (BN1106\_s8490B000026) con PM=37 kDa y pI= 6.3;
- La Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, (BN1106\_s5174B000030) con pM= 54 kDa y pI= 7.1;
- la Disulfuro isomerasa (BN1106\_s2763B000063) con un PM= 53 kDa y pI de 5.1;
- la Piruvato carboxilasa (BN1106\_s1091B000125) con un PM=14 kDa y pI=6.3;
- una Proteína de unión a Calcio (CaBP4) (BN1106\_s214B000742) con un PM=130 kDa y pI=5.4.
- la Peroxiredoxina (BN1106\_s1614B000280) con un PM=22 kDa y pI=6.3.

Considerando que la fracción que obtuvimos al purificar con la ConA contiene cinco componentes de 66, 44, 30, 20 y 14 kDa, con pI de 6.85 y 7.35, podríamos especular que algunos de éstos corresponden a alguna de las proteínas identificadas por Ravida y colaboradores. Por ejemplo, la piruvato carboxilasa (PM=14 kDa y pI=6.3), la peroxiredoxina (PM=22 kDa y pI=6.3) o la Catepsina-L1 (PM=37 kDa y pI=6.3), aunque hay que considerar que los pesos moleculares y puntos isoeléctricos indicados corresponden a la proteína sin modificaciones post-traduccionales. Para verificar esto podríamos producir estas proteínas de forma recombinante en células de mamífero, purificarlas y caracterizarlas desde el punto bioquímico e inmunológico, comparando con nuestros resultados. Para evaluar el rol de los N glicanos en su función

inmunomoduladoras podemos generar mutaciones en la secuencia aminoacídica de las mismas, con una sustitución de las Asn en sus secuencias aminoacídicas por Gly, de manera de truncar la N-glicosilación desde su inicio y evaluar cambios en su potencial inmunomodulador al modificar su glicosilación. Esta estrategia será próximamente abordada por nuestro equipo de investigación, en colaboración con la Dra. Piñeyro. En particular, trabajaremos en un principio con la peroxiridoxina y buscaremos el rol de sus glicanos y actividad anti-oxidante de modular la maduración de las CDs.

En relación a la capacidad de los glicoconjugados de *F. hepatica* en inhibir la maduración de las CDs, nuestro grupo de trabajo ha sido el primero en reportar su rol, no solamente a nivel de la maduración y función estimuladora de CDs, sino que también en la inducción de la respuesta Th2 modificada, induciendo la producción de IL-4 e IL-10 por linfocitos T CD4 específicos<sup>29</sup>. En esta misma línea se reportó la importancia de los glicoconjugados manosilados en la determinación de este tipo de respuesta ya que tanto la preincubación de CDs con manosa como la utilización de FhTE demanosilado abolieron este perfil tolerogénico e inmunomodulador<sup>29</sup>.

En relación al efecto inmunomodulador de los glicoconjugados parasitarios sobre las CDs, nuestro grupo reportó que el FhTE inhibe la producción de la IL-12 e IL-6 pero aumenta los niveles de IL-10 producidos por BMDC estimuladas con LPS<sup>29</sup>, similar a lo que sucede con CD humanas<sup>68</sup>. Además, demostramos que dicha inhibición está mediada por receptores de tipo lectina (CLR) que reconocen glicanos manosilados<sup>29</sup>. En concordancia con estos resultados, demostramos que los glicoconjugados manosilados parasitarios son reconocidos por DC-SIGN, un CLR expresado por CDs humanas, y que este receptor media la diferenciación a linfocitos T anérgicos o reguladores que son incapaces de proliferar ante estímulos o incluso de inhibir una reacción estimuladora<sup>68</sup>. En este mismo sentido, otros grupos de investigación reportaron que un lisado tegumentario del parásito condiciona CDs con la capacidad de inducir anergia sobre linfocitos T CD4, aunque la función anérgica de estos linfocitos T CD4 no fue probada, sino solamente determinada por la presencia de marcadores asociados con anergia como GRAIL, EGR2, ICOS o ITCH<sup>71</sup>. Además, evidenciaron que este proceso está mediado por el MR, pero no por su función de reconocer glicanos

parasitarios, sino porque el MR aumentaría su expresión en CD luego del condicionamiento con FhTeg e interaccionaría con glicanos presentes en linfocitos T CD4<sup>71</sup>.

