

**Generación de herramientas  
para el estudio del  
reclutamiento del factor H  
del complemento a la capa  
laminar de *Echinococcus  
granulosus***

**Paula Seoane**

**Tutor: Dr. Álvaro Díaz**

**Licenciatura en Bioquímica  
Facultad de Ciencias**

**Febrero 2012**

En la tapa: micrografía electrónica de barrido de un quiste hidático, tomada por María Celina Elisondo (CONICET-Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina).

# Agradecimientos

Quiero agradecerles a todos los que colaboraron en la realización de este trabajo. En primer lugar a Álvaro, mi tutor, que me guió en todos los pasos y estuvo siempre ahí para contestar todas mis preguntas, atender todas mis inquietudes. También a mis compañeros de laboratorio, que crearon un ambiente de trabajo divertido, y siempre me ayudaron cuando precisé otro par de manos. No puedo olvidar a la gente del laboratorio “del frente” y “del fondo” que me abrieron sus puertas, prestándome reactivos, instrumentos o consejos. Finalmente, quiero agradecerle a la ANII que financió parcialmente el proyecto que enmarca este trabajo.

# Resumen

La hidatidosis es una enfermedad crónica causada por infección con el estadio larvario de *Echinococcus granulosus*. Este estadio forma una estructura llena de líquido llamada hidátide en el parénquima de órganos internos del hospedador. La hidátide está delimitada por una pared, que a su vez presenta dos estratos: la capa germinativa (GL) y la capa laminar (LL), externa a la anterior. Esta última, una estructura acelular cuyo mayor componente son mucinas, constituye una gran superficie para interaccionar con las cascadas solubles del plasma del hospedador. Parte de la función de la LL parece ser la regulación de la respuesta inmune del hospedador hacia el parásito. En lo que respecta al sistema complemento, la adquisición por parte del parásito de la capacidad de regular la activación de esta cascada es concomitante con la formación de la LL. Más aún, se ha encontrado factor H (principal regulador fisiológico de la vía alterna de activación del sistema complemento) del hospedador adsorbido sobre la LL. Esto sugiere fuertemente que el secuestro de este regulador sobre la LL es al menos uno de los mecanismos de evasión ejercido por el parásito, así como da pie a la búsqueda de un sitio con afinidad para factor H dentro de los componentes de la LL.

La interacción de la LL con el sistema complemento fue entonces el foco de este trabajo. Se trabajó con LL de infecciones secundarias experimentales de ratón, y se estudió su interacción con el sistema complemento humano a nivel de depósito del componente central del sistema (C3), inactivación de este componente, y reclutamiento de factor H. Además se comenzó a investigar el efecto de modificaciones a la LL sobre su capacidad de activar y/o regular el complemento y de reclutador factor H.

En primer lugar, se montó un sistema de detección de factor H a partir de anticuerpos monoclonales de ratón anti-factor H humano (MRC OX23 y MRC OX24) presentes bajo forma de líquidos ascíticos. El sistema formado por MRC OX24 purificado sobre proteína G y marcado con biotina, seguido por estreptavidina conjugada a peroxidasa, permitió detectar factor H con una sensibilidad de 5 ng en formato Western blot, siendo a la vez insensible a la potencial interferencia de inmunoglobulinas de ratón presentes en las muestras de LL.

En segundo lugar, se puso a punto un ensayo de depósito de C3 sobre LL, para el cual se utilizó un anticuerpo policlonal anti-C3d, que reconoce esta porción en distintas especies de C3 (productos de la activación e inactivación del mismo). Este ensayo se utilizó para estudiar la cinética de activación e inactivación de C3 sobre LL modificadas por proteólisis inespecífica con pronasa, en comparación con LL sometidas a un tratamiento control. Tanto el tratamiento de digestión con pronasa, como su control,

involucraron el agregado de pronasa a las muestras y posterior eliminación con repetidos lavados. Sin embargo, la presencia de una banda inesperada correspondiente a una especie de bajo peso molecular reconocida por el anti-C3d, sumado a la ausencia de dicha banda en un ensayo de depósito de C3 análogo sobre una superficie no expuesta a pronasa, indicó que, pese a los cuidados empleados, existía un remanente de pronasa en las muestras. Es así que no se pudieron establecer comparaciones estrictamente válidas entre los resultados obtenidos para las muestras digeridas con pronasa y control, aunque los datos sugieren que la proteólisis inespecífica de la LL provoca un aumento del depósito de C3.

Sobre muestras de LL digeridas con pronasa y control se realizaron ensayos preliminares de unión *in vitro* de factor H. Éstos no revelaron diferencias entre las muestras en cuanto al reclutamiento de factor H. Sin embargo, se deben ajustar las condiciones del ensayo para que revele preferencialmente el componente de unión específica a la LL, en relación a la adsorción inespecífica de factor H, que se observó fue similar a la adsorción generalizada de proteínas plasmáticas.

Finalmente, se realizó una comparación preliminar entre la cinética de activación e inactivación de C3 sobre LL control y zymosán. El zymosán es una preparación de paredes de levadura *S. cerevisiae*, que se sabe corresponden a una superficie fuertemente activadora del complemento, a través de la vía de las lectinas y en particular de la vía alternativa, es decir que no es capaz de reclutar la actividad de factor H. La comparación muestra que la LL tiene un comportamiento marcadamente distinto al de zymosán, constituyendo, si bien a nivel preliminar, la primera evidencia funcional y directa de que el control (por factor H) de la vía alternativa sobre la superficie de la LL es sumamente efectivo.

En suma, se generaron las herramientas necesarias para estudiar la LL en términos de capacidad activadora del complemento y de la inversamente relacionada capacidad de control de la vía alterna, así como de capacidad del reclutamiento físico de factor H. Con ellas se hicieron estudios preliminares que confirman que la LL controla la activación a través del reclutamiento de actividad de factor H y sugieren que podría hacerlo a través de sitio(s) de naturaleza peptídica.

# Lista de abreviaturas

AA: residuos aminoacídicos

ANA: dominio anafilotoxina

BCIP: 5-cloro-4-bromo-3'-indolfosfato

C4bBP: proteína de unión a C4b (del inglés *C4b-binding protein*)

CCP: unidad estructural de proteínas reguladoras del complemento (del inglés *complement control protein*)

CUB: uno de los dominios de C3 (del acrónimo en inglés *complement C1r/C1s, Uegf, Bmp1*)

Cys: cisteína

DAF: regulador del sistema complemento (del inglés *decay-accelerating factor*)

DTT: ditioneitol

FH: factor H

GL: capa germinativa (del inglés *germinal layer*)

Gln: glutamina

GPI: glicofosfatidilinositol (del inglés *glycophosphatidylinositol*)

His: histidina

IAA: iodoacetamida

IgG: inmunoglobulina de clase G

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

LL: capa laminar (del inglés *laminated layer*)

LNK: uno de los dominios de C3 (del inglés *linker*)

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

MBL: lectina de unión a mananos (del inglés *mannan-binding lectin*)

MCP: cofactor de factor I asociado a membrana (del inglés *membrane cofactor protein*)

MG: dominio macroglobulina

NBT: cloruro de azul nitro de tetrazolio (del inglés *nitro blue tetrazolium chloride*)

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

PVDF: fluoruro de polivinilideno (del inglés *polyvinylidene fluoride*)

RFU: unidad relativa de fluorescencia (del inglés *relative fluorescence unit*)

SDS: dodecil sulfato de sodio (del inglés *sodium dodecylsulphate*)

SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida empleando SDS (del inglés *polyacrilamide gel electrophoresis*)

SHN: suero humano normal

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

TED: dominio de C3 que contiene al enlace tioéster (del inglés *thioester-containing domain*)

Tris: tris(hidroximetil)aminometano

# Índice de contenidos

Agradecimientos.....	i
Resumen .....	ii
Lista de abreviaturas .....	iv
1. Introducción.....	1
1.1 Generalidades sobre <i>Echinococcus</i> .....	1
1.2 Estructura de la hidátide y el quiste hidático .....	3
1.3 Estructura de la Capa Laminar.....	4
1.4 La Capa Laminar y el Sistema Inmune .....	6
1.5 Sistema Complemento: generalidades.....	7
1.6 Iniciación de la vía alternativa .....	8
1.7 C3: Estructura, Activación e Inactivación.....	9
1.8 Regulación de la convertasa de C3 de la vía alternativa .....	12
1.9 Factor H.....	13
1.10 La Capa Laminar y Complemento .....	15
2. Objetivos.....	18
3. Materiales y Métodos.....	19
3.1 Obtención del material de capa laminar .....	19
3.2 Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA) .....	19
3.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	20
3.4 Tinción con azul brillante de Coomassie.....	20
3.5 Tinción con nitrato de plata.....	20
3.6 Purificación de las muestras de anticuerpos monoclonales MRC OX23 y MRC OX24.....	21
3.7 Transferencia semi-seca a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) ..	21

3.8	<i>Western blots</i> .....	22
3.9	<i>Dot blots</i> .....	23
3.10	Tratamiento de la capa laminar con pronasa y su control .....	24
3.11	Ensayo fluorogénico para medida de la actividad proteolítica .....	25
3.12	Ensayos de depósito de C3 sobre la capa laminar.....	26
3.13	Ensayo de depósito de C3 sobre Zymosán .....	26
3.14	Ensayos de adsorción <i>in vitro</i> de factor H sobre la capa laminar.....	27
4.	Resultados .....	28
4.1	Generación de herramientas para el estudio de la unión <i>in vitro</i> de factor H humano a la capa laminar .....	28
4.1.1	Análisis de las muestras de anticuerpos monoclonales contra factor H humano, MRC OX23 y MRC OX24.....	28
4.1.2	Ensayo de detección indirecta de factor H sobre la capa laminar <i>in vitro</i> , utilizando MRC OX24 .....	31
4.1.3	Purificación de anticuerpos monoclonales MRC OX23 y MRC OX24.....	32
4.1.4	Incorporación de biotina a los anticuerpos monoclonales purificados.....	35
4.1.5	Detección de factor H adsorbido <i>in vitro</i> sobre la capa laminar utilizando MRC OX24-biotina.....	37
4.2	Puesta a punto del sistema experimental para el análisis del depósito de C3 sobre capa laminar sometida a distintos tratamientos.....	41
4.2.1	Puesta a punto del ensayo de depósito de C3 sobre la capa laminar .....	41
4.2.2	Ensayos preliminares de depósito de C3 sobre capa laminar control y sometida a proteólisis inespecífica .....	44
5.	Discusión.....	54
6.	Referencias .....	59

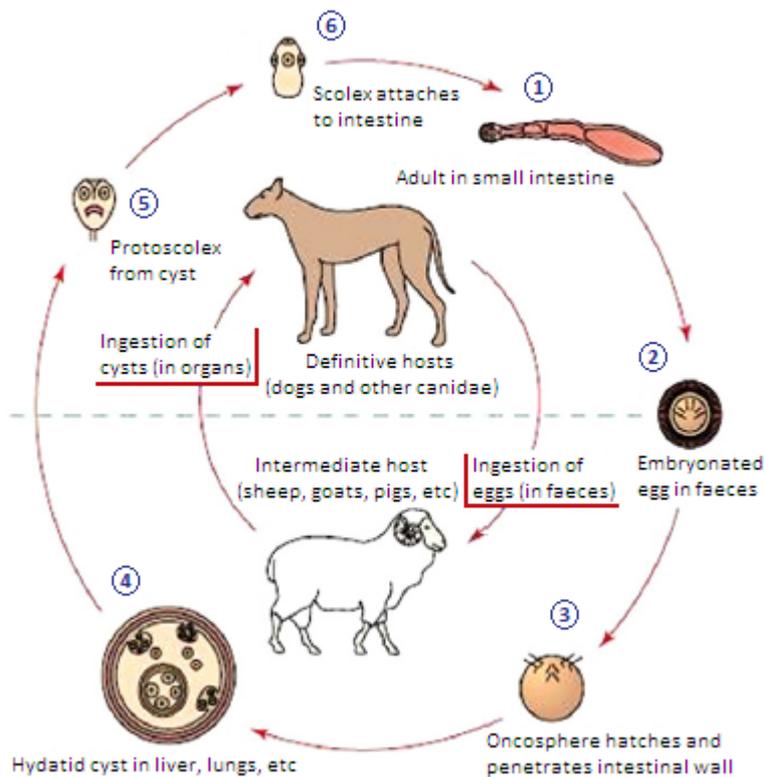
# 1. Introducción

## 1.1 Generalidades sobre *Echinococcus*

*Echinococcus* es un género de parásitos cestodos causantes de las infecciones zoonóticas conocidas como equinococosis. Históricamente este género se considera compuesto por cuatro especies: *E. granulosus* (causante de la equinococosis quística o hidatidosis), *E. multilocularis* (agente causal de la equinococosis alveolar), *E. vogeli* y *E. oligarthrus* (ambas responsables de equinococosis poliquísticas). Recientemente se incorporaron a este género cuatro especies: *E. equinus*, *E. ortleppi*, *E. shiquicus* y *E. felidis*, habiendo sido las primeras dos previamente consideradas cepas dentro de la especie *granulosus* [1].

Estos parásitos llevan adelante un ciclo de vida complejo, que involucra la infección de hospederos intermediarios y definitivos. En los órganos internos de hospederos intermediarios (omnívoros o herbívoros) se desarrolla el estadio larvario o metacestodo, mientras que en el intestino delgado de los hospederos definitivos (carnívoros) se desarrolla el estadio adulto.

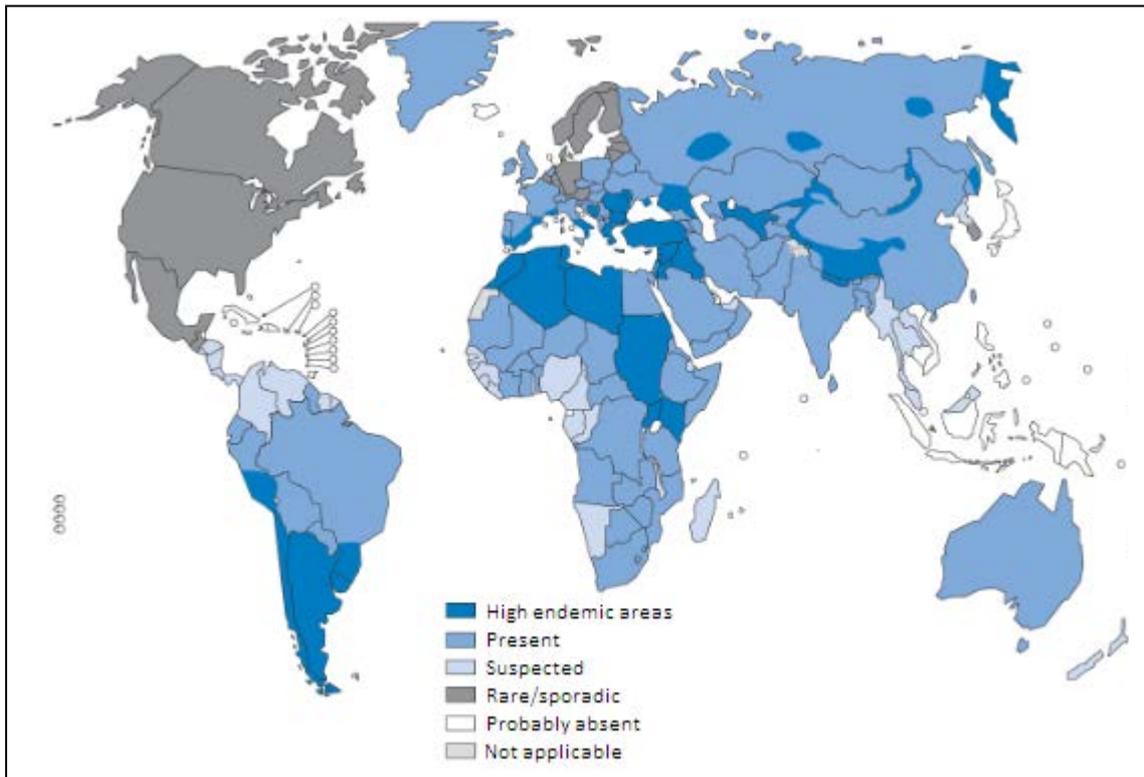
En el caso de *E. granulosus* (Figura 1), los hospederos definitivos son cánidos y especialmente perros. El estadio adulto se reproduce y libera huevos embrionados al ambiente a través de las heces. Éstos son ingeridos por los hospederos intermediarios (una variedad de ungulados incluyendo ovejas, cabras, vacas, caballos) y, al alcanzar el intestino delgado, eclosionan liberando oncosferas. Las oncosferas penetran la pared intestinal y migran a través del sistema circulatorio hacia varios órganos, principalmente pulmones e hígado, donde se desarrollan en larvas de forma subesférica llenas de líquido llamadas hidátides. Éstas crecen gradualmente y producen protoscólices y en algunos casos hidátides hijas. Los protoscólices constituyen la etapa infectiva para los hospederos definitivos, si bien también pueden generar infecciones llamadas secundarias en los propios hospederos intermediarios, al ser liberados luego de la ruptura traumática de la hidátide, ya que tienen la capacidad de realizar lo que se llama diferenciación reversa. Para culminar el ciclo, los hospederos definitivos se infectan al ingerir vísceras infectadas de los hospederos intermediarios. Luego de la ingestión, los protoscólices evaginan y se adhieren a la mucosa intestinal, donde se desarrollan al estadio adulto en cuestión de 32 – 80 días.



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Echinococcus granulosus*. Los detalles de cada paso se describen en el texto. Adaptado del sitio web de Centers for Disease Control and Prevention de Estados Unidos ([www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/Echinococcosis.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/Echinococcosis.htm)).

El ser humano es un hospedero intermediario accidental que puede infectarse por contacto fecal-oral con hospederos definitivos, o indirectamente al ingerir vegetales y aguas contaminadas [2]. El íntimo contacto entre perros, ganado y seres humanos que existe en zonas rurales favorece la infección. De hecho, la distribución geográfica de equinococosis (Figura 2) refleja la alta relación que existe entre la prevalencia de la enfermedad y la actividad ganadera.

Como se observa en la Figura 2, la equinococosis es una enfermedad global, endémica en el cono sur de América del Sur, en el litoral Mediterráneo y en algunas regiones de Asia y África. Han existido varias campañas exitosas para controlar la enfermedad, la primera en Islandia hace aproximadamente 130 años y más adelante en Nueva Zelanda (1959) y Tasmania (1965), fruto de las cuales la enfermedad se declaró provisionalmente erradicada en dichos países. En lo que respecta al cono sur de América del Sur, se han hecho programas regionales para controlar la equinococosis en Argentina, Chile y Uruguay, dando buenos resultados pero sin llegar a la erradicación [3]. Debe notarse que, a pesar del éxito de los programas de control a nivel local, no se ha observado un cambio en la distribución global del parásito que continúa siendo relevante en temas de salud pública.



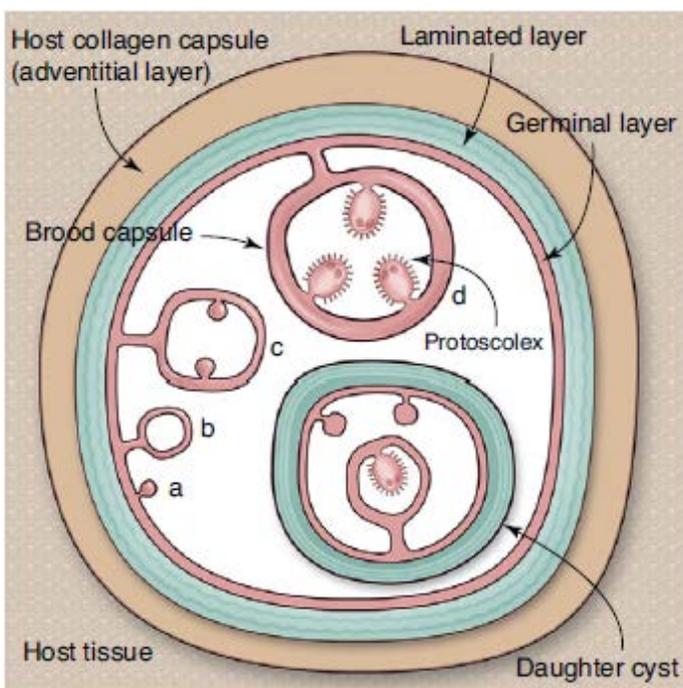
**Figura 2.** Distribución geográfica de *Echinococcus granulosus* y equinococosis quística (hidatidosis), 2009. Tomado del sitio web de *World Health Organisation* (<http://gamapserver.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>)

Desde el punto de vista económico, el impacto de esta enfermedad es muy importante, siendo atribuibles a la equinococosis quística específicamente pérdidas en faena por decomiso de hígados infectados, reducción en la productividad de animales infectados así como pérdidas humanas, costos del tratamiento de la enfermedad y secuelas o discapacidades asociadas con la misma [4].

## 1.2 Estructura de la hidátide y el quiste hidático

Como se mencionó anteriormente, la infección con el metacestodo de *E. granulosus* causa hidatidosis. Esta enfermedad se caracteriza por la formación de hidátides en el parénquima de diversos órganos, más frecuentemente en el hígado. Como se dijo antes, la hidátide es una estructura parasitaria unilocular llena de líquido (líquido hidático), delimitada por una pared (pared de la hidátide). La pared a su vez está compuesta por una delgada capa de células, la capa germinativa (GL), y externo a ella, una gruesa capa de material extracelular, la capa laminar (LL). Esta última es una estructura exclusiva del género *Echinococcus*, siendo más prominente en *E. granulosus* donde puede alcanzar hasta 3 mm de espesor [5-6]. Al ser una estructura elástica capaz de soportar grandes presiones, ayuda a proteger la integridad física de las hidátides, permitiéndoles estar turgentes. A su vez, genera una “zona de

exclusión” alrededor de las hidátides que protege a las células de la GL del contacto directo con las células del sistema inmune del hospedero, aunque sí permite el pasaje de macromoléculas [7]. Por fuera de la LL se encuentra una cápsula de colágeno producida por el hospedador (capa adventicia) y/o una zona de reacción inflamatoria local activa, con infiltración de leucocitos en la capa adventicia. La formación de una u otra estructura se relaciona con el grado de adaptación del parásito al hospedador en cuestión, siendo la formación de una cápsula de colágeno un signo de buena adaptación parásito-hospedador, situación en la cual además, por lo general, se desarrollan hidátides fértiles [5-6]. En conjunto, la hidátide y la capa adventicia y/o reacción inflamatoria local, conforman el quiste hidático.



**Figura 3.** Diagrama de la estructura de quistes hidáticos causados por *E. granulosus*. La pared de la hidátide está compuesta por una capa celular interna, la capa germinal (GL), y una capa gruesa de material extracelular (LL). Usualmente la hidátide está rodeada por una cápsula de colágeno proveniente del hospedador, y estas dos estructuras en conjunto conforman el quiste hidático. La cavidad de la hidátide contiene el líquido hidático, que baña las células de la GL. Durante la vida del parásito en el hospedero intermediario, la GL genera brotes hacia el interior de la hidátide que se vesicularizan y posteriormente generan protoscolex (etapas a – d). Ocasionalmente, hidátides hijas con su propia LL se pueden observar dentro de hidátides mayores. Tomado de [7].

### 1.3 Estructura de la Capa Laminar

A nivel molecular, la LL presenta dos componentes estructurales; nano-depósitos de una sal cálcica de myo-inositol hexakisfosfato ( $\text{InsP}_6$ ) y una malla de glicoproteínas de la familia de las mucinas. Los primeros son exclusivos de la especie *granulosus* mientras que las mucinas son el componente principal en las LL de todas las especies del género [7].