En este trabajo de maestría encontramos que el EI-VF66 reproduce la inhibición causada por el FhTE sobre las BMDCs, mientras que el EI-ConA reproduce parcialmente esta inhibición. A continuación se muestra una tabla que resume los resultados correspondientes a la modulación de las CDs obtenidos:

Tabla 3 - Análisis de la respuesta en la producción de citoquinas por CDs frente al agregado de FhTE, EI-VF66

	FhTE		EI - VF66		EI-ConA	
	LPS	CpG	LPS	CpG	LPS	CpG
IL-12	-	↓	↓↓	↓↓	-	↓
IL - 6	↓	↓	↓	↓	↓	↓
IL-10	↑	↑	N/E	N/E	-	-
TNFα	↓↓	↓	↓	↑↑	↓	-

Las flechas azules y rojas indican inhibición y estimulación respectivamente en la producción citoquinica. Los guiones indican que no se identifican modificaciones en los niveles de citoquinas producidos. N/E indica que esa citoquina no fue evaluada.

Como se observa en la Tabla 3 el EI-VF66 obtenido disminuyó la IL-6, IL-12 y TNFα inducido por LPS, que es el mismo efecto que observamos con el lisado total parasitario FhTE. Su efecto sobre las citoquinas inducidas por CpG fue similar (disminución de IL-6 e IL-12), excepto por el hecho de que encontramos un aumento en la producción de TNFα por CDs estimuladas con CpG, mientras que el FhTE lo disminuye. En suma, el EI-VF66 mimetizó los efectos inhibitorios del FhTE sobre las CDs estimuladas, a excepción del TNFα inducido por CpG que en lugar de disminuirlo, lo aumenta. Es importante recordar que el TNFα se ve aumentado no sólo en condiciones proinflamatorias sino que también en determinadas situaciones reguladores, ya que es un factor fundamental en la regulación de la respuesta inmune<sup>72</sup>.

Una de las razones que podría explicar esta diferencia entre el FhTE y EI-VF66 es que los glicanos, así como otras proteínas, parasitarias, pueden interactuar con las CDs a través de una gran variedad de receptores. En particular, se ha visto que los CLRs, que reconocen estructuras de glicanos de forma específica, “dialogan” con la señalización de TLRs, en un proceso comúnmente conocido como “crosstalk”.

Podemos hipotetizar que los CLRs estimulados por el EI-VF66 o la afinidad de unión, no son los mismos que reconocen el FhTE y esto podría explicar las diferencias en la respuesta de las CDs. Otra posibilidad es que el EI-VF66 estimule sólo algunos de los receptores que estimula el FhTE, generando una respuesta parcial en relación al lisado total. Se ha reportado como la activación de un CLR determinado puede llevar a la inhibición o aumento en la producción de diferentes citoquinas, así como modificar la señalización desencadenada por receptores Toll activados por componentes del parásito. Existe un crosstalk entre TLRs y CLRs. A modo de ejemplo dectin-1 colabora con TLR2 o TLR4 para desencadenar la producción de citoquinas frente al reconocimiento de *Candida albicans* y zymosan<sup>73</sup>. Otro ejemplo está dado por la Galectina-3 y el receptor de manosa (MR) los cuales están involucrados en potenciar la respuesta inmune innata mediada por TLR2 frente a *C. albicans*<sup>74</sup>.

En el caso del EI-ConA, una fracción más compleja desde el punto de vista proteico que EI-VF66, se reprodujo el efecto encontrado para el FhTE sobre la producción de IL-6 e IL-12, aunque no modificó los niveles de IL-10 ni TNF $\alpha$  producidos por las CDs estimuladas con LPS o CpG (mientras que el FhTE aumentó la IL-10 y disminuye el TNF $\alpha$ ). Es importante considerar que el EI-ConA parecería contener una mayor variedad de componentes en comparación con EI-VF66 basados en el perfil de corridas electroforéticas, y más interesantemente no podemos descartar que comprenda dentro de sus componentes a EI-VF66.

Estos resultados sugieren que otras moléculas, presentes en el FhTE pero ausentes en el EI-ConA, serían responsables de la modulación de la producción de IL-10 y TNF $\alpha$  por CDs estimuladas con CpG o LPS.

A modo de conclusión general, podemos decir que las fracciones de glicoproteínas obtenidas poseen propiedades moduladoras de la maduración de las CDs, aunque no reproducen en su totalidad las propiedades inmunomoduladoras del lisado total parasitario FhTE. La identificación de estas glicoproteínas, así como de sus cadenas de glicanos podría ser importante para dilucidar los mecanismos moleculares inmunomodulatorios utilizados por *F. hepatica*.

Esta modulación presenta una crucial importancia biológica, ya que según el condicionamiento de las CDs y su producción de diferentes citoquinas, dirigirán el perfil de la respuesta inmunitaria al parásito. Particularmente en este caso, frente a la disminución de la producción de IL-6 e IL-12 podríamos esperar un perfil de respuesta de tipo Th2 y no Th1. Se vio que es el perfil Th1 el de mayor eficacia para la supervivencia del parásito, por lo cual esta modulación sería favorecedora para su supervivencia en su hospedero. En este sentido, la identificación de las glicoproteínas que inducen este efecto es importante y permitirían encontrar puntos de control, por ejemplo a través de su bloqueo o inhibición para evitar el efecto inmunológico favorable para el parásito.



## Bibliografía

1. César, D. Fasciolosis en Bovinos y Ovinos. **109**, 48–51 (2004).
2. Mas-Coma, S., Bargues, M. D. & Valero, M. A. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International Journal for Parasitology* **35**, 1255–1278 (2005).
3. Wolstenholme, A. J., Fairweather, I., Prichard, R., Von Samson-Himmelstjerna, G. & Sangster, N. C. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology* **20**, 469–476 (2004).
4. Abebe, R. *et al.* Fasciolosis: Prevalence, financial losses due to liver condemnation and evaluation of a simple sedimentation diagnostic technique in cattle slaughtered at Hawassa. *Ethiop. Vet. J.* **14**, 39–51 (2010).
5. Mas-Coma, M. S., Esteban, J. G. & Bargues, M. D. Epidemiología de la fascioliasis humana: revisión y propuesta de nueva clasificación Tipos de fascioliasis humana.
6. Mas-Coma, S., Valero, M. A. & Bargues, M. D. Fasciola, Lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Advances in Parasitology*, no. 69 41–146 (2009).
7. González, L. C. *et al.* Hyperendemic human fascioliasis in Andean valleys: An altitudinal transect analysis in children of Cajamarca province, Peru. *Acta Trop.* **120**, 119–129 (2011).
8. Dusak, A. *et al.* Radiological Imaging Features of Fasciola hepatica Infection – A Pictorial Review. *J. Clin. Imaging Sci.* **2**, 2 (2012).
9. Lim, J. H., Mairiang, E. & Ahn, G. H. Biliary parasitic diseases including clonorchiasis, opisthorchiasis and fascioliasis. *Abdom. Imaging* **33**, 157–165 (2008).
10. Hodgkinson J, Cwiklinski K, Beesley NJ, Paterson S, W. D. Identification of putative markers of triclabendazole resistance by a genome-wide analysis of genetically recombinant Fasciola hepatica. *Parasitology* **140**, 1523–1533 (2013).
11. Dalton, J. P. & Mulcahy, G. Parasite vaccines - A reality? *Veterinary Parasitology* **98**, 149–167 (2001).
12. Falcón, C. R., Carranza, F. A., Aoki, P., Motrán, C. C. & Cervi, L. Adoptive transfer of dendritic cells pulsed with Fasciola hepatica antigens and lipopolysaccharides confers protection against fasciolosis in mice. *J. Infect. Dis.* **205**, 506–514 (2012).
13. Maggioli, G. *et al.* The recombinant gut-associated M17 leucine aminopeptidase in combination with different adjuvants confers a high level of protection against Fasciola hepatica infection in sheep. *Vaccine* **29**, 9057–9063 (2011).
14. Acosta, D. *et al.* Fasciola hepatica leucine aminopeptidase, a promising candidate for vaccination against ruminant fasciolosis. *Mol. Biochem. Parasitol.* **158**, 52–64 (2008).
15. Muro, A., Ramajo, V., Lopez, J., Simon, F. & Hillyer, G. V. Fasciola hepatica: vaccination of rabbits with native and recombinant antigens related to fatty acid binding proteins. *Vet Parasitol* **69**, 219–229 (1997).
16. Morrison, C. A. *et al.* Protection of cattle against Fasciola hepatica infection by vaccination with glutathione S-transferase. *Vaccine* **14**, 1603–1612 (1996).
17. Noya, V. *et al.* Modulation of dendritic cell maturation by Fasciola hepatica: Implications of glycans and mucins for vaccine development. *J. Vaccines Vaccin.* **5**, (2014).
18. Wijffels, G. L. *et al.* Vaccination of Sheep with Purified Cysteine Proteinases of Fasciola hepatica Decreases Worm Fecundity. *Exp. Parasitol.* **78**, 132–148 (1994).
19. Dalton, J. P. *et al.* Fasciola hepatica cathepsin L-like proteases: Biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. in *International Journal for Parasitology* **33**, 1173–1181 (2003).
20. Jayaraj, R. *et al.* Liver fluke vaccines: Vaccination Against Fasciolosis by a Multivalent Vaccine of Recombinant Stage-Specific Antigens. in *Procedia in Vaccinology* **2**, 80–83 (2010).
21. Espino, A. M. & Hillyer, G. V. A novel Fasciola hepatica saposinlike recombinant protein with immunoprophylactic potential. *J. Parasitol.* **90**, 876–879 (2004).
22. Maggioli, G., *et al.* A recombinant thioredoxin-glutathione reductase from Fasciola hepatica induces a protective response in rabbits. *Exp Parasitol*, 2011. 129(4): p. 323-30.No Title. *Exp. Parasitol.* **129**, 323–30 (2011).
23. van Kooyk, Y. & Rabinovich, G. a. Protein-glycan interactions in the control of innate and

- adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* **9**, 593–601 (2008).
24. Pinho, S. S. & Reis, C. A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer* **15**, 540–555 (2015).
  25. Tran, D. T. & Ten Hagen, K. G. Mucin-type o-glycosylation during development. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 6921–6929 (2013).
  26. Varki, A. & Sharon, N. *Historical Background and Overview. Essentials of Glycobiology* (2009). doi:NBK1931 [bookaccession]
  27. Malhotra, R. Membrane Glycolipids: Functional Heterogeneity: A Review. *Biochem. Anal. Biochem.* **1**, 1–5 (2012).
  28. Malhotra, R. Membrane Glycolipids: Functional Heterogeneity: A Review. *Biochem. Anal. Biochem.* **1**, 1–5 (2012).
  29. Rodríguez, E. *et al.* Glycans from *Fasciola hepatica* Modulate the Host Immune Response and TLR-Induced Maturation of Dendritic Cells. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, (2015).
  30. Ravidà, A. *et al.* *Fasciola hepatica* Surface Coat Glycoproteins Contain Mannosylated and Phosphorylated N-glycans and Exhibit Immune Modulatory Properties Independent of the Mannose Receptor. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0004601 (2016).
  31. Ravidà, A. *et al.* *Fasciola hepatica* surface tegument: glycoproteins at the interface of parasite and host. *Mol. Cell. Proteomics* 1–48 (2016). doi:10.1074/mcp.M116.059774
  32. Ravidà, A. *et al.* *Fasciola hepatica* surface tegument: glycoproteins at the interface of parasite and host. *Mol. Cell. Proteomics* 1–48 (2016). doi:10.1074/mcp.M116.059774
  33. Morphew, R. M. *et al.* Identification of the major proteins of an immune modulating fraction from adult *Fasciola hepatica* released by Nonidet P40. *Vet. Parasitol.* **191**, 379–385 (2013).
  34. Wilson, R. A. *et al.* Exploring the *Fasciola hepatica* tegument proteome. *Int. J. Parasitol.* **41**, 1347–1359 (2011).
  35. Ravidà, A., Aldridge, A., Driessen, N., Ferry, H., Cornellis, H., O' Neill, S. *Fasciola hepatica* Surface Coat Glycoproteins Contain Mannosylated and Phosphorylated N-glycans and Exhibit Immune Modulatory Properties Independent of the Mannose Receptor. *PLoS Negl. Trop. Dis.* (2016).
  36. Cancela, M. *et al.* Survey of transcripts expressed by the invasive juvenile stage of the liver fluke *Fasciola hepatica*. *BMC Genomics* **11**, 227 (2010).
  37. Casaravilla, C. *et al.* Mucin-type o -glycosylation in helminth parasites from major taxonomic groups: evidence for widespread distribution of the tn antigen (galnac-ser/thr) and identification of udp-galnac:polypeptide n -acetylgalactosaminyltransferase activity. *J. Parasitol.* **89**, 709–714 (2003).
  38. Freire, T., Casaravilla, C., Carmona, C. & Osinaga, E. Mucin-type O-glycosylation in *Fasciola hepatica*: Characterisation of carcinoma-associated Tn and sialyl-Tn antigens and evaluation of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase activity. *Int. J. Parasitol.* **33**, 47–56 (2003).
  39. Vega-Ramos, J. & Villadangos, J. A. Consequences of direct and indirect activation of dendritic cells on antigen presentation: Functional implications and clinical considerations. *Molecular Immunology* **55**, 175–178 (2013).
  40. Villadangos, J. A. & Heath, W. R. Life cycle, migration and antigen presenting functions of spleen and lymph node dendritic cells: Limitations of the Langerhans cells paradigm. *Seminars in Immunology* **17**, 262–272 (2005).
  41. Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* **140**, 805–820 (2010).
  42. Hubo, M. *et al.* Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Front. Immunol.* **4**, (2013).
  43. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **11**, 373–384 (2010).
  44. Bruce Beutler. MICROBE SENSING, POSITIVE FEEDBACK LOOPS, AND THE PATHOGENESIS OF INFLAMMATORY DISEASES. *Immunol. Rev.* **227**, 248–263 (2009).
  45. Maizels, R. M. *et al.* Helminth parasites - Masters of regulation. *Immunological Reviews* **201**, 89–116 (2004).
  46. Rodríguez E1, Carasi P1, Frigerio S1, da Costa V1, van Vliet S2, Noya V1, Brossard N1, van Kooyk Y2, García-Vallejo JJ2, F. T. *Fasciola hepatica* Immune Regulates CD11c+ Cells by Interacting with the Macrophage Gal/GalNAc Lectin. *Front. Immunol.* **15**, 264 (2017).
  47. Everts, B., Smits, H. H., Hokke, C. H. & Yazdanbakhsh, M. Helminths and dendritic cells: Sensing