La estructura de los glicanos que decoran las mucinas presentes en la LL se conoce en detalle [8-9], mientras que los componentes proteicos de las mucinas, las apomucinas, han resultado más difíciles de elucidar (el alto grado de procesamiento post traduccional que sufren los precursores proteicos de las mucinas hace muy difícil

realizar estudios de proteómica). No obstante, resultados del transcriptoma de la GL (<http://www.compsysbio.org/partigene>) sugieren que los *clusters* EGC0000317, EGC0004254, EGC0002904 y EGC0005092 corresponden a apomucinas estructurales de la LL, ya que estas secuencias son las más expresadas en la GL y están en cambio ausentes en protoscólicas. Estas secuencias presentan un péptido líder (característica necesaria para la producción de proteínas de secreción), tienen extremos N-terminales no glicosilados cortos (que en el caso de EGC0004254 y de EGC0002904 presentan cisteínas desapareadas), seguidos por un dominio glicosilado con alta proporción de residuos de treonina, y finalmente por una secuencia de inserción de ancla glicosilfosfatidilinositol (GPI) en el extremo C-terminal (Figura 4). Existen ortólogos de EGC0000317 y EGC0004254 en el transcriptoma de *E. multilocularis* (<http://www.compsysbio.org/partigene>). [7]

```

> EGC00000317 (37 ESTs de ~1500)
YSHEYYGEEDDLTTSTTTTTSTTQTVAKATS
▲
▲
▲
▲
> EGC0002904/EGC0004254 (total 19 ESTs de ~1500)
HACKQSPPPMTTAALTTTRATT [TAPTTTKATTKFATTQKTITTPRTTRTTTKATTTTRTTT] TPRTT
ATTTTRRPSTTATTRPTTTAAPLKTTSPIATSIIQASSEMTTS
> EGC0005092 (3 ESTs de ~1500)
NPPPTTTAPTTTGTTKAPMTTEATTEAPTTRATTIASKPTGATTTPTTTEATTTPTTEATTTPTTEATTTP
TTEATTTPMTIEATTTPTTEATTEAPMTTEATTEAPMTTEATTEAPMTTEANTKAPATTDATTEAPA
TTRATTIASKPTGATTTNPTTEATTTPMTIEATTTPITTRVTTKATTTTRKTTITPRTTAT...

```

**Figura 4. Secuencias de las probables apomucinas de la LL.** Las secuencias provienen de <http://www.compsysbio.org/partigene/>. Se indica el número de ESTs asociadas a cada secuencia de un total de 1500, lo que da una idea grosera de nivel de expresión. Se muestran sólo las secuencias de las proteínas maduras, sin los péptidos líder para translocación a retículo endoplásmico (predichos por SignalP; <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) y sin las señales C-terminales para incorporación de anclas glicosilfosfatidilinositol (GPI; predicción por Big-PI predictor; [http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi\\_server.html](http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi_server.html)), ambas características presentes en las dos secuencias completas de las mostradas (la secuencia de EGC0005092 está truncada C-terminalmente). Para EGC0002904 y EGC0004254, muy relacionadas, se muestra la secuencia más larga de las dos, con la región ausente en EGC0004254 indicada entre corchetes. Se marcan en verde los sitios de O-glicosilación mucínica predichos por Net-O-Glyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>), en rojo los residuos ácidos (D/E), y en azul los básicos (K/R). Los péptidos N-terminales no glicosilados se enmarcan en gris. Se subraya el residuo de cisteína desapareado. Las cabezas de flecha negras y grises indican respectivamente predicción y predicción débil (>40%; el corte es 50%) de sulfatación de tirosina según SuRe (<http://ecsb.ex.ac.uk/sulfotyrosine>). Las cabezas de flecha roja indican predicción de sulfatación por Sulfinator (<http://expasy.org/tools/sulfinator/>). Tomado de [12].

Con respecto al ensamblaje de las mucinas en la LL, se especula que interacciones entre mucinas cortas generarían la estructura en fibrillas que se observa al microscopio electrónico, y que interacciones entre éstas explicarían el ensamblaje en una malla tridimensional. Se cree que para la formación de ambos niveles estructurales son importantes las interacciones entre los azúcares, a través de enlaces de hidrógeno, y también entre las apomucinas, posiblemente mediante puentes disulfuro e incluso a través de interacciones electrostáticas [7].

#### 1.4 La Capa Laminar y el Sistema Inmune

La LL constituye la interfaz entre el parásito y el hospedero en la hidatidosis; permite el intercambio de moléculas de hasta 150 kDa entre éstos, a la vez que impide el contacto directo entre la GL y células del sistema inmune del hospedador [10].

Un aspecto especialmente interesante de la LL es que parece estar asociada con la regulación de la respuesta inflamatoria del hospedero hacia el parásito, siendo su producción un evento necesario para, y simultáneo con, la resolución de la inflamación en las infecciones con *Echinococcus* larvario [6, 11]. Esto parece indicar que los motivos moleculares presentes en la LL son decodificados como material inocuo, o incluso tolerogénico. Sobre esta hipótesis se han realizado estudios, aún no publicados, de los efectos *in vitro* de componentes de la LL sobre células dendríticas y macrófagos, observándose que las células pre-incubadas con preparaciones particuladas de la LL, responden de forma anti-inflamatoria a estímulos inflamatorios tipo 1, y adoptan fenotipos compatibles con los de células dendríticas tolerogénicas [12]. Antecedentes más limitados, publicados, reportan que macrófagos incubados con preparaciones particuladas de LL, luego de ser estimulados con interferón- $\gamma$ , presentan una reducción dependiente de la dosis en la producción de óxido nítrico. Este efecto también se observa si las preparaciones particuladas de LL se adicionan a los macrófagos al momento de la estimulación, lo cual sugiere que el fenómeno no depende de la exposición prolongada al material foráneo [13].

Como se expuso anteriormente, la LL representa una barrera para las células del sistema inmune del hospedador que intenten llegar a la GL. Sin embargo, el tamaño de poro de esta malla tridimensional es lo suficientemente grande como para permitir el intercambio de macromoléculas de hasta 150 kDa. Esta característica, sumado al gran grosor de la LL en *E. granulosus*, hacen que esta estructura proporcione una gran superficie para la interacción con las cascadas solubles presentes en el plasma del hospedador (a saber; cascada de coagulación, sistema de quininas, cascada fibrinolítica y sistema complemento). En particular, la interacción entre la LL y el sistema complemento se investigará en este trabajo. Los componentes de este sistema, que se explicará más en detalle en la siguiente sección, son capaces de

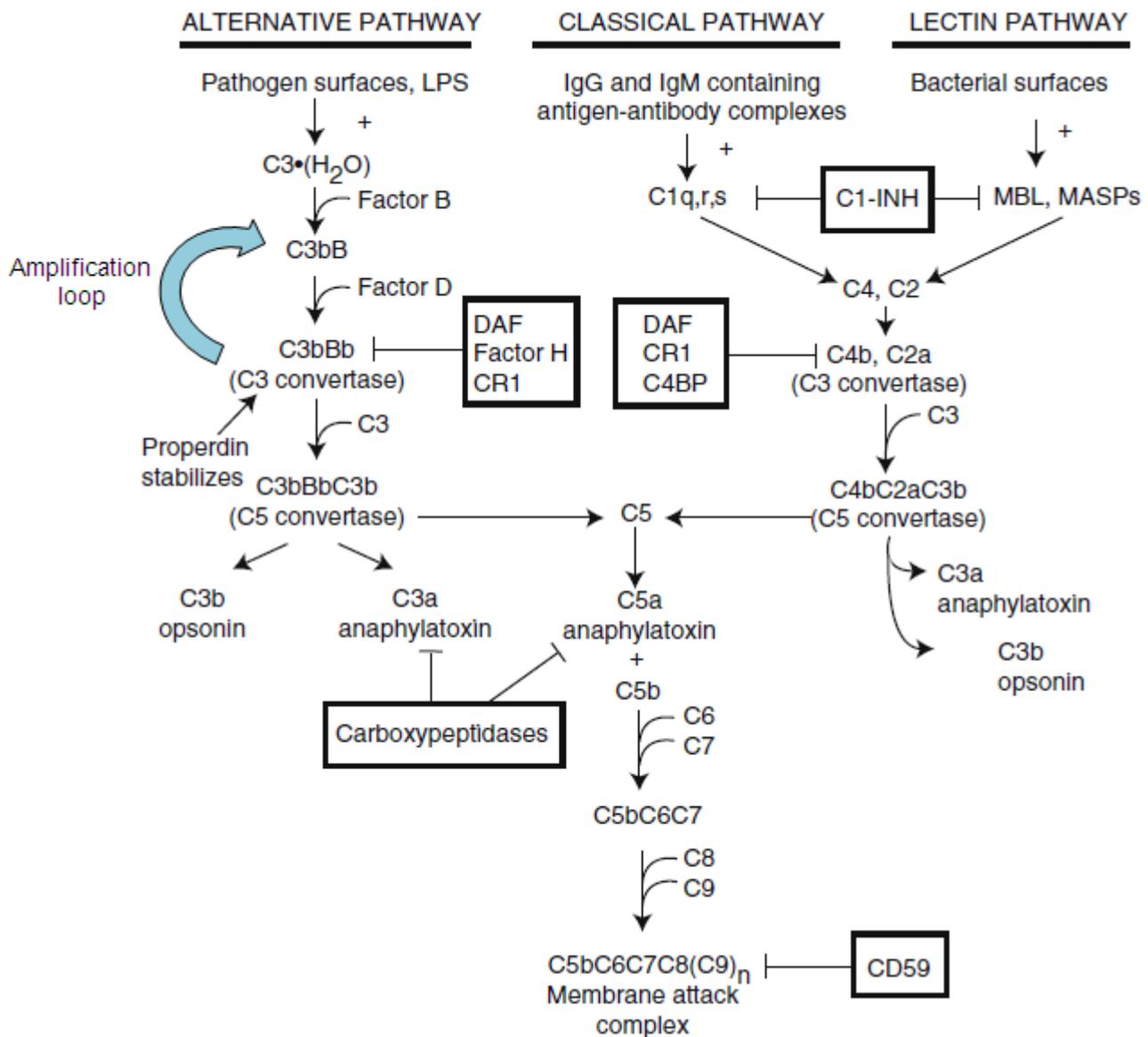
penetrar en la LL y de hecho algunos se recuperan en extractos de LL como proteínas asociadas a ella [14].

## 1.5 Sistema Complemento: generalidades

El sistema complemento se descubrió alrededor de los años 1890, en experimentos en los que se le atribuyó la tarea de “complementar” la actividad bactericida de anticuerpos presentes en el suero; de allí recibe su nombre [15-16]. Actualmente se sabe que este sistema consta de más de 30 proteínas plasmáticas (que representan más del 15% de la fracción globular del plasma [15]), y asociadas a membranas, y que su papel no se limita al de auxiliar las actividades efectoras de los anticuerpos, sino que presenta funciones esenciales tanto a nivel de la inmunidad innata como de la adaptativa [16-17]. Convencionalmente estas funciones incluían tres mecanismos efectores: reclutamiento de células inflamatorias e inmunocompetentes a través de la liberación de anafilotoxinas, opsonización de patógenos y/o células infectadas, y destrucción de patógenos susceptibles a través del ensamblaje del llamado complejo de ataque a la membrana (MAC, del inglés *membrane attack complex*) [18]. Hoy por hoy se le atribuyen además la concentración de antígenos en sitios de relevancia inmunológica (como son los folículos dentro de órganos linfoides secundarios) [19-20], la potenciación de la señal suscitada por partículas recubiertas por opsoninas del complemento en linfocitos B (actuando como un “adyuvante natural”) [21], así como funciones dentro de la inmunidad adaptativa a nivel de linfocitos T (aunque para éstas aún no se conocen los mecanismos moleculares que las posibilitan) [16-17]. Estas actividades revelan el carácter de puente entre la inmunidad innata y la adaptativa que desempeña el sistema complemento.

Existen tres vías de activación de complemento; clásica, de las lectinas y alternativa. Las tres difieren en las moléculas iniciales que determinan su activación, pero convergen en la formación de complejos enzimáticos que catalizan la activación proteolítica del componente central C3 (convertasas de C3). A partir de estas convertasas se ensamblan convertasas del componente C5, y en última instancia el MAC. (Figura 5) [22]

El componente central del sistema, C3, presenta un enlace tioéster interno en su estado nativo entre los residuos Cys988-Gln991 [23-24]. Durante su activación a C3b (proceso que se detalla más adelante), un rearrreglo conformacional no sólo expone este enlace al disolvente, sino que acerca el residuo His1104, que forma un intermediario acil-imidazol altamente reactivo con el residuo Gln991 [24-25]. A través de este intermediario, que reacciona preferentemente con grupos hidroxilo [23], C3b se une covalentemente a superficies cercanas “etiquetándolas” para fagocitosis o como superficie activadora del complemento.



**Figura 5.** Representación de las tres vías de activación del sistema complemento. Los inhibidores de cada vía están recuadrados. Modificado de [5].

## 1.6 Iniciación de la vía alternativa

Como puede apreciarse en la Figura 5, tanto la vía de las lectinas como la vía clásica comienzan con la unión de moléculas de reconocimiento, MBL y anticuerpos respectivamente, a patrones moleculares ajenos al organismo, mientras que el inicio de la vía alternativa es "atípico" ya que comienza de manera espontánea, como se explica a continuación, y es rápidamente amplificado o controlado según se produzca sobre superficies foráneas, o sobre superficies propias o en fase fluida, respectivamente. En el presente trabajo se tiene un interés particular por esta vía dado que diversos patógenos, entre los que se incluye *E. granulosus*, han desarrollado

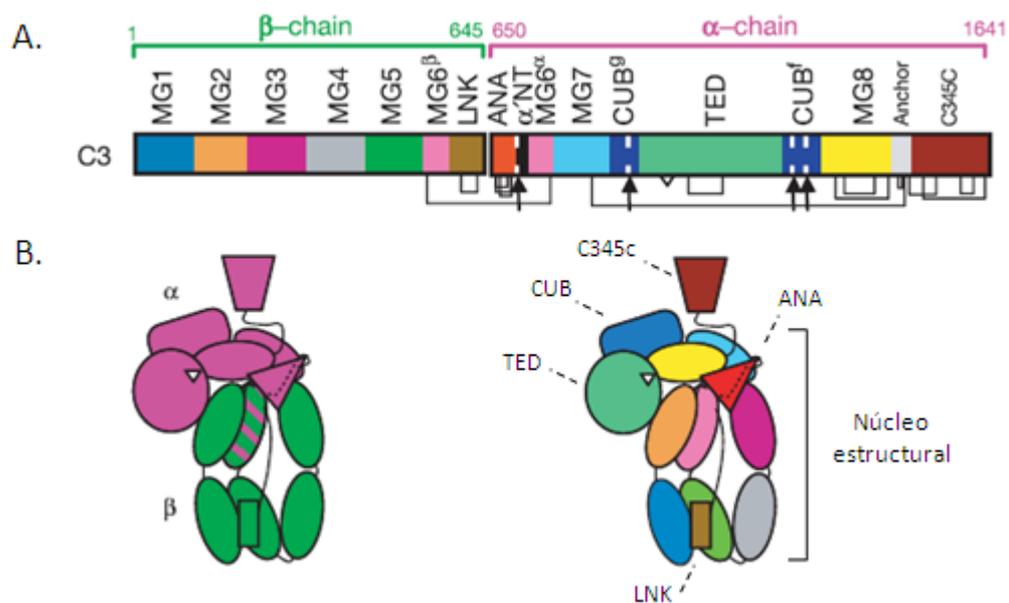
mecanismos de evasión para escapar los efectos de su activación. Como se dijo antes, esta vía comienza de manera espontánea con la hidrólisis del tioéster en C3 produciendo la especie denominada C3(H<sub>2</sub>O). Esta molécula no ha sido activada proteolíticamente y no puede unirse covalentemente a superficies ya que su enlace tioéster ya ha sido hidrolizado [26], pero presenta una conformación alterada respecto a C3, que le permite unirse al factor B [27-28]. El complejo C3(H<sub>2</sub>O)·B es reconocido por la proteinasa Factor D, que cataliza la transformación de B en Ba y Bb. Bb permanece asociado a C3(H<sub>2</sub>O) y genera una convertasa de C3 de fase fluida, (C3(H<sub>2</sub>O)·Bb), que cataliza la conversión de C3 a C3a y C3b. De esta manera se generan moléculas de C3b, que si bien la mayoría son inactivadas por hidrólisis, algunas son capaces de unirse a través de su enlace tioéster a superficies biológicas e iniciar allí la formación de nuevas convertasas de C3 de la vía alternativa (C3b·Bb) asociadas a superficies [18, 29]. Existe un bucle de amplificación dentro de la vía alternativa del sistema complemento debido a que C3b es precursor y producto de la convertasa de C3 de esta vía. Esto hace, además, que el C3 depositado por las otras vías se amplifique por la vía alternativa (Figura 5).

## 1.7 C3: Estructura, Activación e Inactivación

Además de ser el componente central del sistema complemento, C3 es el más abundante en el plasma ( $[C3]_{\text{plasma}} \cong 1300 \mu\text{g/mL}$  [30]). Es una proteína compleja que sufre cambios conformacionales importantes durante su activación e inactivación, ambos eventos debidos a fenómenos de proteólisis específica. Durante estos procesos se generan diversas especies derivadas de C3 con importantes funciones biológicas. C3 es proteolíticamente activado a C3b gracias a la escisión del fragmento N-terminal de 9 kDa conocido como C3a. Este producto es una potente anafilotoxina, que media reacciones de inflamación y extravasación de leucocitos [31]. C3b es la especie activa más importante de C3, y como ya se mencionó, constituye la plataforma para la formación de convertasas de C3 de la vía alternativa así como de las convertasas de C5. Además tiene funciones opsonicas por sí mismo, existiendo receptores fagocíticos para él en células del sistema inmune [18]. Durante su inactivación (detallada en la siguiente sección), C3b sufre proteólisis a iC3b y C3f primeramente, y luego iC3b es cortado generando los fragmentos C3c y C3dg. Este último se fracciona en C3d y C3g gracias a la acción de las enzimas (ajenas al sistema complemento) plasmina, elastina o trombina [32]. Los fragmentos iC3b, C3c y C3dg, además de ser resultado de la inactivación de C3b, se desempeñan como opsoninas [16].

C3 pertenece a la familia de las  $\alpha_2$ -macroglobulinas, grupo que se caracteriza por diversos motivos de secuencia, además de por la presencia de un grupo tioéster. C4 y C5 también pertenecen a esta familia, aunque en el caso de C5 no esté presente el

tioéster [33]. C3 es sintetizado como un precursor de 1663 residuos aminoacídicos (1663 AA, incluyendo la secuencia del péptido líder de 22 AA que luego es removida; la numeración que se utiliza a continuación excluye a este péptido). Dicho precursor es procesado a dos cadenas,  $\alpha$  (residuos 650 – 1641, 991 AA) y  $\beta$  (residuos 1 – 645), unidas entre sí por un enlace disulfuro [34]. La molécula de C3 está formada por 13 dominios; cada cadena se pliega en 6 dominios y el dominio restante está formado por parte de ambas [24]. El núcleo estructural de la proteína está formado por 8 dominios de macroglobulina (dominios MG). Sobre este núcleo se insertan los dominios restantes. El primero de estos insertos se encuentra en los residuos 578 – 745, donde se forman los dominios LNK (del inglés *linker*), que incluye el sitio de procesamiento 646-RRRR-649, y anafilatoxina (ANA). Un segundo inserto en los residuos 912 – 1330 forma los dominios CUB (del acrónimo en inglés *complement C1r/C1s, Uegf, Bmp1*) y TED (del inglés *thioester-containing domain*). Por último, una extensión C-terminal al dominio MG8 da lugar al dominio C345c [35]. (Figura 6)



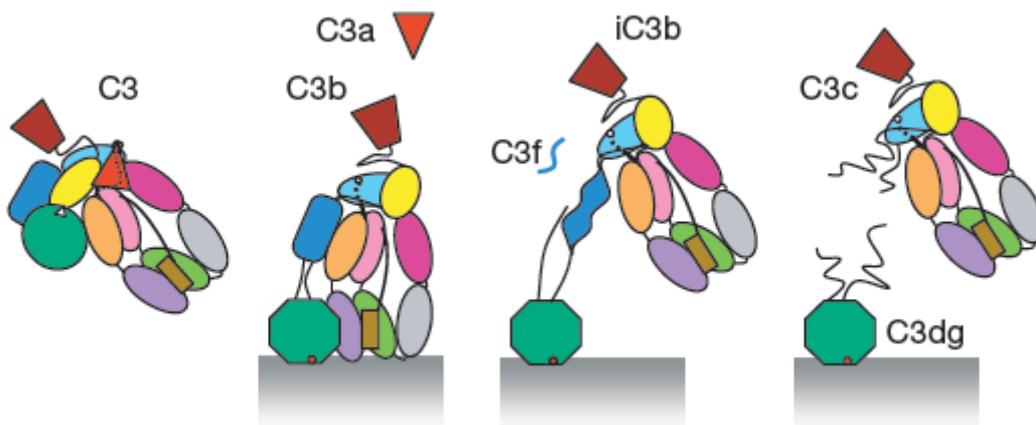
**Figura 6.** Esquema estructural de C3.

**A.** Arreglo secuencial de los dominios de C3. Se indican los sitios de corte específico (flechas negras), enlaces disulfuro (líneas negras) y sitio del tioéster (triángulo blanco). La numeración empleada para los residuos aminoacídicos no incluye al péptido líder.

**B.** Arreglo espacial de los dominios en C3. En la primera representación (izquierda) los dominios de la cadena  $\alpha$  están en rosado y los de la cadena  $\beta$  en verde. En la segunda representación se respeta el código de color utilizado en la parte A. El triángulo blanco representa el sitio del tioéster.

Abreviaciones: MG1-8, dominios macroglobulina 1-8; LNK, dominio *linker*; ANA, dominio anafilatoxina;  $\alpha$ 'NT, extremo N-terminal de la cadena  $\alpha$ '; CUB, dominio *C1r/C1s Uegf Bmp1*; TED, dominio *thioester-containing domain*; Anchor, región que comunica los dominios MG7 y C345c a través de un enlace disulfuro; C345c, extensión C-terminal. Adaptado de [24].

Durante la activación de C3 a C3b por la convertasa de C3, se escinde el dominio ANA correspondiente al fragmento pequeño C3a, lo cual desencadena que el fragmento restante sufra importantes cambios conformacionales (cambios de posición de hasta 95 Å, [35]). Específicamente, la remoción del dominio ANA permite que los dominios MG7 y MG8 giren, y que los dominios CUB y TED queden expuestos. A su vez, rearrreglos en la conformación del resto del fragmento hacen accesibles distintos sitios de interacción con el factor B y proteínas reguladoras que se encontraban ocluidos en la estructura de C3 nativo [35]. Cambios similares, aunque más lentos, ocurren luego de la hidrólisis espontánea del tioéster en C3 generando C3(H<sub>2</sub>O). En este caso los rearrreglos se ven retardados debido a la presencia de C3a aún unida a la molécula [24]. Durante la inactivación de C3b por la acción de factor I y cofactores, se cortan 3 enlaces peptídicos dentro del dominio CUB. Los primeros 2 cortes generan la escisión del fragmento de 2 kDa conocido como C3f, y por otro lado la especie iC3b. Finalmente el tercer corte (sobre iC3b) libera a la especie C3c, mientras que C3dg permanece unido a la superficie. Tanto iC3b como C3c presentan un núcleo estructural similar a C3b, con diferencias en el dominio CUB en el caso de iC3b. Se especula que la unión de los cofactores a C3b inducen en éste un cambio conformacional principalmente en el dominio CUB, que expone los enlaces blanco de factor I [36]. En suma, de esta manera se explica cómo los cambios estructurales resultado de procesamiento proteolítico son capaces de generar especies muy reactivas y biológicamente muy importantes a partir de C3 nativo, y luego de inactivarlas. La Figura 7 muestra un esquema de los cambios conformacionales que sufre C3 durante su activación, y posterior inactivación.



**Figura 7.** Modelo de los cambios conformacionales experimentados por C3 durante su activación e inactivación proteolíticas. De izquierda a derecha: C3 nativo, C3a y C3b (activación mediada por la convertasa de C3), C3f e iC3b, C3dg y C3c (últimas dos etapas son resultado de inactivación mediada por el Factor I + cofactor). Estos cambios conformacionales determinan la afinidad hacia distintos blancos, lo cual influye en la actividad biológica de cada especie. Modificado de [25].

## 1.8 Regulación de la convertasa de C3 de la vía alternativa

Como se mencionó anteriormente, en el caso de las vías clásica o de las lectinas, la activación se da exclusivamente sobre superficies marcadas con anticuerpos específicos o decoradas con carbohidratos ajenos al organismo, restringiendo de esta manera su activación a superficies de patógenos o de células infectadas (Figura 4). En el caso de la vía alternativa, el tioéster expuesto en C3b reacciona rápidamente con grupos nucleofílicos, como ser grupos amino o alcohol, en superficies biológicas cercanas, tanto de patógenos como del propio organismo. La activación potencialmente generalizada de la vía alternativa, además del bucle de amplificación que existe dentro de la misma, genera la imperiosa necesidad de controlar la activación de esta vía exclusivamente sobre superficies propias. Esto requiere de un mecanismo capaz de discriminar entre superficies ajenas y propias, que regule la activación de la vía alternativa sobre las últimas. El mismo mecanismo sería capaz de controlar la activación iniciada por otras vías, gracias a la interconexión que existe entre las tres principalmente a nivel de generación de C3b.