- and regulating via pattern recognition receptors, Th2 and Treg responses. *European Journal of Immunology* **40**, 1525–1537 (2010).
48. Dalton, J. P., Robinson, M. W., Mulcahy, G., O'Neill, S. M. & Donnelly, S. Immunomodulatory molecules of *Fasciola hepatica*: Candidates for both vaccine and immunotherapeutic development. *Vet. Parasitol.* **195**, 272–285 (2013).
  49. Flynn, R. J. & Mulcahy, G. Possible role for toll-like receptors in interaction of *Fasciola hepatica* excretory/secretory products with bovine macrophages. *Infect. Immun.* **76**, 678–684 (2008).
  50. Vázquez-Mendoza, A., Carrero, J. C. & Rodríguez-Sosa, M. Parasitic infections: A role for C-type lectins receptors. *BioMed Research International* **2013**, (2013).
  51. Meevissen, M. H. J., Yazdanbakhsh, M. & Hokke, C. H. *Schistosoma mansoni* egg glycoproteins and C-type lectins of host immune cells: Molecular partners that shape immune responses. *Exp. Parasitol.* **132**, 14–21 (2012).
  52. Everts, B. *et al.* Schistosome-derived omega-1 drives Th2 polarization by suppressing protein synthesis following internalization by the mannose receptor. *J. Exp. Med.* **209**, 1753–1767 (2012).
  53. Terrazas, C. A., Alcántara-Hernández, M., Bonifaz, L., Terrazas, L. I. & Satoskar, A. R. Helminth-excreted/secreted products are recognized by multiple receptors on DCs to block the TLR response and bias Th2 polarization in a cRAF dependent pathway. *FASEB J.* **27**, 4547–4560 (2013).
  54. Tawill, S., Le Goff, L., Ali, F., Blaxter, M. & Allen, J. E. Both Free-Living and Parasitic Nematodes Induce a Characteristic Th2 Response That Is Dependent on the Presence of Intact Glycans. *Infect. Immun.* **72**, 398–407 (2004).
  55. Klaver, E. J. *et al.* *Trichuris suis*-induced modulation of human dendritic cell function is glycan-mediated. *Int. J. Parasitol.* **43**, 191–200 (2013).
  56. Hamilton, C. M. *et al.* The *Fasciola hepatica* tegumental antigen suppresses dendritic cell maturation and function. *Infect. Immun.* **77**, 2488–2498 (2009).
  57. Vukman, K. V., Adams, P. N., Metz, M., Maurer, M. & O'Neill, S. M. *Fasciola hepatica* Tegumental Coat Impairs Mast Cells' Ability To Drive Th1 Immune Responses. *J. Immunol.* **190**, 2873–2879 (2013).
  58. Vukman, K. V., Adams, P. N. & O'Neill, S. M. *Fasciola hepatica* tegumental coat antigen suppresses MAPK signalling in dendritic cells and up-regulates the expression of SOCS3. *Parasite Immunol.* **35**, 234–238 (2013).
  59. Cummings, R. & Turco, S. *Parasitic Infections. Essentials of Glycobiology* (2009).
  60. Dowling, D. J. *et al.* Major secretory antigens of the Helminth *Fasciola hepatica* activate a suppressive dendritic cell phenotype that attenuates Th17 cells but fails to activate Th2 immune responses. *Infect. Immun.* **78**, 793–801 (2010).
  61. Falcón, C. *et al.* Excretory-secretory products (ESP) from *Fasciola hepatica* induce tolerogenic properties in myeloid dendritic cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **137**, 36–46 (2010).
  62. Giacomini, C., Villarino, A., Franco-Fraguas, L. & Batista-Viera, F. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on silica and agarose: Comparison of different methods. *J. Mol. Catal. - B Enzym.* **4**, 313–327 (1998).
  63. Rodrigues, A., *et al.* Parasite Glycobiology: A Bittersweet Symphony. *PLoS pathog* **11**, (2015).
  64. OBoyle Kevin P, Khorshidi Manoochehr, Lalezari Parviz, Longenecker B.M., Llyod Kenneth O, Welt Sydney, Wright Kathryn E., M. A. L. Specificity Analysis of Murine Monoclonal Antibodies Reactive with Tn, Sialylated Tn, T, and Monosialylated (2->6) T Antigens. *Hybridoma* **Vol. 15 No**, 401–408 (1996).
  65. Marsland, B. J. & Kopf, M. Toll-like receptors: paving the path to T cell-driven autoimmunity? *Current Opinion in Immunology* **19**, 611–614 (2007).
  66. van Die, I. & Cummings, R. D. Glycan gimmickry by parasitic helminths: A strategy for modulating the host immune response? *Glycobiology* **20**, 2–12 (2010).
  67. Harn, D. A., McDonald, J., Atochina, O. & Da'Dara, A. A. Modulation of host immune responses by helminth glycans. *Immunological Reviews* **230**, 247–257 (2009).
  68. Rodríguez E, Kalay H, Noya V, Brossard N, Giacomini C, van Kooyk Y, García-Vallejo JJ, F. T. *Fasciola hepatica* glycoconjugates immunoregulate dendritic cells through the Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin inducing T cell anergy. *Sci Rep* **7:46748**,
  69. Garcia-Campos, A. *et al.* Tegument Glycoproteins and Cathepsins of Newly Excysted Juvenile

- Fasciola hepatica Carry Mannosidic and Paucimannosidic N-glycans. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, (2016).
70. Li, B., Russell, S. C., Zhang, J., Hedrick, J. L. & Lebrilla, C. B. Structure determination by MALDI-IRMPD mass spectrometry and exoglycosidase digestions of O-linked oligosaccharides from *Xenopus borealis* egg jelly. *Glycobiology* **21**, 877–894 (2011).
  71. Aldridge, A. & O' Neill, S. M. Fasciola hepatica tegumental antigens induce anergic like T cells via dendritic cells in a mannose receptor dependent manner. *Eur. J. Immunol.* 1180–1192 (2016). doi:10.1002/eji.201545905.This
  72. Masli, S. & Turpie, B. Anti-inflammatory effects of tumour necrosis factor (TNF)-alpha are mediated via TNF-R2 (p75) in tolerogenic transforming growth factor-beta-treated antigen-presenting cells. *Immunology* **127**, 62–72 (2009).
  73. Goodridge, H. S. & Underhill, D. M. Fungal recognition by TLR2 and Dectin-1. *Handb. Exp. Pharmacol.* **183**, 87–109 (2008).
  74. Netea, M. G. & Maródi, L. Innate immune mechanisms for recognition and uptake of *Candida* species. *Trends in Immunology* **31**, 346–353 (2010).