La convertasa de C3 de la vía alternativa (C3bBb) es un complejo termodinámicamente inestable, con lo cual la regulación de la activación de esta vía se da a través de activadores o inhibidores que estabilizan o desestabilizan la convertasa recién formada. El complejo C3bBb puede ser estabilizado por la asociación con properdina (P), generando el complejo C3bBbP [37-38]. Esta proteína fue descubierta en 1954 por Pillemer, pero su papel en la vía alternativa del complemento no fue aceptado por la comunidad científica hasta fines de los años 1960s cuando Pensky *et al.* demostraron rigurosamente que se trataba de una proteína plasmática distinta de las inmunoglobulinas [39-40]. En condiciones fisiológicas, este regulador interacciona débilmente con C3b unido a superficies biológicas. Esta interacción se ve fortalecida en presencia de factor B, y más aún cuando el complejo C3bBb está unido a superficies biológicas [41-42].

La convertasa puede ser regulada negativamente de dos maneras: interfiriendo con la interacción no covalente entre C3b y factor B (inhibiendo la unión entre C3b y factor B o acelerando la disociación de complejos C3bBb ya formados), o inactivando proteolíticamente a C3b, generando como ya se mencionó, iC3b [43]. El primer tipo de regulación negativa es llevado a cabo por moléculas reguladoras con afinidad por C3b, y constituye un mecanismo reversible de regulación, ya que luego de disociados, los componentes se pueden re-ensamblar en una nueva convertasa. El segundo tipo es un mecanismo de regulación irreversible, llevado a cabo por la proteasa específica Factor I en presencia obligada de cofactores.

El factor I (aproximadamente 88 kDa) es una proteasa de serina plasmática inusual, en el sentido de que circula en su forma activa y no presenta ningún inhibidor endógeno. Aún así presenta una especificidad de sustrato muy elevada hacia C3b y

C4b, a los que ataca únicamente en presencia de cofactores [26, 44]. Esta aparente paradoja se resuelve al constatar que sus sustratos son complejos que se forman de manera transitoria (complejos C3b- y C4b-cofactor), por lo que su actividad *in vivo* está regulada por la disponibilidad de sustrato [44].

Existen cofactores de factor I tanto en fase soluble como asociados a membranas. En fase soluble se encuentra el factor H (del cual se hablará más en detalle en la siguiente sección) y la C4bBP (del inglés *C4b-binding protein*), mientras que el receptor de complemento tipo 1 (CR1 o CD35) y la MCP (del inglés *membrane cofactor protein*, también conocida como CD45) se encuentran asociados a membranas. Todos ellos, excepto MCP, presentan actividad disociadora de convertasas además de su actividad como cofactores de factor I. A diferencia de MCP, la glicoproteína de superficie DAF (del inglés *decay-accelerating factor*) actúa como disociador de convertasas y no se desempeña como cofactor de factor I. Todas estas moléculas, incluida DAF, están formados exclusivamente por repeticiones de la misma unidad estructural llamada módulo CCP (del inglés *complement control protein*), con lo cual se las considera evolutivamente emparentadas [26].

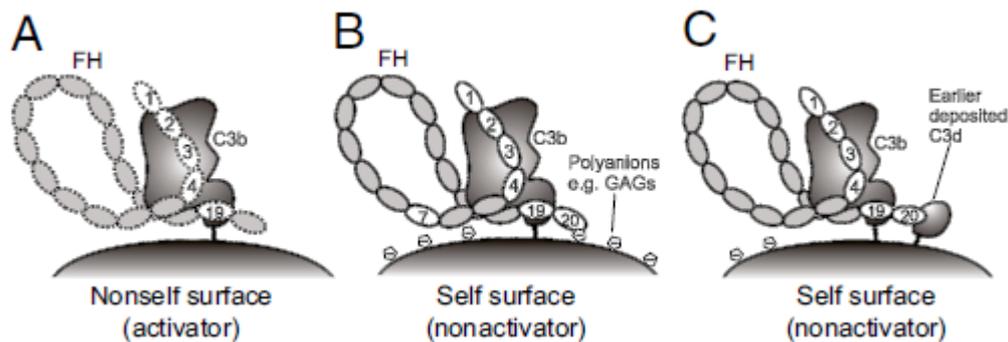
## 1.9 Factor H

Como se mencionó en la sección anterior, el factor H es un cofactor soluble de factor I. Estructuralmente se trata de una glicoproteína monomérica de 155 kDa, compuesta por 1213 AA organizados en 20 módulos CCP. Cada CCP consiste en aproximadamente 60 AA dispuestos en una estructura compacta con predominio de hoja  $\beta$ . Entre éstos se encuentran 4 cisteínas conservadas que se asocian en 2 enlaces disulfuro, ayudando a la estructura compacta de los dominios [45-46]. Además de los cofactores de factor I y de DAF, otras proteínas del sistema complemento presentan dominios CCP, como ser factor B, C6, C7, C1r y C1s. Fuera del sistema complemento se han encontrado dominios CCP en el receptor de interleuquina 2, en la cadena B del Factor XIII de coagulación y en las proteínas de superficie celular selectinas L, P y E [47]. En el factor H, los 20 dominios CCP se disponen como un “collar de cuentas” formando una estructura extendida de 77 – 87 nm de longitud en solución [48], muy flexible con la capacidad de plegarse sobre sí misma [49].

El factor H se une selectivamente a sitios con alta densidad de carga negativa, lo cual le confiere la capacidad exclusiva de distinguir entre superficies activadoras y no activadoras de la vía alternativa del complemento, y de esta manera cumple un rol esencial en la discriminación entre superficies propias y ajenas. Evidenciando el papel del factor H en esta discriminación, se sabe que tanto el ácido siálico presente en la superficie de eritrocitos, como los glicosaminoglicanos de las células endoteliales,

ayudan a que estas células no disparen la vía alternativa del complemento al aumentar la unión de factor H sobre sus superficies [50-51].

Las actividades de regulador de la convertasa y de discriminación entre superficies propias y ajenas de factor H son mediadas por dominios estructuralmente distanciados en la molécula. Los CCPs 1 a 4 son esenciales para las actividades de cofactor de factor I y de disociación de convertasas [52-53], y por lo tanto unen a la molécula de C3b, mientras que los CCPs 19 y 20 son responsables de las interacciones que posibilitan la discriminación entre superficies activadoras y no activadoras. Estos últimos unen glicosaminoglicanos [54] y el ácido siálico [55] (es decir que tienen sitios con afinidad por polianiones), y unen además C3d que se encuentra unido a superficies [56]. Esta molécula ayuda en el reconocimiento de superficies no activadoras, ya que es el producto de inactivación de C3b que permanece unido a la superficie. Conciliando ambas actividades en la misma molécula, Kajander *et al.* [57] proponen un modelo de acción para el factor H que se resume en la Figura 8.



**Figura 8.** Modelo de la regulación del sistema complemento mediada por Factor H

**A.** Unión débil sobre superficies foráneas permite la activación del sistema.

**B.** Unión fuerte a glicosaminoglicanos y a C3b sobre células propias posibilita la regulación.

**C.** Unión fuerte a C3d previamente depositado y a C3b sobre células propias conduce a la regulación.

Tomado de [57].

Como se mencionó anteriormente, la iniciación del complemento se ve fuertemente controlada sobre superficies endógenas. En esta tarea, factor H y C4bBP juegan un papel esencial, al asociarse sobre estas superficies y conferirles protección. Muchas superficies endógenas, como ser la matriz extracelular o células apoptóticas, presentan componentes capaces de unir C1q y activar el complemento a través de la vía clásica. Sin embargo, sobre ellas se unen asimismo factor H y C4bBP, que regulan la activación suscitada, permitiendo así que C3b, iC3b y C4b actúen como opsoninas, colaborando en particular a la remoción de células apoptóticas, pero controlando las cantidades de C5a y MAC generadas de forma de que no se produzca un estado de inflamación excesivo [58].

## 1.10 La Capa Laminar y el Complemento

Como ya se ha comentado antes, la hidatidosis es una enfermedad crónica en la que se desarrollan hidátides (antigénicas) que pueden alcanzar gran tamaño dentro del parénquima de órganos internos, sin la generación de una respuesta inflamatoria sistémica. En el entorno próximo a las hidátides se pueden observar diversas respuestas; desde una reacción granulomatosa severa, hasta una cápsula de colágeno no infiltrada resultado de la resolución de la inflamación [59], según el grado de adaptación que exista entre hospedador y parásito, como ya se explicó. En las etapas pre-quísticas, *E. granulosus* suscita una respuesta inflamatoria local, con activación del sistema complemento principalmente a través de la vía alternativa, y reclutamiento de eosinófilos [60]. Estudios sobre la magnitud y evolución de la respuesta inmune suscitada por *E. granulosus* en infecciones secundarias en un modelo de ratón confirmaron lo que observaciones histológicas previas habían inferido: existe una correlación inversa entre la sobrevivencia del parásito y la magnitud de la respuesta inflamatoria suscitada por el mismo, generando hidátides fértiles aquellas infecciones en las que se resuelve la inflamación en etapas tempranas. Se observó además que los protoscolecidos pierden la capacidad de activar el sistema complemento al diferenciarse en hidátides, y que un control de la activación de este sistema es esencial para lograr la antedicha resolución de la inflamación [11].

Si además se considera que uno de los eventos claves en la diferenciación de los protoscolecidos hacia hidátides es la formación de la pared de la hidátide, específicamente la formación de la LL a partir de secreciones de la GL, es de suponer que esta última estructura juega un papel en la regulación de la respuesta inmune hacia el parásito, especialmente en lo que respecta a la activación del sistema complemento. De hecho, al comparar la capacidad de activar el sistema complemento de distintos extractos de *E. granulosus* se encuentra que el correspondiente a la pared de la hidátide es significativamente menos activador que los correspondientes al líquido hidático y a protoscolecidos. Esta diferencia en el grado de activación del sistema complemento de los diversos extractos es más marcada a nivel de los pasos terminales de la cascada [61].

En conjunto, estas observaciones sugieren que existe un mecanismo de inhibición de la activación del sistema complemento en la LL actuando en particular sobre las etapas iniciales de la cascada. Una estrategia posible para llevar a cabo dicha inhibición consiste en el secuestro sobre la LL de factor H. Esta estrategia es empleada por diversos patógenos, entre los que se destacan las bacterias de la familia *Neisseria* [16]. Apoyando esta hipótesis, se encontraron cantidades significativas de factor H unido fuertemente a extractos de paredes de hidátides de origen bovino. Esta unión es cualitativamente distinta a la unión de albúmina sérica al mismo material (tomada como un indicador de contaminación pasiva con proteínas del hospedador):

contrariamente al caso de la albúmina, el factor H es disociable en su totalidad solo mediante la adición de soluciones de alta fuerza iónica. Esto sugiere que el factor H se une a través de interacciones electrostáticas. Los extractos de paredes de hidátides bovinas estudiadas presentaron actividad de cofactor de factor I, la cual era enteramente atribuible a la actividad de factor H del hospedador unido a la LL [62].

Como se recordará de la sección anterior, los ligandos de factor H conocidos se caracterizan por presentar superficies cargadas negativamente. En el caso de la LL de *E. granulosus*, los motivos moleculares responsables de unir factor H no han sido elucidados. Aunque a primera vista, por su naturaleza polianiónica, el  $\text{InsP}_6$  sería un candidato a desempeñar esta función, estudios más recientes demostraron que este no es el caso [63]. De hecho, la remoción de los depósitos de  $\text{InsP}_6$  cálcico no parece alterar la velocidad de inactivación de C3b sobre la LL, ni revierte la pobre capacidad activadora de la LL. Más aún, los depósitos de esta sal proporcionan sitios de iniciación para la cascada (posiblemente a través de la vía clásica, gracias a la adsorción de C1q), que luego es eficientemente inhibida en pasos subsiguientes incluyendo en particular al bucle de amplificación a través de la vía alternativa [63]. El patrón de activación de la vía clásica del complemento por unión directa de C1q, seguido por control a nivel de la convertasa de C3, es reminiscente de la situación en la matriz extracelular propuesta por Sjoberg *et al.* a la cual se hacía referencia en la sección anterior. No obstante, no se excluye la posibilidad de que, además, se produzca activación del sistema complemento a través de la unión de anticuerpos a la LL. De hecho, la presencia de IgM asociada a la LL [11] hace muy probable esta posibilidad.

Con la información anterior se puede inferir, por defecto, que el componente de la LL responsable de unir factor H son las mucinas. Los carbohidratos que las componen son neutros [8-9], por lo cual no constituyen buenos candidatos para unir factor H. Las apomucinas en cambio, a pesar de estar fuertemente glicosiladas y por ello gran proporción de las mismas encontrarse inaccesibles para el factor H, presentan como ya se mencionó extremos cortos no glicosilados, uno de los cuales incluye residuos de tirosina potencialmente sulfatados (Figura 4) que bien podrían proveer el entorno aniónico necesario para unir dicho regulador del complemento.

En suma, los datos revelan que durante las etapas pre-quisticas de *E. granulosus* éste suscita una respuesta inflamatoria en el hospedador, con activación del sistema complemento a través de la vía alternativa principalmente [60]. Luego de la diferenciación a hidátides, la exposición de la LL en la interfaz entre hospedador y parásito representa una barrera física para las células del sistema inmune y a su vez, inhibe la activación del sistema complemento, presuntamente a través del secuestro de factor H. Dentro de los componentes de la LL, se sabe que los depósitos de  $\text{InsP}_6$  no proporcionan sitios de unión a factor H. Tampoco son candidatos obvios a unir factor H los carbohidratos de las mucinas, gracias a su carácter neutro. Se infiere

entonces que más probablemente el motivo molecular responsable de la unión de factor H a la LL de *E. granulosus* esté en el componente proteico de las mucinas. Específicamente, el extremo N-terminal no glicosilado con tirosinas en un contexto favorable para la sulfatación de la apomucina EGC0000317, es un candidato probable para desempeñar esta función.

## 2. Objetivos

Visto y considerando lo anterior, si bien se cuenta con candidatos probables para unir factor H sobre la LL de *E. granulosus*, aún resta determinar la naturaleza bioquímica del sitio con afinidad para el factor, así como la relevancia del mismo en la evasión de la activación del complemento por este parásito.

En este sentido, en proyecto de Iniciación en la Investigación recientemente aprobado por ANII, se propuso investigar la naturaleza (peptídica o glucídica) del sitio con afinidad por factor H en la LL de *E. granulosus* mediante el análisis de la unión *in vitro* de factor H humano a LL nativa, en comparación con la unión a LL con modificaciones controladas en alguno de sus componentes. Estas modificaciones incluyen la digestión de los extremos no glicosilados de las mucinas y/o la destrucción de los residuos monosacáridos terminales de los glicanos, combinadas con la preservación o remoción de los depósitos de  $\text{InsP}_6$  cálcico. Además, un análisis del grado de activación provocado por la LL nativa en comparación con la LL modificada, podría proveer datos funcionales sobre el papel que juega el factor H en el mecanismo de evasión de la activación de complemento de *E. granulosus*.

Para la implementación de dichos experimentos era necesario el desarrollo de metodologías que permitieran evaluar tanto la unión de factor H a LL como el depósito y posterior inactivación de C3 sobre LL durante la activación del complemento *in vitro*. El foco del presente trabajo es la puesta a punto de dichas metodologías.

Objetivos específicos:

- 1) Generación de herramientas para el estudio de la unión *in vitro* de factor H humano a la capa laminar
- 2) Puesta a punto de un sistema experimental para el análisis del depósito e inactivación de C3 a partir de suero humano normal *in vitro* sobre capa laminar control y modificada.

## 3. Materiales y Métodos

### 3.1 Obtención del material de capa laminar

Las hidátides fueron gentilmente cedidas por Gustavo Mougli, del grupo de la Dra. Sylvia Dematteis, Laboratorio de Inmunología. Éstas provienen de infección secundaria experimental intraperitoneal de ratón (hembras, cepa Balb/c, de 6 a 8 semanas de edad) con *Echinococcus granulosus*. Para la infección se utilizaron protoscoíces viables provenientes de hidatidosis natural en ganado bovino uruguayo, por lo cual se especula correspondían a la cepa G1 del parásito (cepa con mayor prevalencia en el país; comunicación personal de la Dra. Sylvia Dematteis). Las hidátides se incubaron en solución amortiguadora Tris/HCl 20 mM, pH 7,4 conteniendo NaCl 135 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM, Tritón X-100 0,1% m/v y NaN<sub>3</sub> 0,05% m/v. La presencia de detergente y azida se utilizó para matar al parásito y desprender la GL de la LL. Las hidátides que presentaban la GL desprendida de la LL visible al ojo se puncionaron con jeringa y se aspiró el líquido hidático junto con las células de la GL. Luego, las LL colapsadas se frotaron sobre un papel de filtro para remover el material fibroso del hospedador (material amarillento), y se cortaron con bisturí en pedazos macroscópicos pequeños. Las LL así divididas se incubaron en la solución amortiguadora inicial durante 30 minutos y luego se lavaron con NaCl 2 M, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM. La suspensión se llevó a un volumen conocido con NaCl 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM, conteniendo NaN<sub>3</sub> 0,05% m/v. Se tomaron 3 alícuotas de 1 mL cada una, prestando especial atención a homogeneizar antes de cada toma, que se pasaron a tubos de 1,5 mL previamente pesados. Las LL en cada tubo se lavaron con agua destilada 4 veces, se las llevó a un volumen aproximado de 400 µL, se congelaron a -70°C, se liofilizaron y pesaron. Se determinó entonces la masa seca de LL en cada tubo como la diferencia entre los pesos finales e iniciales. Con estos datos se determinó la concentración, en mg de masa seca de LL por mL, de la suspensión original, como el promedio de las tres medidas obtenidas. La definida entonces como “suspensión stock” de LL tiene una concentración de 12,4 mg de masa seca de LL por mL. Esta suspensión se conservó a 4°C hasta su utilización.

### 3.2 Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA)

Para concentrar las proteínas de diversas muestras previo a análisis por SDS-PAGE (ver siguiente sección), se las precipitó mediante el agregado de TCA al 10% (v/v final) durante 30 minutos en hielo. Luego se centrifugó a 10000 g durante 15 minutos, en lo posible a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1 mL de acetona fría. Se agitó en *vórtex* y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Se descartó nuevamente el sobrenadante y se dejó evaporar el remanente de acetona. El material

precipitado se resuspendió en un volumen apropiado de amortiguador de muestra 2X de SDS-PAGE y se conservó a -20°C.

### 3.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) se realizó de acuerdo a lo descrito en (Laemmli, 1970 [64]). Se emplearon geles concentradores al 3% m/v y geles separadores de porcentajes de acrilamida variables (de 7 a 10% m/v) según el ensayo, todos de 1,5 mm de espesor. Las electroforesis se realizaron en el sistema Mini Protean 3 de Bio-Rad, a 120 V constante y temperatura ambiente. A las muestras disueltas en solución amortiguadora de muestra 2X (Tris/HCl 0,2 M, pH 8, urea 8 M, SDS al 0,2 % m/v, conteniendo azul de bromofenol) se les agregó el reductor ditioneitol (DTT) o el agente alquilante iodoacetamida (IAA), concentraciones finales 20 mM y 10 mM respectivamente, según corresponda a condiciones reductoras o no reductoras, y se calentó a 37°C durante 30 minutos, a menos que se especifiquen otras condiciones. Se utilizaron marcadores de peso molecular *SigmaMarker Wide Range* (6,5 a 200 kDa), o para muestras a ser transferidas para Western blot, *Prestained Molecular Marker* (27 a 180 kDa, Sigma).

### 3.4 Tinción con azul brillante de Coomassie

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

### 3.5 Tinción con nitrato de plata

Para el teñido con nitrato de plata primero se fijaron las proteínas en el gel mediante inmersión secuencial en metanol:ácido acético:agua (50:5:45 v/v) durante 20 minutos, seguido de metanol:agua (50:50 v/v) durante 10 minutos y finalmente agua 10 durante minutos. Luego se sensibilizó con tiosulfato de sodio 0,02% m/v durante 1 minuto, se lavó con agua y se incubó con nitrato de plata 0,1% m/v durante 20 minutos. Se lavó y se bañó en formaldehído 0,04% v/v, carbonato de sodio 2% m/v hasta desarrollo de color. La reacción se detuvo mediante agregado de ácido acético glacial.

### 3.6 Purificación de las muestras de anticuerpos monoclonales MRC OX23 y MRC OX24

Se disponía de dos muestras de anticuerpos monoclonales de ratón bajo la forma de líquidos ascíticos (MRC OX23 y MRC OX24), provenientes de la *MRC Immunochemistry Unit*. Ambos habían sido producidos en los años 1990, y mantenidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  desde entonces.

A la muestra de MRC OX24 (7 mL), que contenía lípidos discernibles visualmente, se le agregó polivinilpirrolidina (PVP) al 3 % m/v concentración final. La mezcla se incubó a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 4 horas, con agitación. Al cabo de este tiempo, la muestra se centrifugó a 17000 g durante 15 minutos. Se descartó el precipitado, y el sobrenadante se sometió a diálisis contra amortiguador fosfato salino (PBS), con una membrana de corte de 12 kDa (Sigma, #D9777-100FT), a  $4^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche.

Para purificar la fracción de IgG de los líquidos ascíticos se utilizó columna empaquetada con *sepharose*-proteína G (Sigma, #P3296), con un volumen de lecho de 3,5 mL (gentilmente cedida por el grupo del Dr. Gualberto González, Laboratorio de Inmunología). Primeramente la columna se trató con glicina/HCl 0,1 M, pH 2,7 hasta que el eluido tuviera un pH de 3 (determinado por papel pH), y luego se equilibró con PBS. A continuación se sembraron las muestras, que habían sido sometidas a diálisis contra PBS en un paso previo. Se recogieron fracciones de 1 mL, midiéndose la absorbancia a 280 nm contra el blanco correspondiente (ver adelante). Se lavó con 1 volumen de columna de PBS, luego con 1 volumen de columna de PBS conteniendo NaCl 0,5 M y finalmente con otro volumen de columna de PBS. Se continuó lavando con PBS hasta obtener una absorbancia a 280 nm menor a 0,01. Se eluyó la muestra por pasaje de solución de glicina/HCl 0,1 M, pH 2,7, y se recogió en fracciones de 1 mL sobre 60  $\mu\text{L}$  Tris base 2 M. Se siguió pasando glicina/HCl 0,1 M, pH 2,7 hasta 1 volumen de columna después de recuperar eluidos con pH aproximadamente 3. Inmediatamente se hizo pasar PBS hasta 3 volúmenes de columna luego de obtener eluidos de pH neutro. En estas fracciones las medidas de absorbancia a 280 nm se hicieron contra un blanco de 60  $\mu\text{L}$  Tris base 2 M en 1 mL solución ácida. Los eluidos se analizaron mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras, junto con una alícuota de la muestra original y de lo no retenido por la columna.

### 3.7 Transferencia semi-seca a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF)

Las membranas de PVDF se humectaron con metanol durante al menos 5 minutos. Luego, los geles de poliacrilamida y las membranas de PVDF se equilibraron con solución de transferencia (Tris base 48 mM, glicina 39 mM, SDS al 0,037 % m/v y

metanol al 20 % v/v en agua) y se dispusieron en el equipo entre papeles de filtro embebidos en la misma solución (en el orden: ánodo/papeles de filtro/gel/membrana/papeles de filtro/cátodo). Las transferencias se realizaron a razón de  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  durante 1,5 – 2 horas a temperatura ambiente. Una vez finalizado el proceso, las membranas se incubaron en solución de bloqueo (PBS conteniendo Tween-20 al 0,1 % m/v) a 4°C durante toda la noche.

### 3.8 *Western blots*

Las membranas se lavaron con 100 mL de solución de lavado (PBS conteniendo Tween-20 al 0,05 % m/v) durante 10 minutos con agitación y se incubaron con IAA 2 mM en solución amortiguadora Tris/HCl 20 mM pH 8,85 en caso de corresponder a muestras preparadas con DTT (ver sección SDS-PAGE), a fin de bloquear posibles grupos tiol. Se incubó con dilución apropiada del primer anticuerpo en solución de incubación (PBS conteniendo Tween-20 al 0,05 % m/v y gelatina al 1 % m/v) a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación. Se realizaron 5 lavados en iguales condiciones que el primero y se incubó con el segundo anticuerpo a temperatura ambiente durante 1,5 horas con agitación. Se realizaron 10 lavados y se reveló mediante agregado de sustrato quimioluminiscente (Sigma, #CPS160-1KT), excepto que se indique otro producto. El tiempo de exposición se detalla en cada figura. Los *blots* se visualizaron en un transiluminador asociado al *software Quantity One* (versión 4.6.2) dentro del equipo *Universal Hood II* de Bio-Rad. En los casos en que así se indique, se realizó la cuantificación de la integral de intensidad sobre área de las bandas obtenidas a través del mismo *software*, definiendo el área de la membrana correspondiente a cada banda y utilizando el método *local background subtraction*. Éste toma como intensidad de fondo la correspondiente al borde del área definida como “banda”, y se lo resta al valor de intensidad medido en cada caso. Estos valores se emplearon para calcular los porcentajes de inactivación de C3b, como el cociente entre la integral de la banda de iC3b sobre la suma de las de iC3b más C3b, para cada tiempo. Los valores se usaron también para calcular C3 total, como la suma de las integrales de las bandas designadas como “1”, “C3b”, “iC3b” y “C3d(g)”, para cada tiempo.

Como estándares se utilizaron, en los casos que así se indica, una muestra de C3 purificado a partir de SHN por el Dr. Álvaro Díaz, una muestra de C3d(g) parcialmente purificado generosamente donado por la Dra. Ana Ferreira, y muestras de SHN obtenidas a partir del sobrenadante de sangre humana que se dejó coagular el mismo día de extracción. Los estándares se conservaron en solución amortiguadora de muestra 2X, en dilución 1/1400, 1/70 y 1/1400 respectivamente, a 4°C hasta su utilización. Se utilizaron además, donde así se indica, muestras de factor H (FH1 y FH2) purificado de SHN generosamente donado por el Dr. Robert B. Sim (MRC

*Immunochemistry*, Oxford). Las mismas se conservaron en pequeñas alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

En el ensayo de verificación de la reactividad de las muestras de MRC OX23 y MRC OX24 (Figura 10), se utilizaron los anticuerpos presentes en líquidos ascíticos antes mencionados, en dilución 1/100 y 1/1000, respectivamente. A continuación se incubó con anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a fosfatasa alcalina (Calbiochem, #401371) en dilución 1/250, durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Para el revelado se agregó una solución de 5-bromo-4-cloro-3'-indolfosfato (BCIP) y *nitro-blue* tetrazolio (NBT) en amortiguador Tris/HCl 100 mM, pH 9,5 conteniendo NaCl 100 mM y  $\text{MgCl}_2$  5 mM (BCIP/NBT). La solución BCIP/NBT se prepara con BCIP al 0,05 % m/v en DMF, NBT al 0,05 % m/v en DMF al 70 % (v/v en agua) y amortiguador, en la relación 0,3:0,6:10 v/v, respectivamente. Una vez desarrollado el color, la reacción se detuvo por pasaje a PBS conteniendo EDTA 2 mM.

En el ensayo de detección indirecta del FH adsorbido sobre LL (Figura 11), se utilizó el anticuerpo monoclonal MRC OX24 presente en líquido ascítico en dilución 1/5000 en un primer paso, seguido por anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Calbiochem, #401353), en dilución 1/5000.

En el ensayo de adsorción in vitro de FH sobre LL (Figura 15), se utilizó el anticuerpo monoclonal MRC OX24 conjugado a biotina (MRC OX24-biotina) en dilución 1/600, seguido por estreptavidina-peroxidasa (Sigma, #S5512) en dilución 1/5000. En este ensayo se utilizó el sustrato quimioluminiscente de Pierce (#34076)

En los ensayos de depósito de C3 sobre LL o zymosán (Figuras 17, 18, 21 y 22), se utilizó en un primer paso anticuerpo policlonal de conejo anti-C3d humano (Dako, #A0063), en dilución 1/1500, seguido por anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (Calbiochem, #401353), en dilución 1/5000. En el ensayo de la Figuras 22 se utilizó el sustrato quimioluminiscente de Pierce (#34076).

### 3.9 Dot blots

Se cortaron tiras de PVDF y se humectaron con metanol. Se sembraron las muestras en un volumen de 2  $\mu\text{L}$  directamente sobre el PVDF y se bloqueó durante 45 minutos aproximadamente. Se realizaron dos lavados de 5 minutos en cantidad suficiente de solución de lavado y se incubó con el primer anticuerpo durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Se realizaron cinco lavados en las mismas condiciones que los anteriores y se incubó con el segundo anticuerpo durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Se realizaron 5 lavados y se reveló mediante agregado de sustrato quimioluminiscente. El tiempo de exposición se detalla en cada figura. Las soluciones de lavado, bloqueo e incubación fueron las mismas que para Western blot.

En el ensayo de la Figura 13, parte A, se utilizó el anticuerpo monoclonal MRC OX23, presente en líquido ascítico así como la especie purificada, en una concentración aproximada de 0,1 µg/mL. En el caso del anticuerpo no purificado, dicha concentración se basó en las estimaciones de la Figura 9, correspondiendo a una dilución 1/1000 del líquido ascítico. Para la especie purificada, la concentración dada se basó en estimaciones de concentración de IgG en los eluidos del pasaje a través de la columna de *sepharose*-proteína G, generadas a partir del gel de la Figura 12, y corresponde a una dilución 1/150 del mismo. En un segundo paso se utilizó anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Calbiochem, #401253) en dilución 1/5000. En la parte B del mismo ensayo, se utilizó el anticuerpo monoclonal MRC OX23 presente en líquido ascítico así como la especie purificada y conjugada a biotina (MRC OX23-biotina), ambos en una concentración aproximada de 1 µg/mL. Según las estimaciones de la Figura 9, dicha concentración corresponde a una dilución 1/100 del líquido ascítico. En el caso de la especie purificada y marcada, la concentración se estimó a partir de medidas de absorbancia a 280 nm del eluido, suponiendo que existieron pérdidas del 25 % de la masa de IgG durante el proceso de concentración y marcado, y corresponde a una dilución 1/100. En un segundo paso se utilizó anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Calbiochem, #401253) en dilución 1/5000. Finalmente en la parte C, se utilizaron los anticuerpos T1024 conjugado a biotina (anticuerpo monoclonal anti-S100A8/A9 humanas, de BMA Biomedicals AG, #T-1024) y MRC OX23-biotina, ambos en una concentración (aproximada en el caso de MRC OX23-biotina) de 1 µg/mL. En un segundo paso se incubó con estreptavidina conjugada a peroxidasa (MP, #623441), en dilución 1/5000. En los tres casos se reveló con sustrato quimioluminiscente (Sigma, #CPS160-1KT).

En el ensayo de la Figura 14, parte A, se utilizó estreptavidina conjugada a peroxidasa (MP, #623441) en dilución 1/5000. En la parte B del mismo ensayo, se utilizó el anticuerpo MRC OX24-biotina en una concentración de 1 µg/mL (basada en medidas de absorbancia a 280 nm del eluido de la columna de *sepharose*-proteína G, considerando la dilución por efecto de diálisis posterior), seguido por anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Calbiochem, #401253) en dilución 1/5000. En la parte C se utilizó nuevamente el anticuerpo MRC OX24-biotina en una concentración de 1 µg/mL, seguido por estreptavidina conjugada a peroxidasa (Sigma, #S5512) en dilución 1/5000. Se reveló con sustrato quimioluminiscente (Sigma, #CPS160-1KT en las partes A y B, y Pierce, #34076 en la parte C).

### 3.10 Tratamiento de la capa laminar con pronasa y su control

Se tomaron muestras equivalentes a 0,45 mg de masa seca de LL a partir de la suspensión *stock* y se lavaron con solución amortiguadora Tris/HCl 20 mM, pH 8,

conteniendo  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM para preservar la integridad de los depósitos de  $\text{InsP}_6$  en la LL [63]. A cada una de ellas se la llevó a un volumen final de 30  $\mu\text{L}$  con la misma solución, logrando una concentración de 15 mg de masa seca de LL por mL. Para digestión con pronasa, las muestras se incubaron a 37°C en estufa durante toda la noche con 30  $\mu\text{L}$  de solución de pronasa (Sigma, #P5147-1G), que alcanzó una concentración final en la mezcla igual a 0.125 mg de enzima/mL (a menos que se especifique otra concentración). Finalizada la incubación, se pasaron a baño de hielo y se les agregó 30  $\mu\text{L}$  de la solución amortiguadora inicial. En el tratamiento control, las muestras se incubaron toda la noche a 37°C con 30  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora. Finalizada esta etapa, se pasaron a baño de hielo y se les agregó 30  $\mu\text{L}$  de solución de pronasa (Sigma, #P5147-1G), correspondiente a la misma masa de enzima agregada en un paso anterior a la muestra tratada para digestión enzimática. Luego, las muestras digeridas y control se lavaron por decantación con NaCl 2 M,  $\text{CaCl}_2$  0,5 mM y/o con  $\text{VBS}^{++}$  (amortiguador veronal salino, conteniendo  $\text{Ca}^{2+}$  0,15 mM y  $\text{Mg}^{2+}$  0,5 mM), cada lavado con un cociente de dilución (definido como el volumen de material insoluble decantado, sobre el volumen total de lavado) 1/30. El número de lavados con NaCl 2 M,  $\text{CaCl}_2$  0,5 mM y/o con  $\text{VBS}^{++}$  se detalla para cada experimento en la sección Resultados.

### 3.11 Ensayo fluorogénico para medida de la actividad proteolítica

Se tomaron muestras equivalentes a 0,45 mg de masa seca de LL y se las sometió a proteólisis inespecífica con pronasa o a tratamiento control (ver sección anterior). Las muestras digeridas y control se lavaron por decantación con NaCl 2 M,  $\text{CaCl}_2$  0,5 mM dos veces, con cociente de dilución 1/30 cada uno. Luego, las muestras se lavaron varias veces con  $\text{VBS}^{++}$  (también con cociente de dilución 1/30 en cada paso), midiendo la actividad proteolítica remanente en el sobrenadante de cada lavado. Para ello, 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de cada lavado se sembró en una placa de 96 pocillos para fluorescencia. A cada pocillo se le agregó 100  $\mu\text{L}$  de una solución 50  $\mu\text{M}$  de sustrato fluorogénico N-succinil-alanina-alanina-fenilalanina-7-amido-4-metilcumarina (“AAP-AMC”, Sigma, #S-8758) en amortiguador Tris/HCl 20 mM suplementado con  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM. La fluorescencia (en RFU, del inglés *relative fluorescence unit*) se midió en un lector de placas asociado al *software FluoStar* durante 50 minutos. El cambio de fluorescencia en el tiempo en cada pocillo (en  $\text{RFUs}^{-1}$ ) se tomó (una vez sustraído el valor correspondiente a un control con el sustrato incubado en presencia de amortiguador solamente) como un indicador de la actividad proteolítica remanente en el sobrenadante correspondiente, que se expresó como fracción de la actividad proteolítica generada por una solución de pronasa 0,125 mg/mL (concentración alcanzada durante el tratamiento de LL con pronasa).

### 3.12 Ensayos de depósito de C3 sobre la capa laminar

Se tomaron muestras equivalentes a 0,45 mg de masa seca de LL (a menos que se indique otra cantidad). En los casos indicados, se las sometió a proteólisis inespecífica con pronasa o a tratamiento control (ver sección anterior). Finalizados los lavados con VBS<sup>++</sup>, a cada una de las muestras se las llevó a un volumen final de 37,5  $\mu$ L con la misma solución, logrando una concentración de 12 mg de masa seca de LL por mL, y se les agregó 12,5  $\mu$ L de SHN fresco (o congelado por goteo sobre nitrógeno líquido, conservado a -70°C y descongelado en el momento de su utilización). Esto genera muestras correspondientes a 50  $\mu$ L de suspensión de LL en concentración 9 mg de masa seca por mL de VBS<sup>++</sup>, conteniendo SHN en dilución  $\frac{1}{4}$  en el mismo amortiguador. Las mismas se incubaron a 37°C en baño de agua y, al tiempo correspondiente en cada ensayo, se detuvo la reacción por agregado de solución fría de NaCl 2 M, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM y posterior pasaje a hielo. Se realizaron tres lavados con la misma solución, con cociente de dilución 1/30 cada uno, y uno final con Tris/HCl 200 mM pH 8,8 conteniendo NaCl 135 mM y CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM (solución amortiguadora de extracción). Se les agregó 50  $\mu$ L de cloruro de hidroxilamonio 0,375 M en solución de extracción [65], junto con 25  $\mu$ L de proteína recombinante S100A12 en concentración 1 mg/mL (para que actúe como proteína portadora en la precipitación posterior), y se incubaron a 37°C durante 2 horas. Finalizada la incubación, se las agitó en *vórtex* y se las dejó decantar a temperatura ambiente. Se retiraron 200  $\mu$ L de cada sobrenadante y se precipitó con TCA (ver "*Precipitación con ácido tricloroacético*"). Los precipitados obtenidos se resuspendieron en 20  $\mu$ L de solución amortiguadora de muestra 2X de SDS-PAGE. La mitad (10  $\mu$ L) de cada muestra se sembró en un carril de SDS-PAGE, de manera que corresponde al C3 depositado sobre 225  $\mu$ g de masa seca de LL. Luego se transfirió a PVDF y se analizó por Western blot.

### 3.13 Ensayo de depósito de C3 sobre Zymosán

Se partió de una suspensión madre de zymosán en VBS<sup>++</sup> conteniendo EDTA 10 mM, de concentración 10 mg masa seca/mL, provista por la Dra. Ana Ferreira. De ella se tomó una alícuota de 400  $\mu$ L que se lavó 3 veces con VBS<sup>++</sup>, cada lavado con cociente de dilución 1/15, de forma de lograr que la suspensión tenga una concentración final de EDTA menor a 5  $\mu$ M (concentración insuficiente para quelar el calcio presente en el amortiguador). Se tomaron muestras de esta suspensión equivalentes a 0,45 mg de masa seca de zymosán, y se llevó a cada una a un volumen final de 37,5  $\mu$ L con VBS<sup>++</sup>. A partir de esta etapa se procedió de la misma manera que para los ensayos de depósito de C3 sobre LL (ver sección anterior).

### 3.14 Ensayos de adsorción *in vitro* de factor H sobre la capa laminar

Se tomaron muestras equivalentes a 0,45 o 4,5 mg de masa seca de LL, según se indique en cada caso, y se las sometió a proteólisis inespecífica con pronasa o a tratamiento control (en el caso de muestras equivalentes a 4,5 mg de masa seca de LL, los volúmenes indicados en el protocolo de tratamiento con pronasa y su control se aumentaron 10 veces, respetándose las concentraciones finales). Finalizados los lavados con VBS<sup>++</sup>, a cada una de las muestras se la llevó al volumen adecuado para alcanzar concentraciones de 12 mg de masa seca de LL por mL en el mismo amortiguador (37,5 y 375  $\mu$ L en cada caso). A cada una se le agregó además SHN inactivado en baño de agua a 56°C durante 30 minutos. El volumen agregado en cada caso fue el necesario para alcanzar una suspensión final de 9 mg de masa seca de LL en VBS<sup>++</sup>, conteniendo SHN inactivado en dilución  $\frac{1}{4}$  en el mismo amortiguador. Las muestras se incubaron en baño de agua a 37°C durante 2 horas. La reacción se detuvo por pasaje a hielo. Luego, las muestras se lavaron por decantación con Tris/HCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM, pH 7,4 suplementado con concentraciones variables de NaCl, según se indica en cada ensayo, con cociente de dilución 1/30 en cada paso de lavado. Acabados los lavados, se ajustó el volumen de la suspensión de forma de mantener la concentración de LL en 12 mg de masa seca por mL. Finalmente, se agregó 25  $\mu$ L por muestra de proteína recombinante S100A12 en concentración 1 mg/mL (para que actúe como portador en la extracción y precipitación posteriores), junto con solución de NaCl y CaCl<sub>2</sub> en concentración final 1,8 M y 0,45 mM, respectivamente, para disociar los componentes adsorbidos sobre la LL. Se retiraron 700  $\mu$ L del sobrenadante de cada muestra y se precipitaron con TCA (ver "Precipitación con ácido tricloroacético"). Cada uno de los precipitados obtenidos se resuspendió en 20  $\mu$ L de solución amortiguadora de muestra 2X de SDS-PAGE. La mitad de cada muestra (10  $\mu$ L) se sembró en un carril de SDS-PAGE, de manera que corresponde a lo adsorbido sobre 225  $\mu$ g o 2,25 mg de masa seca de LL, según la masa inicial de cada muestra. Luego se transfirió a PVDF y se analizó por Western blot.

## 4. Resultados

De acuerdo a los objetivos específicos de este trabajo, la sección Resultados se divide en dos partes:

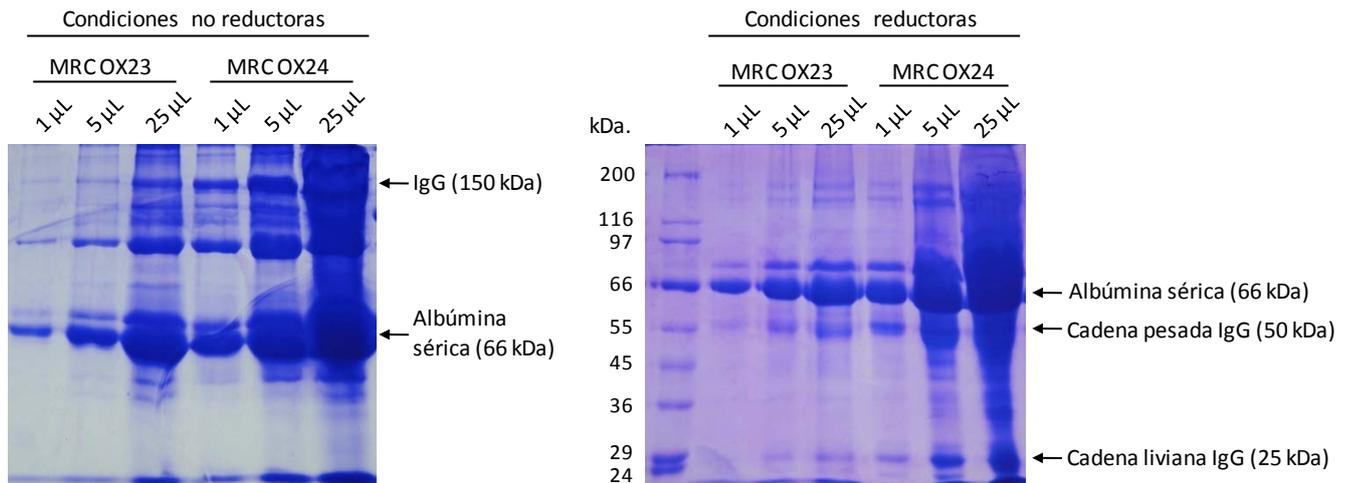
1) Generación de herramientas para el estudio de la unión *in vitro* de factor H humano a la capa laminar.

2) Puesta a punto de un sistema experimental para el análisis del depósito e inactivación de C3 a partir de SHN *in vitro* sobre capa laminar control y tratada.

### 4.1 Generación de herramientas para el estudio de la unión *in vitro* de factor H humano a la capa laminar

#### 4.1.1 Análisis de las muestras de anticuerpos monoclonales contra factor H humano, MRC OX23 y MRC OX24

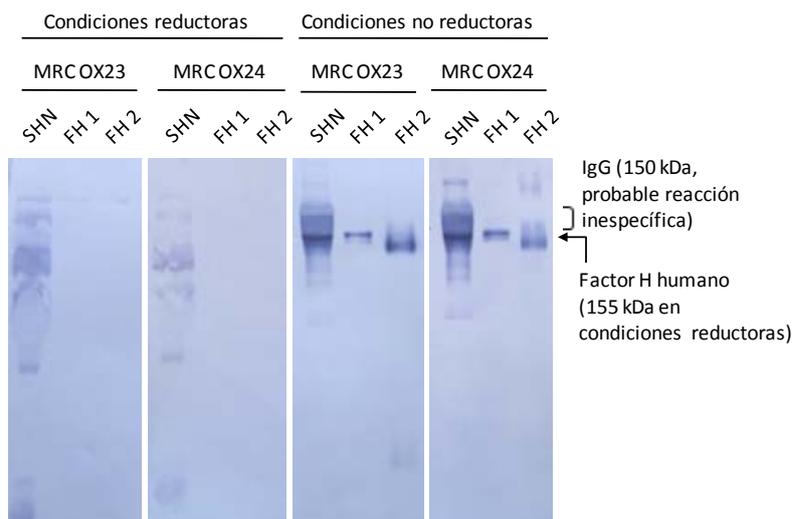
Si se desea evaluar la existencia de un sitio proteico con afinidad para factor H dentro de la LL, el primer paso más directo es estudiar la unión *in vitro* de factor H humano a LL. Para llevarlo a cabo es necesario desarrollar un sistema de detección para factor H humano en las condiciones de trabajo, prestando especial atención a la sensibilidad requerida y a las posibles interferencias que el sistema de estudio pueda presentar. Como se explica en la sección Materiales y Métodos, se cuenta con hidátides provenientes de infección experimental intraperitoneal de ratón, con lo cual la LL de trabajo estuvo en íntimo contacto con el medio interno murino y probablemente presente asociadas proteínas del hospedador, especialmente inmunoglobulinas, incluyendo aquellas unidas por interacción específica (y fuerte) a la LL. Estas proteínas pueden representar una interferencia al momento de examinar la presencia de factor H sobre la LL con un anticuerpo de origen murino. Esto es relevante porque al comienzo de este trabajo se disponía, en cuanto a reactivos para detección de factor H (FH) humano, de muestras de anticuerpos monoclonales de ratón (MRC OX23 y MRC OX24) bajo la forma de líquidos ascíticos, provenientes de la *MRC Immunochemistry Unit*, producidos en los años 1990, y mantenidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  desde entonces. Las mismas se analizaron mediante SDS-PAGE (Figura 9), análisis en el que no se observó una degradación generalizada de las proteínas sino bandas definidas, lo cual indica que las muestras se han conservado bien en dichas condiciones. Asimismo, la nitidez de las bandas correspondientes a inmunoglobulina G (IgG) observables sobre todo bajo condiciones reductoras, sugieren que las muestras tienen efectivamente un componente importante de IgG monoclonal. Como era de esperarse para muestras de líquidos ascíticos, se encontró gran cantidad de proteína distinta de IgG (especialmente albúmina sérica). Esta característica hace que las muestras no sean buenas candidatas para marcado de la IgG en ellas sin un paso previo de purificación.



**Figura 9. Análisis por SDS-PAGE de las muestras de MRC OX23 y MRC OX24 bajo forma de líquidos ascíticos**  
 Las muestras de anticuerpos monoclonales habían sido mantenidas congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  desde su extracción (en 1991 y 1988 respectivamente). Las muestras se descongelaron y centrifugaron a  $10000g$  durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Los sobrenadantes se analizaron mediante SDS-PAGE al 8.5% p/v de acrilamida en condiciones no reductoras y reductoras, revelándose mediante tinción con *Coomassie Blue*. Cada carril corresponde al volumen indicado de la muestra correspondiente.

La proporción de IgG a proteína total en las muestras, estimable a partir de la Figura 9, es bastante similar en ambas, aunque ligeramente superior para MRC OX24. Según la intensidad de las bandas teñidas con *Coomassie Blue*, se estimaron las concentraciones de IgG en cada muestra en unos  $0,12\text{ mg/mL}$  para MRC OX23 y unos  $3\text{ mg/mL}$  para MRC OX24. Teniendo en cuenta que los volúmenes totales eran  $1,5\text{ mL}$  para MRC OX23 y  $7\text{ mL}$  para MRC OX24, se contaba con cantidades totales aproximadas de  $0,18\text{ mg}$  y  $21\text{ mg}$  de IgG para las muestras de MRC OX23 y MRC OX24 respectivamente.

Una vez verificada la integridad de las muestras y habiéndose estimado groseramente las cantidades de IgG en las mismas, se procedió a verificar la reactividad de los anticuerpos por Western blot contra factor H humano purificado, así como contra el presente en SHN (Figura 10). A primera vista se evidenció que la preparación de las muestras bajo condiciones reductoras inhibe su reconocimiento por los anticuerpos en estudio. Esto era probable, ya que cada uno de los módulos CCP de los que está constituido el factor H posee 2 enlaces disulfuro estructuralmente importantes, y la reducción de éstos puede muy bien destruir los epítopes reconocidos por los monoclonales en cuestión. Este resultado descarta la posibilidad de preparar las muestras en condiciones reductoras, lo que habría sido ventajoso ya que en dichas condiciones el factor H y las IgG tienen migraciones electroforéticas distintas, pudiéndose discriminar la señal proveniente de la interacción entre el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón con los monoclonales unidos a factor H, de la señal proveniente de la unión a las IgG presentes en la muestra de LL.



**Figura 10. Verificación de la reactividad de muestras de anticuerpos monoclonales MRC OX23 y MRC OX24 mediante Western blot**

Se sembró el equivalente a 0.6  $\mu$ L de SHN, así como 200 ng y 225 ng respectivamente de dos muestras de factor H humano purificado (“FH 1” y “FH 2”), preparados en condiciones reductoras y no reductoras. Se analizó por SDS-PAGE al 8,5% p/v de acrilamida. Se transfirió a PVDF y se reveló con los anticuerpos monoclonales MRC OX23 y MRC OX24, seguidos por anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a fosfatasa alcalina y sustrato BCIP/NBT. Otros detalles se indican en Materiales y Métodos.

Con respecto a las muestras de factor H purificado, se puede observar que la muestra “FH2” está ligeramente proteolizada (comparar carriles “FH1” y “FH2” en condiciones no reductoras, para MRC OX23 y MRC OX24, Figura 10), aunque igualmente es reconocida por los dos anticuerpos monoclonales en estudio.

Los enlaces disulfuro presentes en los módulos CCP del factor H le confieren a éstos una estructura compacta que se mantiene durante el tratamiento en condiciones no reductoras, haciendo que en estas condiciones la proteína migre como si tuviera una masa molecular aparente menor a su masa real de 155 kDa. Como se muestra en la Figura 10, bajo condiciones no reductoras el factor H migra inmediatamente por debajo de la IgG (150 kDa), aunque en la muestra de SHN la gran cantidad de esta especie desplaza al factor H ligeramente hacia abajo en comparación a la muestra de factor H purificado (Figura 10, comparar carriles denominados “SHN” y “FH1” para condiciones no reductoras, tanto para MRC OX23 como para MRC OX24).

La Figura 10 muestra también que los anticuerpos monoclonales en estudio interaccionan de forma no específica con las IgG presentes en el SHN. Este resultado puede deberse tanto a interacciones inespecíficas entre la porción Fc de las IgG humanas del SHN con la porción Fc del monoclonal o del anticuerpo anti-IgG de ratón,

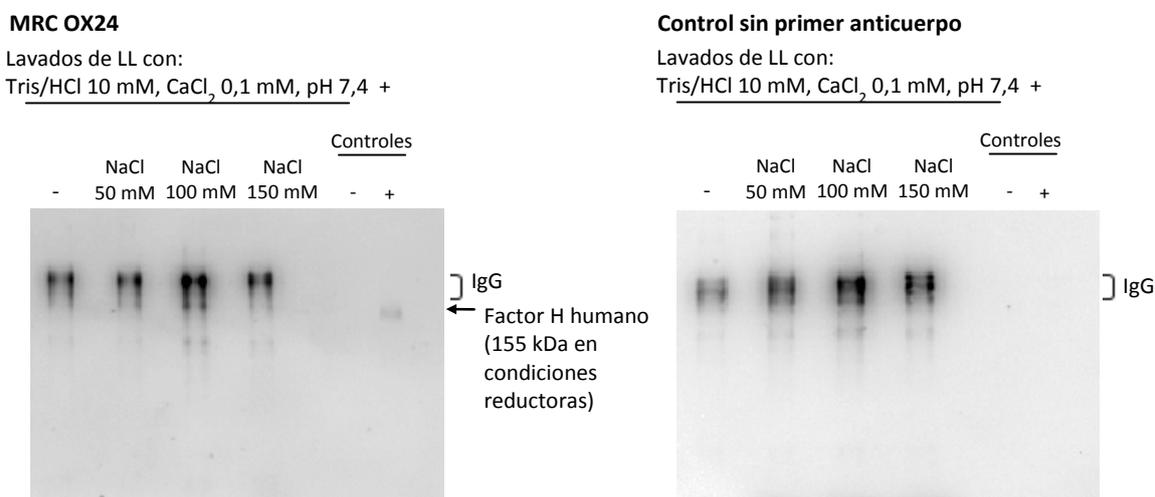
como por reactividad cruzada entre el anti-IgG de ratón empleado como segundo anticuerpo con las IgG humanas en la muestra. Para intentar discernir entre estas posibilidades podría hacerse un control sin incubación con el primer anticuerpo, que de resultar negativo permitiría atribuir la señal inespecífica observada en la Figura 10 a interacciones Fc-Fc entre las IgG humanas del SHN y el monoclonal.

#### **4.1.2 Ensayo de detección indirecta de factor H sobre la capa laminar *in vitro*, utilizando MRC OX24**

Como se mencionó anteriormente, se intenta estudiar la adsorción *in vitro* de factor H humano a LL. El sistema de estudio en concreto consta de LL proveniente de infección experimental intraperitoneal de ratón con *Echinococcus granulosus* finamente dividida, incubada con SHN inactivado en dilución  $\frac{1}{4}$  en VBS<sup>++</sup> a 37°C durante 2 horas. Finalizada la incubación, la LL se lava con soluciones de fuerza iónica baja o fisiológica, y los componentes aún adsorbidos finalmente se recuperan en el sobrenadante de una extracción con fuerza iónica alta (NaCl 2 M, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM). Para analizar la presencia de factor H en este sobrenadante, se intentó primeramente utilizar un sistema de detección indirecto, es decir utilizando anticuerpo de ratón anti-FH humano seguido por anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa. Este método sería el más práctico ya que no implica purificar y marcar el anticuerpo monoclonal anti-FH, si bien presenta el obvio inconveniente, como ya se mencionó, de la reactividad del anticuerpo anti-IgG de ratón utilizado en el segundo paso con las IgG de ratón presentes en la muestra. Sin embargo, se especulaba que las IgG de ratón presentes en la muestra original capaces de desligarse de la LL gracias al lavado con alta fuerza iónica mencionado, ya habrían sido removidas de la LL en la preparación de la suspensión *stock* para lo cual se lavó la LL varias veces con solución de alta fuerza iónica (ver sección Materiales y Métodos).

Es así que se probó detectar con el sistema indirecto antes mencionado el FH adsorbido sobre LL durante incubación *in vitro* con SHN inactivado (Figura 11). Se observó que al disociar los componentes adsorbidos con NaCl 2 M, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM se recuperó una cantidad significativa de IgG (de ratón y/o humana) que interfiere con la detección de factor H. En esta oportunidad no se realizó un control correspondiente a LL sin incubar con SHN, el cual habría permitido establecer si la señal observada proviene de IgG humanas o de IgG de ratón presentes en la muestra. La figura muestra que no se detectó factor H, y este resultado no varió con las distintas fuerzas iónicas empleadas para lavar previamente al paso de disociación con alta fuerza iónica. De todas maneras, debe considerarse que la detección de factor H por este método no fue altamente sensible (el control positivo correspondiente a 25 ng de factor H arroja una banda muy tenue), por lo que si se fuera a aplicar efectivamente, se deberían ajustar las concentraciones de los reactivos empleados.

En suma, los resultados de las Figuras 9, 10 y 11 manifiestan que es necesario realizar la purificación y marcado de los anticuerpos monoclonales para lograr un sistema de detección de factor H adecuado para nuestro sistema de estudio.



**Figura 11. Prueba de detección de factor H humano unido a LL in vitro por sistema indirecto (sin marcar el primer anticuerpo)**

Muestras de LL equivalentes a 0,45 mg de masa seca se incubaron en 50 µL de VBS<sup>++</sup> con SHN inactivado en dilución ¼ durante 2 horas a 37°C en baño de agua. Luego de la incubación, la LL se lavó 3 veces con el amortiguador indicado, suplementado con concentraciones variables de NaCl, también especificadas en la figura. Se liberaron los componentes retenidos sobre la LL por agregado de NaCl 2M, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM, se concentraron por precipitación con TCA, y se sembraron en dos geles SDS-PAGE al 7% p/v de acrilamida en condiciones no reductoras. Se realizó la transferencia a PVDF y se analizó por Western blot. Se incubó con anticuerpo monoclonal MRC OX24 (izquierda) o sin primer anticuerpo como control (derecha). Luego se incubó ambas membranas con anticuerpo anti-IgG ratón conjugado a peroxidasa y se reveló con sustrato quimioluminiscente (30 segundos de exposición). Cada carril corresponde al 20% de cada muestra, es decir al material adsorbido sobre 90 µg de masa seca de LL. "Control negativo" equivale a 35 pg de factor H humano (cantidad equivalente al remanente de factor H en un sistema sin adsorción, calculada a partir de la concentración de factor H en SHN y los cocientes de dilución impuestos durante los lavados realizados). "Control positivo" corresponde a 25 ng de factor H humano.

#### 4.1.3 Purificación de anticuerpos monoclonales MRC OX23 y MRC OX24

Los dos anticuerpos monoclonales son de isotipo IgG1 [66], isotipo por el cual la proteína G de *Staphylococcus aureus* tiene gran afinidad [67]. Se procedió entonces a la purificación de las muestras por pasaje a través de una columna de *sepharose*-proteína G. El análisis de la purificación de la muestra de MRC OX23 (Figura 12, parte A) indica que el procedimiento fue exitoso. Se obtuvo una muestra altamente enriquecida en anticuerpo monoclonal, con la ausencia a nivel de tinción con *Coomassie Blue* de albúmina sérica, principal contaminante en la muestra de partida. En el caso de MRC OX24 (Figura 12, partes B y C), la purificación mostró ser exitosa

también, viéndose un marcado descenso en la presencia de albúmina y la aparente desaparición de las demás bandas presentes en la muestra de partida. Inicialmente, el análisis se realizó bajo nuestras condiciones estándares de reducción (que son condiciones suaves), y en este análisis (parte B) se apreció una banda en el entorno de los 100 kDa que se supuso correspondía a dímeros de cadena pesada de IgG. Para explorar esta hipótesis se repitió el análisis bajo condiciones reductoras más fuertes (Figura 12, parte C), y se encontró que la banda en cuestión desaparecía y sólo se observaban las dos bandas esperadas correspondientes a la cadena pesada y liviana de IgG, 50 kDa y 25 kDa respectivamente. Este ensayo descartó la posibilidad de que la banda problema fuera una proteína contaminante co-purificada con el anticuerpo durante el pasaje por la columna, confirmando la suposición anterior de que correspondiera a dímeros de la cadena pesada de IgG. Cabe destacar que el análisis de la purificación de los anticuerpos monoclonales MRC OX23 y MRC OX24 hace notar la distinta naturaleza de ambas moléculas: si bien ambas son IgG1, MRC OX24 es más resistente a la reducción y más propenso a la formación de dímeros bajo las condiciones de estudio.

Con las medidas de absorbancia a 280 nm de la muestra inicial y de las fracciones eluidas de MRC OX24 se calculó que se recuperaron 2,5 mg de IgG a partir de 59,5 mg de proteína total. Como de la muestra original de MRC OX24 se sembraron 1,3 mL de los 7 mL totales (y por lo tanto según la estimación grosera realizada a partir del gel de la Figura 9 se sembraron unos 4 mg de IgG), se recuperó aproximadamente el 63 % de la IgG en la muestra.

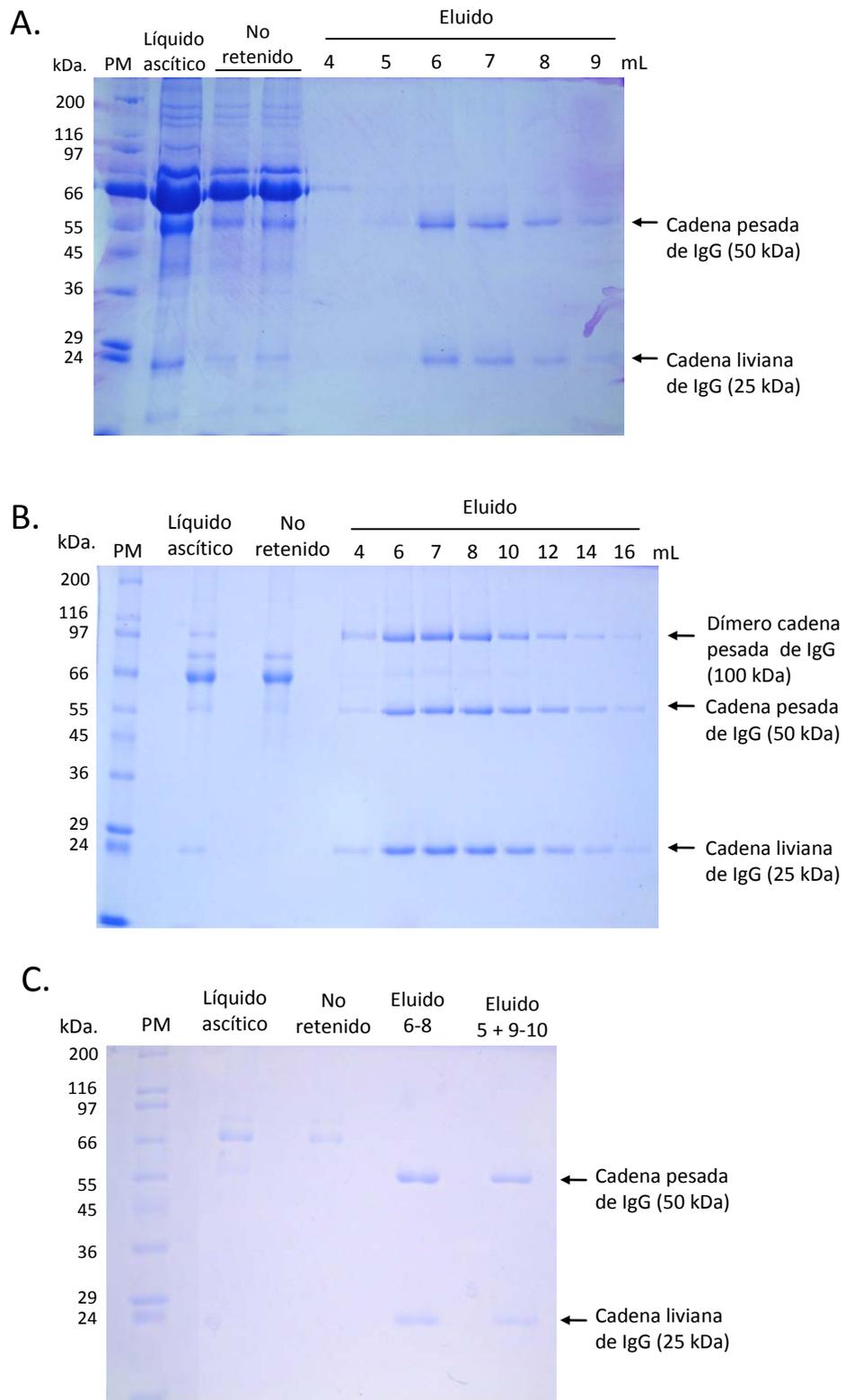
**Figura 12. Purificación de anticuerpos monoclonales anti-factor H humano MRC OX23 y MRC OX24**

Las muestras de anticuerpos monoclonales se hicieron pasar a través de una columna de *sepharose*-proteína G. Se recogió lo no retenido por la columna, se lavó la misma y se eluyó mediante agregado de amortiguador ácido. El eluido se recogió en fracciones de 1 mL. Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE al 10% p/v de acrilamida en condiciones reductoras. El carril “Líquido ascítico” corresponde a 1 µL de cada material inicial sembrado en la columna (correspondiente a un total de 1,5 mL en el caso de MRC OX23 y 7 mL en el de MRC OX24). Los carriles “No retenido” corresponden a 1 µL del material no retenido por la columna. El número que designa cada fracción de eluido refiere al volumen de elución (en mL) contado a partir del comienzo del agregado de amortiguador ácido.

**A. Purificación de MRC OX23.** Los carriles “Eluido” equivalen a 200 µL de cada fracción, concentrados por precipitación con TCA.

**B. Purificación de MRC OX24.** Los carriles “Eluido” corresponden a 10 µL de cada fracción.

**C. Purificación de MRC OX24; preparación de las muestras bajo condiciones reductoras fuertes.** Las condiciones reductoras fuertes (DTT 80 mM en amortiguador de muestra, desnaturalización a 100°C durante 5 minutos) fueron necesarias debido a la aparición de probables dímeros de cadena pesada en el análisis realizado con condiciones de reducción estándar (gel mostrado en B). El carril “Eluido 6-8” corresponde a 10 µL de la mezcla de las fracciones más ricas en IgG (fracciones 6, 7 y 8 del gel mostrado en B), mientras que “Eluido 5 + 9-10” corresponde a 10 µL de la mezcla de las fracciones que contenían cantidades significativas pero menores de IgG (fracciones 5, 9 y 10 del gel mostrado en B).

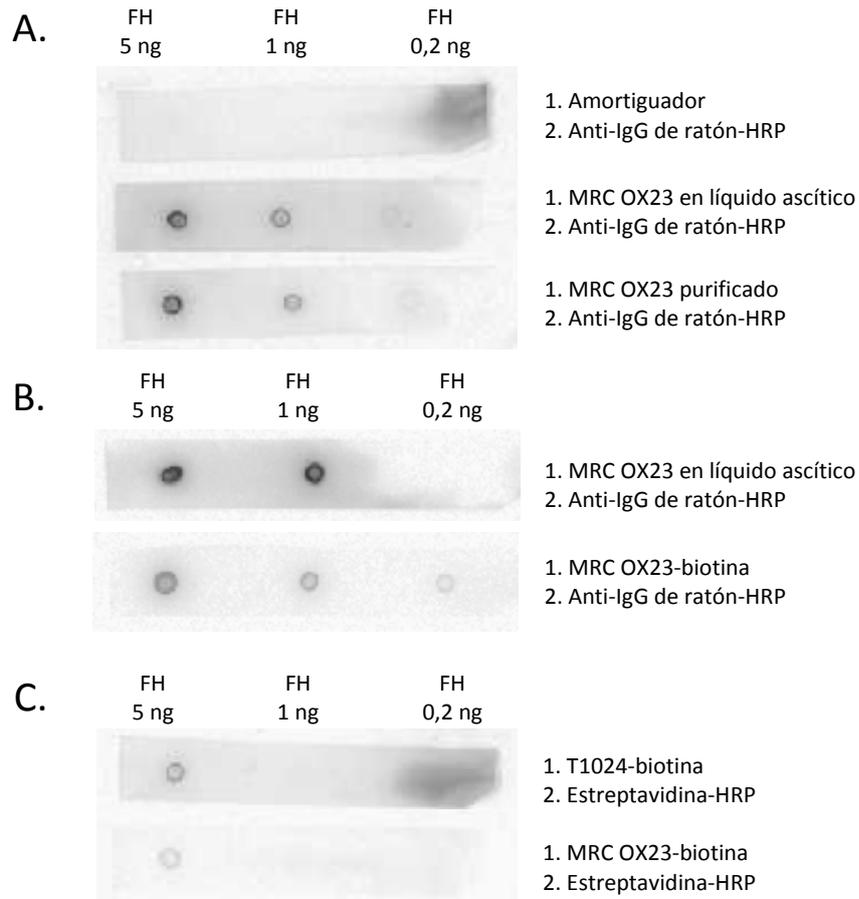


**Figura 12. Purificación de anticuerpos monoclonales anti-factor H humano MRC OX23 y MRC OX24**

Leyenda en la página anterior

#### 4.1.4 Incorporación de biotina a los anticuerpos monoclonales purificados

Seguido al pasaje de las muestras por la columna de *sepharose*-proteína G, se procedió a la incorporación covalente de biotina a las mismas. Si bien las purificaciones de MRC OX23 y MRC OX24 se muestran en paralelo (Figura 12), estos ensayos se realizaron separados en el tiempo. Primero se procedió con la purificación y marcado de MRC OX23, ya que la muestra de MRC OX24 presentaba una importante cantidad de lípidos que impedían su correcta purificación por el método elegido sin un paso de deslipidación previo.



**Figura 13. Verificación de la reactividad como anticuerpo de MRC OX23 durante la purificación y marcado con biotina, mediante dot blot**

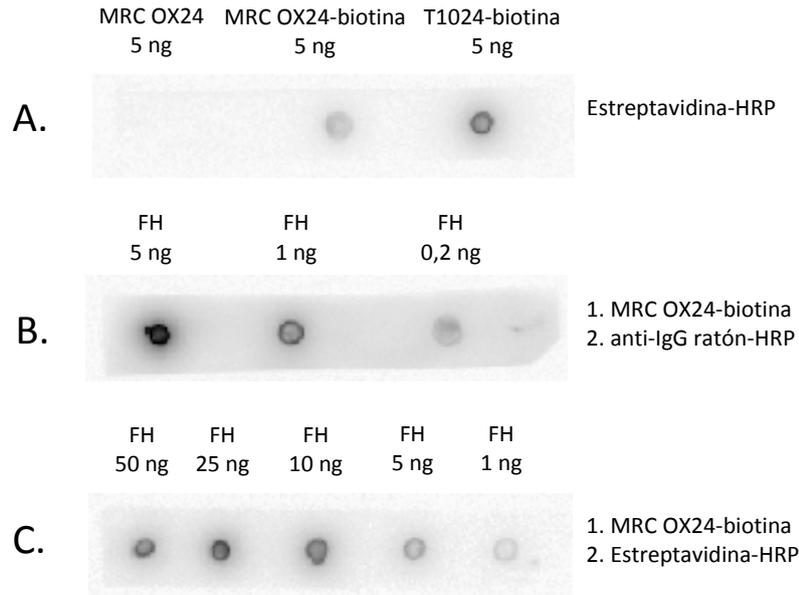
**A.** Verificación de la reactividad como anticuerpo post purificación. Se sembraron las cantidades indicadas de factor H y se detectó por agregado de MRC OX23 en líquido ascítico (control positivo) o MRC OX23 purificado seguido de anti-IgG de ratón-HRP. Se reveló por agregado de sustrato quimioluminiscente (10 segundos de exposición).

**B.** Verificación de la reactividad como anticuerpo post marcado con biotina. Se sembraron sobre PVDF las cantidades indicadas de factor H. Se utilizó MRC OX23-biotina o MRC OX23 en líquido ascítico (control positivo) seguido por anticuerpo anti-IgG de ratón-HRP. Se reveló por agregado de sustrato quimioluminiscente (10 segundos de exposición).

**C.** Evaluación del sistema de detección de factor H utilizando MRC OX23-biotina. Se sembraron distintas cantidades de factor H humano, según se indica. Se utilizó MRC OX23-biotina o T1024-biotina (anticuerpo monoclonal biotinilado anti-S100A8/A9 humanas, de BMA Biomedicals AG, control negativo) como primer anticuerpo seguido por estreptavidina-HRP. Se reveló por agregado de sustrato quimioluminiscente (1 minuto de exposición).

El marcado inicial de MRC OX23, empleando N-hidroxisuccinimido biotina (Calbiochem), produjo un reactivo que no permitió una detección apropiada de factor H (Figura 13, parte C). Ante este resultado surgieron como posibles hipótesis I) pérdida de una alta proporción del anticuerpo (o de su reactividad) durante la purificación y/o el paso de concentración previo al marcado, II) incorporación de biotina interferente con la funcionalidad del anticuerpo o III) pobre incorporación de biotina. Se contaba aproximadamente con 0,18 mg de anticuerpo, escala en la cual las pérdidas por adsorción son fenómenos importantes. Asimismo, al tratarse de anticuerpos monoclonales, los métodos de marcado basados en la derivatización de lisinas pueden afectar residuos claves en el paratope del clon en cuestión y reducir significativamente su unión al antígeno. Alternativamente, el monoclonal en estudio puede contener un bajo número de residuos de lisina accesibles, encontrarse en baja concentración y/o el reactivo de marcado puede no encontrarse en condiciones óptimas, llevando a un bajo rendimiento de incorporación. Las hipótesis I) y II) se descartaron luego de verificar mediante dot blot la funcionalidad del anticuerpo purificado sin marcar y marcado, (Figura 13, partes A y B respectivamente). Por lo tanto, quedó como explicación probable la mala incorporación de biotina, aunque no se verificó experimentalmente.

Teniendo en mente las consideraciones anteriores, y no disponiéndose de más muestra de MRC OX23, se procedió a deslipidar y luego marcar el anticuerpo monoclonal MRC OX24 con sulfo-N-hidroxisuccinimido-biotina (Pierce). En esta oportunidad se quiso verificar que se mantuviera la reactividad del anticuerpo y que se hubiera incorporado biotina efectivamente, antes de ensayar la detección de factor H utilizando el anticuerpo marcado (Figura 14). Este resultado mostró que existió incorporación de biotina, si bien ésta fue mucho menor que la de un anticuerpo monoclonal comercial (Figura 14, parte A). El anticuerpo purificado y marcado conservó su reactividad (Figura 14, parte B). La combinación de MRC OX24 marcado con biotina seguido por estreptavidina-peroxidasa permitió detectar factor H (Figura 14, parte C). La comparación de las partes B y C de la Figura 14 muestra que la sensibilidad lograda usando como segundo paso un anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa fue mucho mayor que usando estreptavidina-peroxidasa, lo cual es coherente con una incorporación sub-óptima de biotina. De todas maneras, se logra detectar con el sistema MRC OX24-biotina y estreptavidina-peroxidasa en el orden de 1 ng de FH.



**Figura 14. Verificación del marcado con biotina y la reactividad como anticuerpo de MRC OX24-biotina mediante dot blot**

**A. Verificación de la incorporación de biotina.** Se sembraron 5 ng de MRC OX24 (control negativo), MRC OX24-biotina y T1024-biotina (anticuerpo monoclonal biotinilado anti-S100A8/A9 humanas, de BMA Biomedicals AG, control positivo). Se utilizó para la detección estreptavidina-HRP.

**B. Verificación de la reactividad como anticuerpo.** Se sembraron sobre PVDF distintas cantidades de factor H humano, según se indica. Se utilizó MRC OX24-biotina seguido por anticuerpo anti-IgG de ratón-HRP.

**C. Estimación de la sensibilidad del sistema de detección de factor H utilizando MRC OX24-biotina.** Se sembraron distintas cantidades de factor H humano, según se indica. Se utilizó MRC OX24-biotina como primer anticuerpo seguido por estreptavidina-HRP.

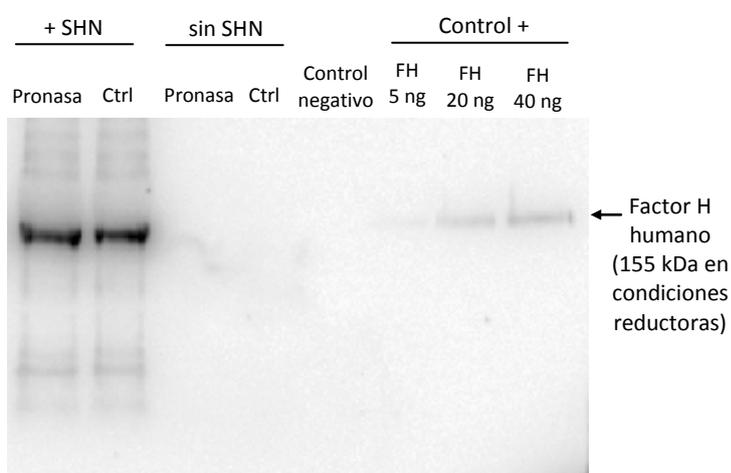
En todos los casos se reveló por agregado de sustrato quimioluminiscente (10 segundos de exposición). Más detalles en sección Materiales y Métodos.

#### **4.1.5 Detección de factor H adsorbido *in vitro* sobre la capa laminar utilizando MRC OX24-biotina**

Teniendo un sistema de detección indirecto de factor H en principio libre de interferencia por la presencia de IgG, se procedió a probarlo sobre muestras de LL. Se incubó LL con SHN inactivado dilución  $\frac{1}{4}$  en VBS<sup>++</sup> durante 2 horas a 37°C. Finalizada la incubación se lavó con Tris/HCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM pH 7,4 y posteriormente se recuperaron los componentes adsorbidos sobre la LL en el sobrenadante de un lavado con NaCl 2M, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM. La presencia de factor H humano en este sobrenadante se analizó mediante Western blot, utilizando el anticuerpo monoclonal MRC OX24 marcado a tales efectos (Figura 15). Se observó que el método de detección diseñado efectivamente funciona, notándose bandas claras correspondientes a factor H tanto en

las muestras incubadas con SHN como en el control positivo de factor H purificado. La sensibilidad observada en este formato es del orden de los 5 ng de factor H. En las condiciones de este ensayo inicial, que por emplear lavados con baja fuerza iónica revelaría interacciones tanto de alta como baja afinidad entre FH y LL, se recuperó una cantidad bastante mayor a 40 ng de factor H unido (cantidad correspondiente al control positivo de mayor carga) cada 50 mg de masa seca de LL.

No se observaron diferencias en la cantidad de FH adsorbido sobre LL control y LL tratadas con pronasa.



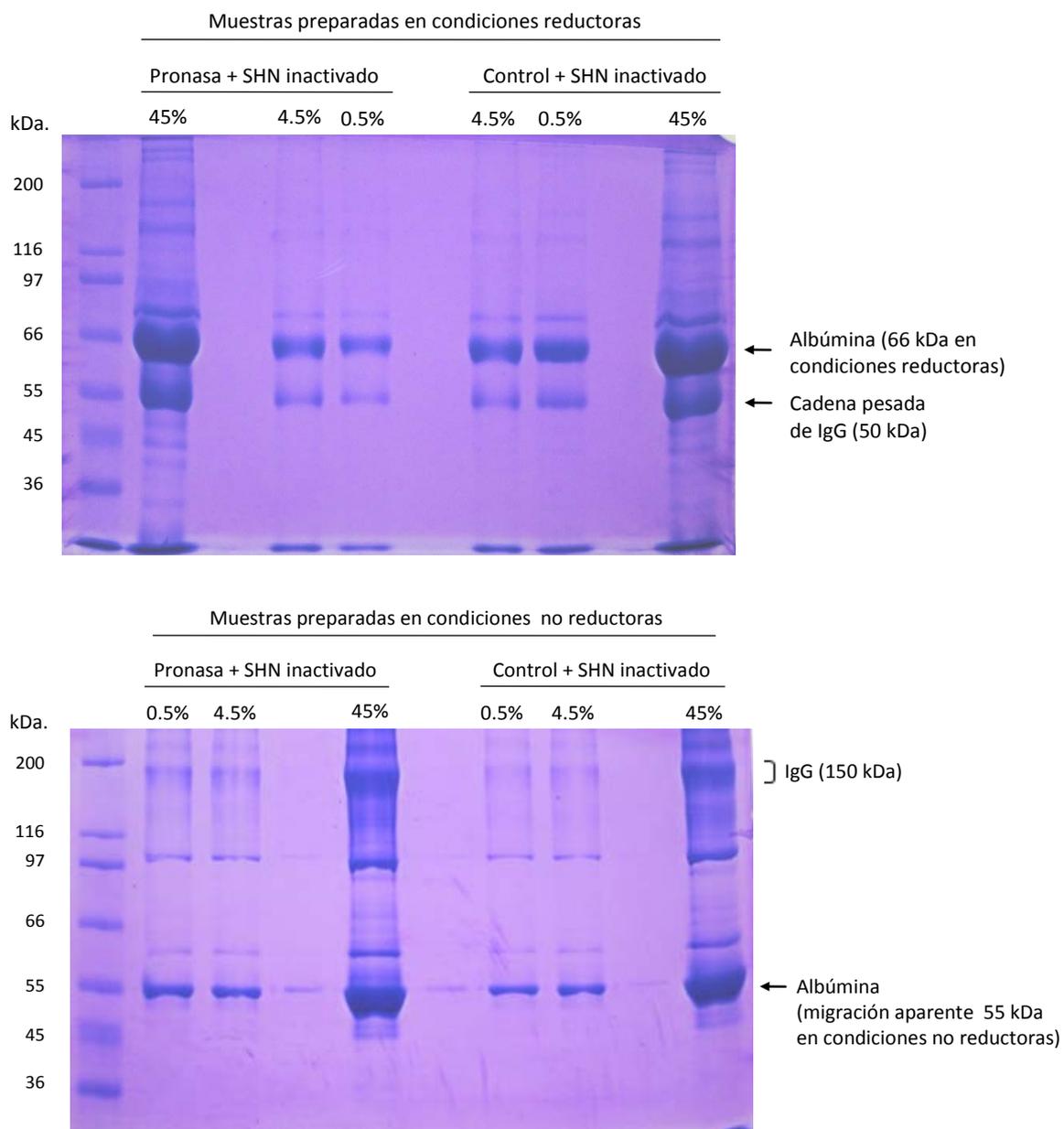
**Figura 15. Unión de factor H de SHN a LL in vitro y detección por Western blot**

Cuatro muestras de LL equivalentes a 50 mg masa seca cada una se sometieron a proteólisis inespecífica con pronasa o a tratamiento control (ver Materiales y Métodos), y luego se incubaron con SHN inactivado en dilución ¼ en VBS<sup>++</sup> o con el amortiguador solamente, a 37°C durante 2 horas, según se indica sobre los carriles. Luego de lavar con Tris/HCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM pH 7,4, los componentes adsorbidos sobre la LL se liberaron empleando NaCl 4M, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM y se concentraron por precipitación con TCA. La mitad de cada una de las muestras resultantes se analizó mediante SDS-PAGE al 7% p/v de acrilamida en condiciones no reductoras y subsiguiente Western Blot, utilizando MRC OX24-Biotina seguido de estreptavidina-peroxidasa y reactivo quimioluminiscente (20 segundos de exposición). “Control negativo” equivale a 35 pg de factor H humano (cantidad equivalente a la remanente de factor H en un sistema sin adsorción, calculada a partir de la concentración de factor H en SHN y los cocientes de dilución impuestos durante los lavados realizados). Los carriles “Control positivo” corresponden a las cantidades de factor H humano especificadas sobre cada carril.

Se quiso asimismo examinar el perfil global de proteínas de SHN adsorbidas a la LL en las condiciones de estudio. Para ello se analizó mediante SDS-PAGE el 50% remanente de cada una de las muestras que habían sido incubadas con SHN en el ensayo anterior (Figura 16). Como no se conocía la cantidad de proteínas adsorbidas sobre la LL en estas condiciones, se procedió a analizar cada muestra en 3 carriles separados correspondientes cada uno al 90 %, 9 % y 1 % de la misma, que a su vez corresponden respectivamente al 45 %, 4,5 % y 0,5 % del total de cada muestra del ensayo anterior. La figura muestra, como se sospechaba, que el factor H no es la principal proteína adsorbida en las condiciones del ensayo. Se observa una banda muy intensa alrededor de los 66 kDa en condiciones reductoras, y alrededor de los 55 kDa en condiciones no reductoras, que se supone corresponde a albúmina. Puede apreciarse otra banda intensa alrededor de los 55 kDa en condiciones reductoras, que se supone corresponde a la cadena pesada de IgG (la cadena liviana no se observa ya que corre con el frente). La banda asignada a IgG en condiciones no reductoras se observa alrededor de los 150 kDa. La presentación difusa de esta banda en comparación con la forma definida de la banda de factor H en la Figura 15 confirma que MRC OX24-biotina está detectando efectivamente factor H y no IgG humana (por posibles interacciones Fc-Fc).

Examinando el patrón de bandas obtenido, se observa que se asimila al perfil de SHN total, si bien faltó correr SHN total en paralelo para poder comparar. Este resultado sugiere fuertemente que existe adsorción inespecífica y general a la LL en las condiciones del ensayo.

A la luz del resultado anterior, el resultado de la Figura 15 en el que no se observan diferencias en la cantidad de FH adsorbido sobre LL control y LL tratadas con pronasa no es para nada inesperado. Si bien este resultado no está de acuerdo con la hipótesis manejada de que los sitios con afinidad para FH sobre la LL sean proteicos, conocer que existe adsorción inespecífica y general de las proteínas del SHN a la LL en las condiciones del ensayo permite interpretar esta situación como interacciones de baja afinidad entre el FH con sitios no proteicos sobre la LL (como ser carbohidratos o  $\text{InsP}_6$ ), que pueden estar enmascarando interacciones de media/alta afinidad con posibles sitios proteicos. Para analizar la retención selectiva de factor H es necesario modificar las condiciones del ensayo, incluyendo lavados más extensos y/o con mayor fuerza iónica.



**Figura 16. Análisis mediante SDS-PAGE de las proteínas adsorbidas in vitro sobre LL**

El 50 % de cada una de las muestras incubadas con SHN inactivado en el ensayo de la Figura 15 se analizó mediante SDS-PAGE al 8,5% p/v de acrilamida en condiciones reductoras y no reductoras, según se indica. Los carriles corresponden al 45 %, 4,5 % y 0,5 % de la muestra inicial.

## 4.2 Puesta a punto del sistema experimental para el análisis del depósito de C3 sobre capa laminar sometida a distintos tratamientos

Como se explica en la Introducción, la activación del sistema complemento da lugar al depósito (covalente en los casos de C3 y C4) de componentes del sistema sobre superficies, así como también genera mediadores solubles, como ser las anafilotoxinas C3a, C4a y C5a. A su vez, parte importante de los mismos productos de activación que se depositan sobre superficies (por ejemplo C3b, iC3b y el complejo terminal C5-9<sub>n</sub>) terminan en la fase fluida. Es así que la activación del sistema complemento puede estudiarse tanto en fase fluida como a nivel de los componentes unidos covalentemente a una superficie. Si bien la segunda estrategia tiene el inconveniente de implicar trabajar en sistemas físicamente heterogéneos, la misma permite estudiar la activación restringida a la propia superficie, a la vez que medir la inactivación de C3b a iC3b sobre ella, paso clave en el control de la vía alternativa. Ésta es la estrategia por la cual se optó.

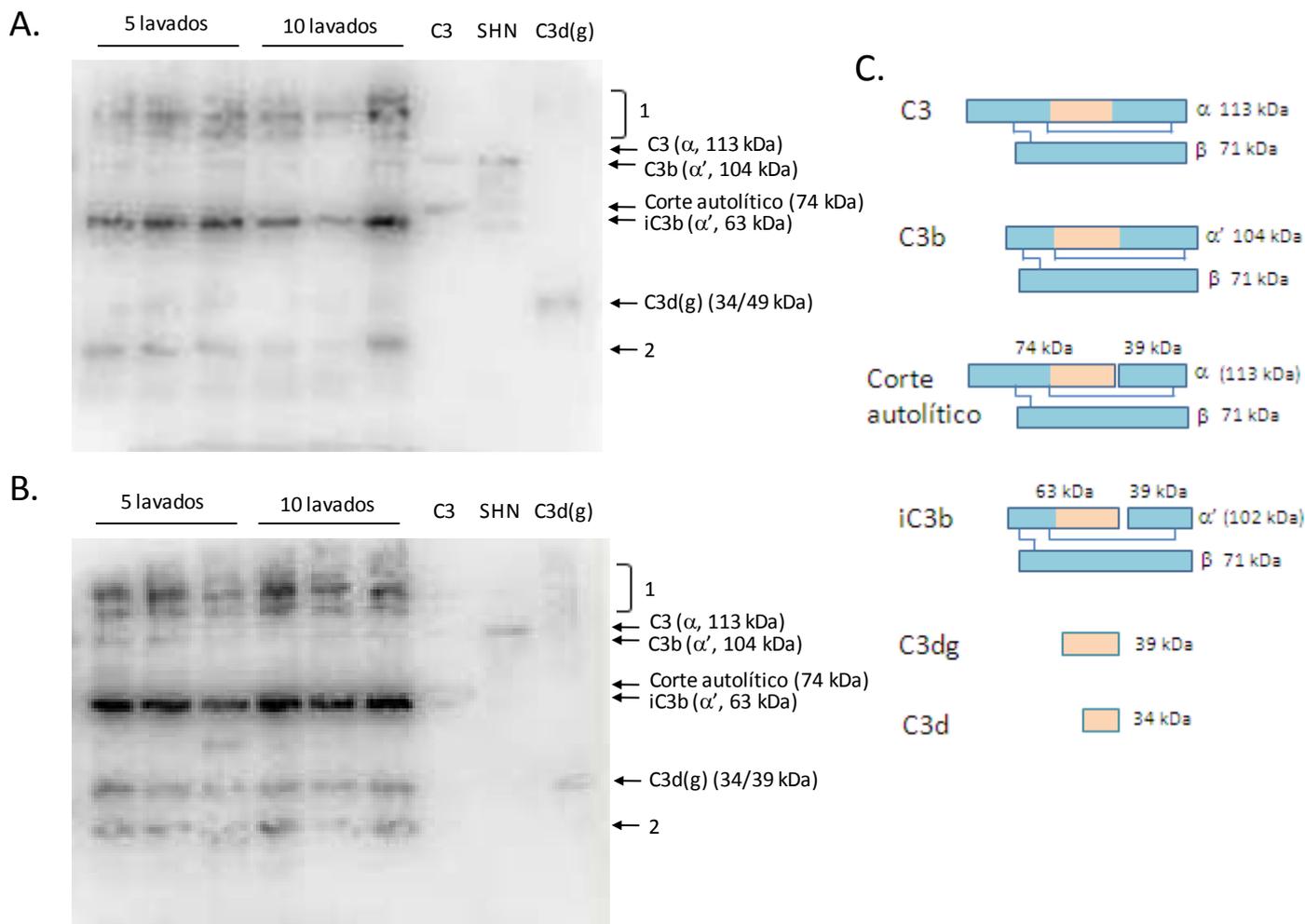
### 4.2.1 Puesta a punto del ensayo de depósito de C3 sobre la capa laminar

Se prepararon LL provenientes de infección experimental intraperitoneal de ratón con *Echinococcus granulosus*, conservándose a 4°C en presencia de NaCl 2 M, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM, NaN<sub>3</sub> 0,05% (suspensión *stock* de LL). En líneas generales, para los ensayos de depósito de C3 sobre LL se tomaron muestras de dicha suspensión, se lavaron con el propósito de reducir la alta fuerza iónica y remover la azida (componentes incompatibles con la activación del sistema complemento), y se incubaron con SHN fresco en dilución ¼ en VBS<sup>++</sup> a 37°C. Acabada la incubación, las LL se lavaron y los productos de C3 unidos covalentemente a las mismas, liberados por agregado de hidroxilamina [65], se analizaron mediante Western blot empleando un anticuerpo policlonal anti-C3d humano.

Ensayos iniciales revelaron cantidades muy pequeñas de C3 depositado sobre LL (resultados no mostrados), lo cual no concordaba con los resultados de experimentos anteriores del grupo (Irigoín *et al.*, 2008). En los experimentos citados se estudió la activación del sistema complemento sobre LL de *E. granulosus* en un diseño experimental globalmente muy similar, que incluía la incubación con SHN a 37°C en baño de agua. Evaluando las diferencias en las condiciones experimentales de ambos ensayos, se consideraron dos explicaciones posibles para el pobre depósito de C3 sobre LL obtenido: que la transferencia de calor durante la incubación con SHN en estufa a 37°C no era satisfactoria a los efectos de la activación del sistema complemento, o que los lavados para remover la azida presente en la suspensión acuosa *stock* no fueron suficientes. A estos efectos se realizaron ensayos en paralelo de depósito de C3 sobre LL comparando las distintas condiciones experimentales (Figura 17). La figura muestra que, si bien el número de lavados de la LL previo a la

incubación con SHN no parece tener mayores efectos sobre el depósito de C3 (la intensidad de las bandas obtenidas en los distintos carriles de cada Western blot es similar), el método de incubación a 37°C (estufa o baño de agua), parece ser muy relevante. Se encontró que la incubación a 37°C en baño de agua genera un mayor depósito de C3 sobre LL, por lo que se adoptó este método de incubación para todos los ensayos subsiguientes. Asimismo se reflexionó que la incubación en los tubos de 14 mL usados podría acarrear problemas de homogeneidad en la temperatura dentro del sistema de estudio, por lo que se decidió para ensayos futuros modificar el protocolo inicial llevándolo a una escala menor (ensayos sobre 0,5 mg de masa seca de LL en lugar de 1 mg), de forma de trabajar en tubos de 1,5 mL en los cuales se logra una temperatura homogénea más rápidamente. Con respecto a la identidad de las bandas observadas, éstas se señalan sobre el lado derecho de cada Western blot (Figura 17).

Se observa claramente que la banda correspondiente a iC3b es predominante en todos los casos. Además, si bien la diferencia de peso molecular es muy pequeña, en la parte A se aprecia la diferencia de migración entre C3 (en carriles marcados como "C3" y "SHN") y C3b (presente en los carriles de LL). Como se explica en la leyenda, se supone que las bandas señaladas como "1" corresponden a productos de C3 unidos covalentemente a otras especies, o entre sí. Esta suposición se ve avalada por la presencia de bandas discretas espaciadas uniformemente, que bien podrían corresponder a distintos complejos oligoméricos de C3b o iC3b, diferentes únicamente en la presencia de una molécula. Según su peso molecular (menor a 34 kDa), la banda señalada como "2" no es atribuible a ninguna especie conocida de C3, por lo que se especula corresponde a un fragmento de las especies más grandes de C3 observadas. Acerca de los estándares utilizados, los mismos se conservaron a 4°C en presencia de amortiguador de muestra durante varios días previo a su utilización. En el caso de C3 nativo, la conservación en presencia de agentes desnaturizantes como ser urea y SDS hace que se produzca un corte autolítico [68]. Esta nueva especie genera tres bandas de peso molecular aproximado 74 kDa, 39 kDa y 71 kDa en condiciones reductoras, correspondientes a dos fragmentos de la cadena  $\alpha$  y a la cadena  $\beta$  respectivamente. El anticuerpo policlonal anti-C3d humano empleado reconoce la porción C-terminal del fragmento de 74 kDa de la cadena  $\alpha$  de esta especie, según se muestra en el esquema de la parte C, Figura 17.



**Figura 17. Puesta a punto del ensayo de depósito in vitro de C3 sobre LL**

Se tomaron muestras equivalentes a 1 mg de masa seca de LL cada una, a partir de la suspensión *stock* de LL. Las muestras se lavaron 5 o 10 veces con agua, según se indica, para remover la azida y el NaCl en alta concentración (incompatibles con la activación del sistema complemento), y luego se lavaron una vez más con VBS<sup>++</sup>. Inmediatamente se incubaron con SHN en dilución 1/4 en el mismo amortiguador durante 60 minutos a 37°C. El C3 unido covalentemente a la LL se analizó por SDS-PAGE al 10% p/v de acrilamida en condiciones reductoras, y posterior Western Blot. Se empleó un anticuerpo policlonal anti-C3d, que asimismo reconoce la porción correspondiente de la cadena alfa en C3, C3b, iC3b, C3dg y C3 nativo con corte autolítico (ver parte C), seguido por anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa y agregado de reactivo quimioluminiscente (10 segundos de exposición). Los carriles "C3" y "C3dg" corresponden a estándares de dichas especies. El carril "SHN" corresponde a 7 nL de suero humano normal. El conjunto de bandas señalado como "1" podría corresponder a especies de C3 unidas covalentemente a otros compuestos, o unidas entre sí, y no liberadas por el agregado de hidroxilamina 0,375 M. Se desconoce la identidad de la banda "2", si bien se observa sistemáticamente en los ensayos de depósito de C3.

**A.** Muestras incubadas a 37°C en estufa; el número de lavados con agua se indica sobre los carriles correspondientes.

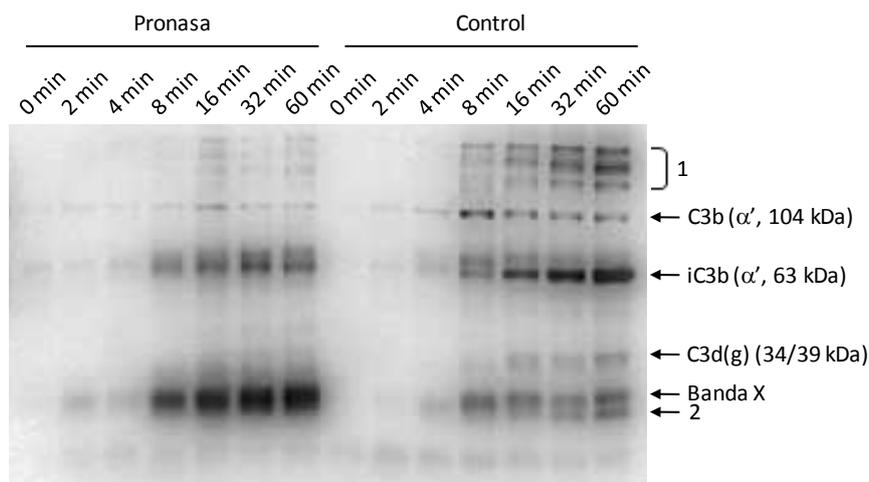
**B.** Muestras incubadas a 37°C en baño de agua; el número de lavados con agua se indica sobre los carriles correspondientes.

**C.** Esquema señalando la porción reconocida por el anticuerpo policlonal anti-C3d empleado en las distintas especies de C3. Se muestra el enlace disulfuro intercatenarario y uno de los enlaces disulfuro intracatenarios presentes en la cadena  $\alpha$ .

#### **4.2.2 Ensayos preliminares de depósito de C3 sobre capa laminar control y sometida a proteólisis inespecífica**

Como ensayo preliminar hacia el objetivo de analizar la presencia de sitios proteicos con afinidad por factor H dentro de la LL, se sometieron muestras de este material a proteólisis inespecífica, o a un tratamiento control, previo a la incubación con SHN fresco. Como se explica en la sección Materiales y Métodos, el tratamiento control empleado implica el agregado de pronasa en frío e inmediatos lavados. De esta manera, tanto las muestras “control” como las sometidas a proteólisis se han enfrentado a la misma cantidad de pronasa y a los mismos lavados, difiriendo únicamente en el tiempo y temperatura de la incubación con pronasa.

En el primer ensayo de esta naturaleza (Figura 18), se observaron diferencias notorias en el patrón de bandas correspondientes a ambos tipos de muestra. Las bandas correspondientes a las muestras control son más definidas, característica especialmente notoria en la banda correspondiente a iC3b. Este resultado sugiere que hubo proteólisis de iC3b debido a un remanente de pronasa (si bien la pronasa genera proteólisis inespecífica, es probable que corte en el entorno de los sitios de corte específicos, más accesibles). Otra diferencia importante la constituye una banda de identidad desconocida, de peso molecular menor a 34 kDa que denominamos “Banda X”. Según el peso molecular de esta especie, no se ha logrado atribuir esta banda a ninguna especie fisiológica de C3, y viendo su predominancia únicamente en las muestras tratadas con pronasa, se sugiere que sea en realidad un producto de proteólisis por remanentes de pronasa. La denominada “banda 2”, se observa en ambas muestras en este ensayo. Si bien se desconoce su identidad, la misma aparece sistemáticamente en todos los ensayos de depósito de C3, incluidos los ensayos preliminares de la Figura 17, por lo cual no se investigó su procedencia.

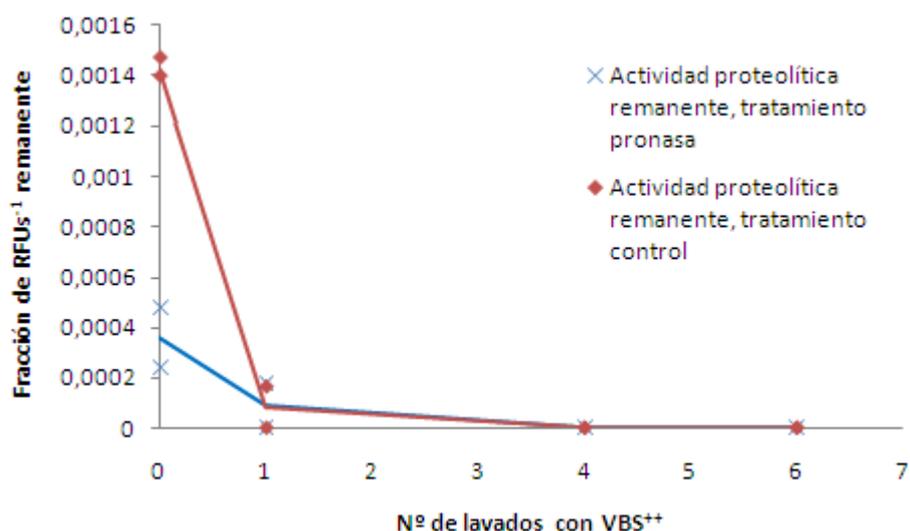


**Figura 18. Primer ensayo de depósito de C3 sobre LL control y sometida a proteólisis inespecífica con pronasa**

Se tomaron muestras equivalentes a 0,45 mg de masa seca de LL cada una y se las sometió a proteólisis con pronasa en concentración 1 mg/mL o a un procedimiento control (ver Materiales y Métodos), según lo indicado. A continuación, todas las muestras se lavaron 6 veces con VBS<sup>++</sup> y se incubaron junto con SHN fresco a 37°C en baño de agua durante los tiempos especificados. Finalizada la incubación, las muestras se lavaron con NaCl 2 M, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM y se trataron con hidroxilamina 0,375 M para recuperar el C3 unido covalentemente a las LL. El 50% de cada una de las muestras resultantes se analizó mediante SDS-PAGE al 10% p/v de acrilamida en condiciones reductoras y posterior Western blot con anticuerpo anti-C3d. Se reveló por agregado de sustrato quimioluminiscente (1 segundo de exposición). El conjunto de bandas identificado como "1" se supone corresponde a especies de C3 unidas covalentemente a otros componentes, o entre sí, y no liberadas completamente por el agregado de hidroxilamina. No se conoce la identidad de las dos bandas observadas por debajo de C3d(g); identificadas como «Banda X» y «2».

Visto que los resultados de la Figura 18 sugieren que podría existir un remanente de pronasa en las muestras, se procedió a evaluar la naturaleza y el número de lavados posteriores al tratamiento con pronasa necesarios para alcanzar un nivel de actividad proteolítica no interferente con los objetivos del estudio. Tratándose de una muestra biológica no soluble, la determinación de la actividad proteolítica en el sobrenadante de los lavados ensayados constituye la aproximación más directa a la evaluación de la actividad proteolítica remanente en la muestra. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que la actividad medida en los volúmenes de los lavados no necesariamente es igual a la actividad proteolítica concentrada sobre la superficie de la LL. La Figura 19 muestra que con 2 lavados con NaCl 2 M, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM seguidos por 4 lavados con VBS<sup>++</sup> se obtiene una actividad proteolítica indetectable con el sustrato fluorogénico disponible. A partir de este resultado, se decidió aplicar en el siguiente ensayo de depósito de C3 sobre LL tratada con pronasa 2 lavados con NaCl 2 M, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM seguidos por 7 lavados con VBS<sup>++</sup> (es decir 3 más que el número que había dado lugar a actividad

proteolítica indetectable en nuestro ensayo), previo a la incubación con SHN. Se agregaron estos lavados adicionales debido a la conciencia de que el ensayo de detección de actividad proteolítica empleado tenía limitaciones importantes. Además de lo ya comentado en cuanto a que no es igual la actividad en el líquido de lavado que sobre la superficie de la LL, la actividad de la pronasa sobre este sustrato en particular no había sido reportada. Si bien existen referencias de la actividad de esta enzima sobre péptidos sintéticos similares [69], el no contar con un sustrato fluorogénico óptimo podía comprometer la sensibilidad del ensayo. Asociado a esta limitación existía el riesgo de que permanecieran en las muestras cantidades de actividad proteolítica (indetectables por el ensayo pero significativas) que fueran diferentes para la muestra incubada para digestión con pronasa y la muestra control. Como se explica en la leyenda, como valor de referencia se tomó la actividad proteolítica generada por una solución de pronasa 0,125 mg/mL, y como valor inicial se graficó la actividad proteolítica remanente en el sobrenadante del último lavado con NaCl 2 M, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM. Puede verse que este valor es aproximadamente 4 veces mayor en el caso de las muestras “control” que en las muestras digeridas con pronasa. Una explicación para este resultado es que durante la incubación toda la noche a 37°C de las muestras digeridas con pronasa, las proteasas de la mezcla sufrieran autoproteólisis. En las muestras “control”, la pronasa no fue incubada a 37°C, resultando en un valor inicial de actividad proteolítica más elevado. Por otro lado, si se analiza la disminución de la actividad entre el segundo lavado con NaCl 2 M (“lavado 0” en la Figura) y el primer lavado con VBS<sup>++</sup> (“lavado 1”), puede apreciarse que el cociente entre los dos valores de actividad es mayor al factor de dilución impuesto por el lavado realizado (1/30). Esto se observa para las dos muestras, aunque la diferencia es mayor en el caso de la muestra digerida con pronasa (cociente 1/4) que para la muestra del tratamiento control (cociente 1/17). Este resultado sugiere que existe adsorción de pronasa sobre la LL, y que ésta es diferente para ambos tipos de tratamiento. Se deduce que la incubación a 37°C durante toda la noche con la enzima en el tratamiento para digestión con pronasa permite un nivel mayor de adsorción que la incubación breve a 0°C usada en el tratamiento control.



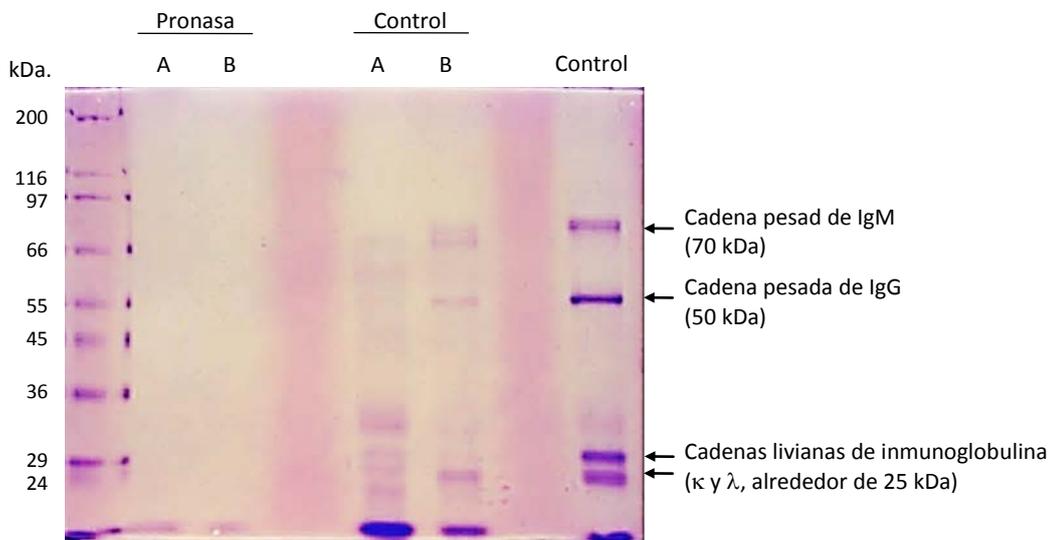
**Figura 19. Medida de la actividad proteolítica remanente en muestras de LL tratadas con pronasa**

Se tomaron cuatro muestras equivalentes a 0,45 mg de masa seca de LL cada una, y se las sometió a proteólisis inespecífica con pronasa o a tratamiento control (ensayos por duplicado, ver Materiales y Métodos). Todas las muestras se lavaron 2 veces con NaCl 2 M, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM seguido por 6 lavados con VBS<sup>++</sup>. En una placa de 96 pocillos para fluorescencia se sembraron 100 µL de los lavados número 1, 4 y 6 con VBS<sup>++</sup>, junto con 100 µL de sustrato fluorogénico y se midió la actividad proteolítica como el cambio de fluorescencia en el tiempo en los respectivos pocillos, medido como RFUs<sup>-1</sup>. Como valor de referencia se tomó la actividad proteolítica generada por una solución de pronasa 0,125 mg/mL, expresándose los demás valores como fracción de este valor. Se grafican los valores de actividad proteolítica remanente a partir del último lavado con NaCl 2 M, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM (que corresponde al “lavado cero” en la Figura). La línea llena corresponde al promedio de los duplicados. A partir del lavado número 4 la actividad proteolítica remanente cayó por debajo del límite de detección del ensayo.

Se quiso verificar además la actividad proteolítica de la pronasa en la concentración de trabajo sobre las muestras de LL. Para ello se analizaron las muestras de LL correspondientes al ensayo de la figura anterior mediante SDS-PAGE (Figura 20). Si bien nos interesaría evaluar la actividad proteolítica de la pronasa sobre las mucinas de la LL, este objetivo resulta particularmente difícil de lograr. El alto grado de glicosilación de las mucinas hace que no se puedan analizar mediante SDS-PAGE, y que al analizarse en geles de agarosa, se obtengan bandas difusas y difíciles de interpretar [70]. Por esta razón, se optó por estudiar el efecto de la pronasa sobre las muestras de LL utilizando como un indicador la proteólisis de las proteínas convencionales del hospedador asociadas a ella. Se espera que cualquier efecto de la pronasa sobre las mucinas de la LL será evidenciado por un efecto aún mayor sobre las proteínas convencionales del hospedador asociadas a la LL.

En la Figura 20 se puede observar que los carriles correspondientes a las muestras incubadas con pronasa no presentan bandas, lo que denota que todas las proteínas

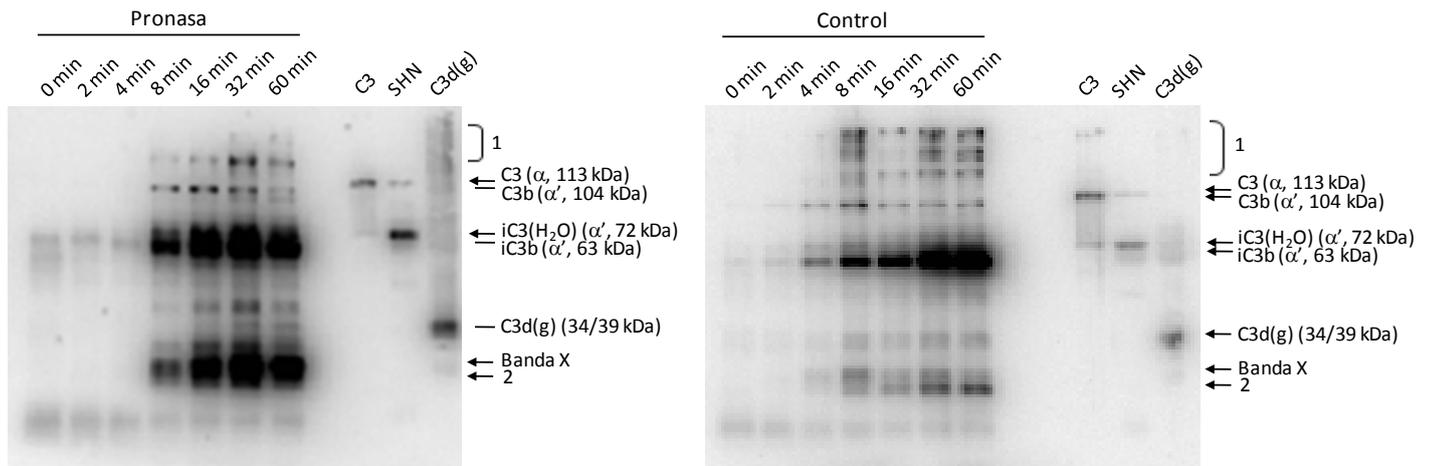
convencionales asociadas a la LL han sido digeridas. Los carriles de muestras sometidas a tratamiento control sí presentan bandas, si bien los duplicados no parecen presentar el mismo patrón. En el caso del "Control B", las bandas son similares a las de un control de LL sin ningún tratamiento, aunque más tenues. Este resultado indica que a la concentración utilizada la pronasa es capaz de proteolizar las proteínas convencionales de la muestra, pero sugiere que durante el tratamiento control también ocurre proteólisis parcial de dichas proteínas. Presumiblemente esta digestión ocurre durante la incubación con SHN y/o la desnaturalización (lenta, por haberse realizado a 37°C) previa a la siembra en SDS-PAGE, ya que éstas son las únicas etapas en las que la temperatura es compatible con este fenómeno.



**Figura 20. Evaluación del efecto del tratamiento con pronasa y su tratamiento control sobre las proteínas presentes en la muestra de LL**

Se tomaron cuatro muestras equivalentes a 0,45 mg de masa seca de LL cada una, y se las sometió a tratamiento con pronasa o tratamiento control (ver sección Materiales y Métodos). Luego, se lavaron 2 veces con NaCl 2 M, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM seguido por 6 lavados con VBS<sup>++</sup>, y se tomaron en amortiguador de muestra 2X. Las muestras obtenidas se analizaron mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y se reveló con tinción de plata. Los carriles "A" y "B" corresponden a ensayos duplicados. El carril "Control" equivale a 0,45 mg de masa seca de LL sometidas a los mismos lavados que las demás muestras.

A pesar de que el tratamiento control diseñado no fue óptimo, se quiso de todas maneras realizar un ensayo de depósito de C3 sobre LL control y LL sometida a digestión con pronasa (Figura 21), por considerar que cualquier efecto sobre las mucinas de la LL debido a la actividad marginal de pronasa en el tratamiento control diseñado será menor que el que se observa sobre las proteínas convencionales asociadas a la LL, y por tanto probablemente despreciable.

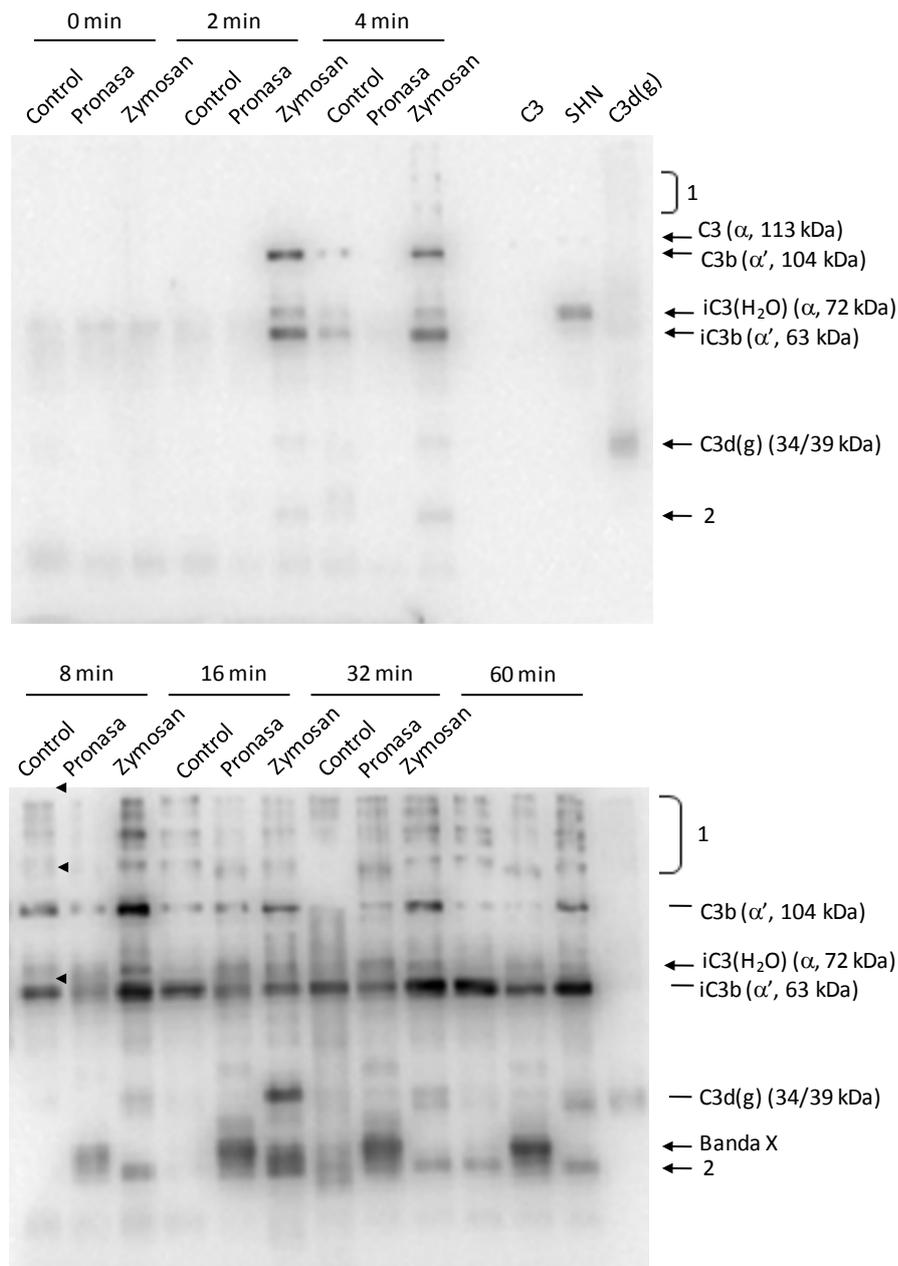


**Figura 21. Segundo ensayo de depósito de C3 sobre LL control y sometida a proteólisis inespecífica, primer análisis por Western blot**

Se realizó el mismo tratamiento que en el primer ensayo de depósito de C3 sobre LL tratada con pronasa (Figura 18), con la excepción de la concentración de pronasa utilizada y del número de lavados previos a la incubación con SHN fresco; en esta ocasión se utilizó una concentración de pronasa de 0,125 mg/mL y se realizaron 2 lavados con NaCl 2 M, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM seguidos por 7 lavados con VBS<sup>++</sup>. El 50% de cada muestra se analizó mediante SDS-PAGE al 10% p/v de acrilamida en condiciones reductoras y posterior Western blot con anticuerpo anti-C3d humano. Se reveló mediante agregado de reactivo quimioluminiscente (15 segundos de exposición). Los carriles “C3” y “C3d(g)” corresponden a estándares de dichas especies. El carril “SHN” corresponde a una muestra de suero humano normal conservada varios días a 4°C, lo que ocasiona la hidrólisis del C3 en ella a C3(H<sub>2</sub>O), e inactivación subsiguiente a iC3(H<sub>2</sub>O); esta especie es similar a iC3b, pero tiene 9 kDa más porque conserva la porción C3a de la cadena α. El conjunto de bandas señalado como “1” se supone corresponde a productos de C3 unidos covalentemente a otros componentes, o entre sí, y no liberados completamente por el agregado de hidroxilamina. Las bandas “2” y “Banda X”, de naturaleza desconocida, también pueden observarse en este ensayo.

Nuevamente se observa una notoria diferencia entre las bandas correspondientes a las muestras tratadas con pronasa y control. La “Banda X”, aunque menos dominante que en el experimento anterior (Figura 18), sigue estando, en mayor abundancia en la muestra tratada con pronasa que en la control.

Dados los resultados de la Figura 19, en los que el remanente de actividad proteolítica luego de los lavados fue indetectable, se quiso explorar la posibilidad de que la “Banda X” correspondiera en realidad a un producto de inactivación fisiológico de C3 generado sobre superficies, que pudiera diferir en migración al C3d(g) presente en la muestra estándar, generado en la fase fluida. Para ello se realizó un ensayo de depósito de C3 sobre partículas de zymosán (fantasmas de levadura *S. cerevisiae*; superficie activadora del sistema complemento por la vía alternativa y la de las lectinas [71] [72]), que se analizó en paralelo al 50 % restante de cada una de las muestras de la Figura 21 (Figura 22).



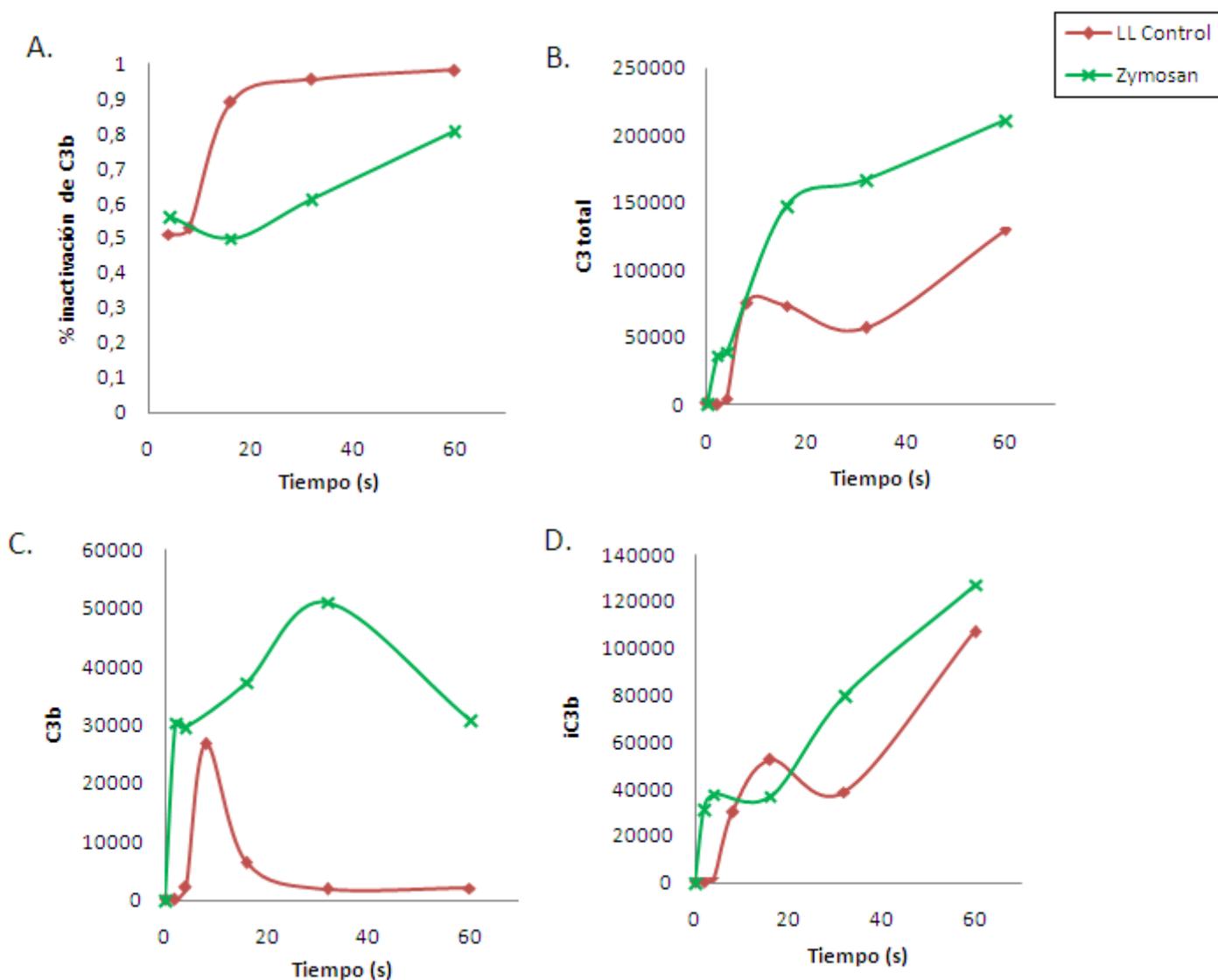
**Figura 22. Segundo ensayo de depósito de C3 sobre LL control y sometida a proteólisis inespecífica (segundo análisis por Western blot), y ensayo de depósito de C3 sobre zymosán**

Se tomaron muestras equivalentes a 0,5 mg de zymosán cada una, y se las incubó con SHN en dilución  $\frac{1}{4}$  en VBS<sup>++</sup> a 37°C durante los tiempos especificados sobre cada carril. Finalizada la incubación, las muestras resultantes se sometieron al mismo tratamiento que las de la Figura 21. El 50% de cada una de estas muestras, junto con el 50% de cada una de las muestras resultantes del ensayo de la Figura 21 se analizaron mediante SDS-PAGE al 10% p/v de acrilamida en condiciones reductoras y posterior Western blot con anticuerpo anti-C3d humano. Se reveló con sustrato quimioluminiscente (20 segundos de exposición). Los carriles "C3" y "C3d(g)" corresponden a estándares de dichas especies. El carril "SHN" corresponde a una muestra de suero humano normal. El conjunto de bandas señalado como "1" se supone corresponde a productos de C3 unidos covalentemente a otros componentes, o entre sí, y no liberados completamente por el agregado de hidroxilamina. Las bandas "2" y "Banda X", de naturaleza desconocida, también pueden observarse en este ensayo.

En esta oportunidad, la “Banda X” no se observa en los carriles correspondientes al depósito de C3 sobre zymosán, lo cual evidencia que ésta no es una banda fisiológica del proceso de depósito y/o inactivación de C3 sobre una superficie, sino que es propia del sistema experimental. La posibilidad de que se trate de un fragmento proteolítico generado por una proteasa presente en la muestra de LL no es coherente con el hecho de que la banda se intensifique en las muestras tratadas con pronasa (en las cuales probables proteasas presentes en la LL deberían ser destruidas), por lo que fue descartada. En suma, se deduce que la “Banda X” es un fragmento proteolítico generado por un remanente de pronasa. Con respecto a las bandas designadas como “1”, tanto en este ensayo (Figura 19) como en los ensayos de las Figuras 17 y 18, éstas son más visibles y/o presentan componentes adicionales en los carriles de las muestras control con respecto a las muestras tratadas con pronasa. Es posible que estas bandas sean especialmente susceptibles a la actividad remanente de pronasa. Las bandas son también más visibles cuanto más exhaustivos hayan sido los lavados posteriores a la incubación con pronasa (comparar la intensidad de las bandas designadas como “1” en las Figuras 17, 18 y 19).

En resumen, pese al resultado del ensayo fluorogénico, debe haber un remanente de pronasa que actúa sobre alguna(s) de la(s) especies de C3 y genera la “Banda X”. Este remanente es mayor para las muestras sometidas a tratamiento con pronasa que para las muestras “control”, seguramente debido a una mayor adsorción de la misma sobre la LL en el primer caso (posibilitada por una incubación prolongada a 37°C). Considerando estas observaciones, resulta imposible hacer comparaciones entre LL control y LL sometida a tratamiento con pronasa, principalmente porque no se conoce la especie de C3 a partir de la cual se origina la “Banda X”. Sin embargo, si suponemos que la proteólisis de las mucinas en el tratamiento control de la LL fue despreciable (partiendo de la base que las proteínas del hospedador asociadas a la LL son más susceptibles a la proteólisis que las mucinas, y que incluso en éstas la proteólisis observada fue parcial), y asumimos además que la ausencia de “Banda X” en las muestras control de la Figura 21 indica que no hubo proteólisis de proteínas del complemento por remanentes de pronasa, podemos comparar preliminarmente los resultados de depósito de C3 sobre LL control y zymosán.

Para ello se analizó la intensidad de las bandas del Western blot de la Figura 22 con el programa *Quantity One*. Los resultados de la cuantificación se muestran en la Figura 23.



**Figura 23. Cuantificación del depósito de C3 sobre LL sometida a tratamiento control y sobre zymosán**

Se cuantificaron las integrales de intensidad sobre área asociadas a las bandas de los carriles de "LL control" (rombos rojos) y "zymosán" (cruces verdes) del Western blot de la Figura 22.

**A. Cinética de la inactivación de C3b.** El porcentaje de inactivación de C3b se calculó como el cociente entre la integral asociada a iC3b sobre la de la suma de C3b e iC3b, para cada tiempo.

**B. Cinética del depósito de C3.** C3 total se determinó como la suma de las integrales de las bandas designadas como "1", "C3b", "iC3b" y "C3d(g)", para cada tiempo.

**C. Cinética del depósito de C3b.**

**D. Cinética de la formación de iC3b.**

Se excluyó del análisis las integrales asociadas a bandas correspondientes a 8 minutos de incubación sobre zymosán, ya que el carril de SDS-PAGE correspondiente parece estar más cargado y se desvía de la tendencia. En la parte A se excluyeron además los puntos de tiempo 0 y 2 minutos sobre zymosán y sobre LL control, ya que el cálculo de porcentaje de inactivación de C3b a esos tiempos implica la división sobre una cantidad muy pequeña y afectada de gran error.

Como se explica en la leyenda, el porcentaje de inactivación de C3b se calculó como el cociente de intensidades entre la banda de iC3b y la suma de iC3b más C3b. Según se aprecia en la parte A de la Figura 23, este cociente asciende rápidamente hasta valores que se aproximan a la unidad en el caso de las muestras de LL "control". En el caso de las muestras de zymosán, el porcentaje de inactivación aumenta paulatinamente conforme pasa el tiempo, llegando a un valor máximo del 80 %. Estos resultados sugieren que la inactivación de C3b es un proceso más eficiente sobre la LL que sobre el zymosán. Las partes B, C y D de la Figura 23 muestran las cinéticas de los depósitos de C3 total y de C3b e iC3b en particular, respectivamente. Estos resultados muestran, en primer lugar, que existe un mayor depósito de especies de C3 sobre la superficie de zymosán que sobre la superficie de LL, al menos bajo las condiciones de estudio. Además, el tiempo al cual C3b alcanza su cantidad máxima es más tardío para zymosán que para LL, como se espera que suceda para un mejor activador del sistema complemento. En conjunto estos resultados evidencian en forma preliminar la naturaleza de pobre activador del sistema complemento de la LL, cualidad que se había inferido pero para la cual no existía evidencia directa.

## 5. Discusión

En el presente trabajo se quiso, en primer lugar, desarrollar un sistema de detección de factor H compatible con el sistema de estudio. Para ello se disponía de anticuerpos monoclonales de ratón anti factor H humano (MRC OX23 y MRC OX24), bajo la forma de líquidos ascíticos. Los anticuerpos monoclonales se purificaron y marcaron con biotina (Figuras 12, 13, 14), luego de comprobarse que estos pasos eran imprescindibles para montar un sistema de detección útil para los experimentos planeados (Figura 11). El sistema de detección así montado (Western blot utilizando MRC OX24-biotina seguido de estreptavidina-peroxidasa) logró detectar FH con una sensibilidad del orden de los 5 ng (Figura 15).

En segundo lugar se quiso poner a punto un sistema experimental para el análisis de C3 depositado sobre LL control y LL modificadas. Existían antecedentes de un sistema experimental similar en el laboratorio (Irigoin et al. 2008). Sin embargo, con los reactivos y materiales ahora disponibles, fue necesario adaptar nuestras condiciones de trabajo para lograr niveles de depósito de C3 similares a los de aquel trabajo (Figura 17). En estos ensayos se utilizó un anticuerpo policlonal anti C3d, capaz de reconocer distintas especies de C3 que contienen dicha porción (a saber, C3, C3b, iC3b(H<sub>2</sub>O), iC3b, C3 con corte autolítico, C3dg y C3d). Se pudieron identificar las distintas especies de C3 depositadas sobre la LL, y se familiarizó con sus migraciones electroforéticas (Figura 17).

En cuanto a las modificaciones de la LL, se investigó únicamente la proteólisis inespecífica con pronasa. Como control a este tratamiento se diseñó uno similar, en el que la muestra era enfrentada a la misma cantidad de pronasa pero en una incubación mínima y a 0°C. En un primer ensayo de depósito de C3 sobre LL control y LL sometidas a proteólisis inespecífica (Figura 18), se observó una banda reconocida por el anticuerpo anti-C3d de identidad desconocida que denominamos "Banda X". Esta banda no apareció en ensayos preliminares de depósito de C3 sobre LL sin ningún tratamiento, por lo que se decidió investigar su procedencia, ya que era probable que se tratara de un fragmento proteolítico generado por un remanente de pronasa en la muestra. Cabe destacar que pronasa es una mezcla comercial de proteasas de *S. griseus*, cuyas enzimas predominantes son dos proteasas de serina dependientes de zinc. Por esta razón, la inactivación irreversible (por métodos químicos) de pronasa previo a la incubación con SHN, sería incompatible con un ensayo de activación del sistema complemento, dado que en éste actúan proteasas de serina también. De similar manera, el uso de quelantes de metales divalentes para inactivar la pronasa no es compatible con la activación del sistema complemento, que requiere de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>. Asimismo, no se intentó inactivar la enzima con calor, ya que no se quiso someter a la LL a incubación prolongada a 100°C por temor a alterar su estructura nativa y afectar

inadvertidamente la activación y/o control del complemento sobre ella. Es así que para minimizar un posible remanente de pronasa en la muestra, se sometió a la LL a lavados más exhaustivos que los empleados inicialmente luego de la incubación con la enzima, y además se verificó la ausencia de actividad proteolítica remanente detectable en dichos lavados mediante un ensayo fluorogénico (Figura 19). En estas condiciones se realizó un segundo ensayo de depósito de C3 sobre LL control y sometidas a proteólisis inespecífica (Figura 21). Nuevamente se observó la “Banda X”, aunque menos predominante que en el primer ensayo. La banda aparecía solo en la muestra tratada con pronasa, concomitantemente con un nivel de depósito total de C3 más elevado que en la muestra control. Considerando el resultado ahora disponible de que la actividad remanente de pronasa luego de los lavados exhaustivos mencionados era indetectable (Figura 19), se especuló a esta altura que la “Banda X” podría corresponder a un producto de inactivación fisiológico de C3 generado sobre superficies, que se acumulara sólo en condiciones de activación fuerte del sistema, explicándose así su ausencia sobre LL sin ningún tratamiento. Para evaluar esta posibilidad se realizó un ensayo de depósito de C3 sobre una superficie activadora fuerte del sistema complemento conocida (partículas de zymosán), que se analizó en paralelo a muestras del ensayo anterior (Figura 22). Este análisis permitió descartar la posibilidad anterior, ya que la “Banda X” no se observó en ninguno de los carriles correspondientes a depósito de C3 sobre zymosán. En conclusión, a pesar de los resultados del ensayo fluorogénico, debe existir un remanente de pronasa en las muestras de LL que actúa sobre alguna(s) especie(s) de C3 y genera la “Banda X”. La presencia de esta banda, sumado a que se desconoce la especie a expensas de la cual se genera, no permite comparar los datos de depósito de C3 en muestras control y sometidas a proteólisis inespecífica. Por esta razón, no se pueden hacer afirmaciones acerca de la naturaleza del sitio con afinidad por factor H en la LL a partir de estos resultados, si bien preliminarmente los mismos apuntan a un sitio peptídico, ya que la proteólisis inespecífica de la LL parece ocasionar un mayor depósito de C3.

El tratamiento diseñado como control para el tratamiento de digestión con pronasa merece algunos comentarios. La presencia diferencial de la banda artefactual (“Banda X”) solamente en los carriles correspondientes a LL digerida con pronasa en la Figura 22 indica que el tratamiento control elegido no cumplió con el objetivo de controlar la permanencia de un remanente de actividad de pronasa en las muestras. Esta afirmación contrasta con el resultado del ensayo fluorogénico de la Figura 19, en el que no se detectó actividad proteolítica remanente luego de los lavados en ninguna de las muestras. Como se comenta en la sección Resultados, este ensayo fue realizado con un péptido fluorogénico (N-succinil-Ala-Ala-Phe-AMC) distinto al recomendado por la literatura (Bim-SCH<sub>2</sub>-Phe-Trp-Leu-OH; Bim: 1,7-dioxo-2,5,6-trimethyl-1H,7H-pyrazolo[1,2-a]pyrazol-3-yl-methyl [69], lo cual, sumado a fenómenos inherentes a la heterogeneidad del sistema y de dilución de la actividad proteolítica en los

sobrenadantes de los lavados, puede afectar su sensibilidad y explicar la aparente ausencia de actividad medida en aquel entonces. Además, como se explicó en la sección Resultados, los cocientes entre actividades proteolíticas remanentes en lavados sucesivos fueron mayores al cociente de dilución aplicado en cada lavado. Este apartamiento entre cocientes, que es indicativo de la separación que existe entre el sistema de estudio y uno hipotético libre de adsorción, es más marcada para la LL digerida con pronasa que para la LL de tratamiento control. Esto a su vez sugiere fuertemente que la incubación durante 18 horas a 37°C facilita la adsorción de la enzima sobre la LL, haciendo más difícil su posterior eliminación de la muestra. En consecuencia, el tratamiento control elegido no cumple con su función de justamente controlar para un posible remanente de actividad pronasa. Además, los resultados de la Figura 20 muestran que este tratamiento control tiene un efecto, aunque menor, sobre las proteínas convencionales asociadas a la LL, por lo que su utilización como un control del efecto de la digestión con pronasa sobre la capacidad activadora de complemento de la LL no es estrictamente correcta. De todas maneras, considerando que el efecto sobre las mucinas de la muestra control debería ser menor que sobre las proteínas convencionales asociadas a la LL, más accesibles, ese tratamiento control se empleó en el segundo ensayo de depósito de C3 sobre LL. Sin embargo, en ensayos futuros está previsto emplear un tratamiento control libre de agregado de pronasa. En estos ensayos se prevé, además, modificar los lavados previos a la incubación con complemento, de manera de efectivamente eliminar la pronasa de las muestras sometidas a digestión con la enzima. Por ejemplo, se podrían realizar 6 lavados con NaCl 2 M, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM seguidos por 3 lavados con VBS<sup>++</sup>, combinación que sometería a la muestra a un mayor número de lavados con alta fuerza iónica (responsables de la mayor reducción de la actividad proteolítica observada en la muestra), y que de todas maneras equilibraría a la muestra con el amortiguador adecuado antes de la incubación con complemento. Idealmente, debería adquirirse el péptido fluorogénico reportado como apto para medir actividad de pronasa, para verificar con él la ausencia de actividad proteolítica en un ensayo análogo al de la Figura 19. Adicionalmente, se prevé realizar la desnaturalización de las muestras previo a la siembra en SDS-PAGE a 100°C, para limitar las etapas durante las cuales un eventual remanente de pronasa pudiera actuar.

En el ensayo de activación de complemento sobre LL en comparación con zymosán (Figura 22), la ausencia de la “Banda X” en los carriles correspondientes a LL “control” (y a zymosán), valida en principio estas partes del experimento realizado, permitiendo efectuar un análisis comparativo preliminar de la cinética de depósito y posterior inactivación de C3 sobre LL y zymosán (Figura 23). Se pudo observar que ambas superficies generaron perfiles cinéticos distintos. Como se esperaba, en el caso de zymosán se obtuvo un perfil coherente con el de una superficie activadora: porcentaje de inactivación de C3b en ascenso paulatino pero sin alcanzar el 100 %, y depósito de

C3 total elevado. En el caso de la LL "control", se obtuvo un porcentaje de inactivación de C3b cercano al 100 % a partir de tiempos cortos de incubación, así como un depósito de C3 total menor que en el caso del zymosán, si bien esta comparación no es estrictamente válida por tratarse de partículas de distinta naturaleza física. Además, el tiempo al cual se observó la mayor cantidad de C3b sobre la LL fue menor al mismo parámetro en el caso de zymosán, reflejando otra vez la mayor velocidad de inactivación de C3b en el caso de la LL. En conjunto, estos datos evidencian preliminarmente la naturaleza de pobre activador del complemento de la LL, y en particular, su capacidad de regular la vía alterna, que se dispara por defecto sobre superficies carentes de mecanismos de regulación. Este resultado había sido inferido ya en 1996, en un ensayo donde se comparó la generación de productos de activación de complemento en la fase fluida por parte de distintos extractos solubles provenientes de la hidátide [61]. Más adelante, se verificó la presencia de factor H fuertemente adsorbido sobre la pared de la hidátide, verificándose la funcionalidad de dicho regulador solamente en ensayos en sistemas modelo con componentes purificados y en fase fluida [62]. Los estudios referentes a la activación del complemento por *E. granulosus* se retomaron en 2008, cuando se estudió por primera vez la activación del complemento y el control de la vía alterna del sistema sobre la LL a nivel de los componentes depositados sobre la propia superficie. En ese trabajo se infirió que la velocidad de inactivación de C3b observada sobre la LL correspondía a la de una superficie no activadora de la vía alterna (es decir, con sitios con afinidad por factor H) solamente por comparación con valores (de % de inactivación de C3b a diferentes tiempos) de la literatura [63]. El resultado preliminar aquí presentado es entonces la primera evidencia directa de que la inactivación de C3b sobre la LL es más rápida que sobre una superficie activadora, obtenida por comparación de valores obtenidos en un mismo experimento. En otras palabras (ya que se sabe que toda la actividad cofactor de factor I para la inactivación de C3b presente en la hidátide se debe a factor H), nuestros datos preliminares son la primera evidencia directa de que la LL efectivamente concentra sobre su superficie *actividad* de factor H. Está previsto repetir el ensayo utilizando LL sin ningún tratamiento, de nuevo en comparación con zymosán, esperándose confirmar los resultados preliminares aquí presentados.

Como se comentó al inicio de esta sección, se logró montar un sistema de detección de FH a partir de los reactivos disponibles, compatible con el material de trabajo. Este sistema se probó en un ensayo preliminar de unión *in vitro* de FH sobre LL sometidas a digestión con pronasa o a tratamiento "control" (Figura 15). En esta oportunidad, no se observó diferencias en la cantidad de FH adsorbido sobre un tipo de muestra y el otro. Más allá de las limitaciones ya discutidas del tratamiento "control" empleado, este resultado no sería coherente con la tendencia observada para los resultados de depósito de C3 sobre LL, ya que en principio se esperaría que se asociara un mayor depósito de C3 con una menor unión de FH. Sin embargo, dadas las condiciones

empleadas en el ensayo (que revela tanto las interacciones específicas como las no específicas entre FH y la LL), el resultado no es necesariamente incompatible con los otros resultados preliminares. El hecho de que se observó una adsorción generalizada de las proteínas del SHN sobre la LL (Figura 16) avala ampliamente la suposición de que se está detectando gran cantidad de FH adsorbido inespecíficamente. En un futuro está previsto modificar este ensayo incluyendo lavados con mayor fuerza iónica en el paso posterior a la incubación con SHN inactivado, de forma de recuperar preferencialmente el FH adsorbido a la LL por interacciones específicas. Se realizarían además análisis de las proteínas adsorbidas a la LL mediante SDS-PAGE, análogos al de la Figura 16, corriendo en paralelo una muestra de SHN para comparar directamente los perfiles obtenidos.

Finalmente, es nuestra intención que en la búsqueda de información acerca del sitio con afinidad por FH en la LL de *E. granulosus*, los dos enfoques propuestos (ensayos de depósito e inactivación *in vitro* de C3 sobre LL y ensayos de unión *in vitro* de FH) converjan. Es decir, que estos ensayos se realicen en paralelo sobre las mismas muestras, sometidas previamente a distintas modificaciones. Además de la proteólisis inespecífica con pronasa, que se realizará en condiciones optimizadas como ya se discutió, está previsto investigar el efecto de otras modificaciones, como ser la remoción de los depósitos de  $\text{InsP}_6$  cálcico, o la oxidación o eliminación enzimática de los residuos monosacáridos terminales de las mucinas. También se pretende estudiar los efectos de la digestión selectiva del péptido N-terminal no glicosilado de la aopmucina codificada en EGC0000317 (candidato más probable a unir FH), mediante el tratamiento con la endopeptidasa Glu-C, así como también de la eliminación selectiva de posibles grupos sulfato sobre residuos de tirosina, por tratamiento con ácido clorhídrico (incubación durante 4 minutos a 100°C con HCl 1M). Se planea además incluir al zymosán en ambos tipos de ensayo, como control de material particulado activador de la vía alternativa [71]. De esta manera, se obtendrá un panorama más completo de la cinética de activación e inactivación de C3 y reclutamiento físico de FH sobre la LL, en comparación con una superficie activadora del sistema complemento de referencia, sobre la cual se sabe que la inactivación de C3b a iC3b es lenta [71]. La LL sin tratar y, en el otro extremo, el zymosán servirán como referencias para evaluar el efecto de las modificaciones introducidas en la LL sobre su capacidad activadora del sistema complemento y su capacidad de unir factor H. En efecto, se espera que aquellos tratamientos que afecten los sitios de unión para FH sobre la LL, den lugar a comportamientos en los ensayos diferentes a los de la LL sin tratar y más cercanos a los del zymosán.

## Referencias

1. Thompson, R.C. and McManus, D.P., *Towards a taxonomic revision of the genus Echinococcus*. Trends Parasitol, 2002. **18**(10): p. 452-7.
2. Moro, P. and Schantz, P.M., *Echinococcosis: a review*. International Journal of Infectious Diseases, 2009. **13**: p. 125 - 133.
3. Moro, P. and Schantz, P.M., *Cystic Echinococcosis in the Americas*. Parasitology International, 2006. **55**: p. S181 - S186.
4. Torgerson, P.R., Carmona, C., and Bonifacino, R., *Estimating the economic effects of cystic echinococcosis: Uruguay, a developing country with upper-middle income*. Ann Trop Med Parasitol, 2000. **94**(7): p. 703-13.
5. Bortoletti, G. and Ferretti, G., *Ultrastructural aspects of fertile and sterile cysts of Echinococcus granulosus developed in hosts of different species*. Int J Parasitol, 1978. **8**(6): p. 421-431.
6. Rausch, R., *Studies on the helminth fauna of Alaska. XX. The histogenesis of the alveolar larva of Echinococcus species*. J Infect Dis, 1954. **94**(2): p. 178-86.
7. Díaz, A., et al., *Understanding the laminated layer of larval Echinococcus I: structure*. Trends Parasitol, 2011. **27**(5): p. 204-13.
8. Korc, I., et al., *Chemical characterization of the polysaccharide of the hydatid membrane of Echinococcus granulosus*. Exp Parasitol, 1967. **20**(2): p. 219-24.
9. Díaz, A., et al., *The major surface carbohydrates of the Echinococcus granulosus cyst: mucin-type O-glycans decorated by novel galactose-based structures*. Biochemistry, 2009. **48**(49): p. 11678-91.
10. Coltorti, E.A. and Varela-Díaz, V.M., *Echinococcus granulosus: Penetration of macromolecules and their localization in the parasite membranes of cysts*. Experimental Parasitology, 1974. **35**: p. 225-231.
11. Breijo, M., et al., *Echinococcus granulosus: the establishment of the metacestode is associated with control of complement-mediated early inflammation*. Exp Parasitol, 2008. **118**(2): p. 188-96.
12. Casaravilla, C., *Capa laminar de la larva de Echinococcus granulosus: estructura e interacciones con macrófagos y células dendríticas*, in *Cátedra de Inmunología*. 2011, Universidad de la República: Montevideo.
13. Steers, N.J., Rogan, M.T., and Heath, S., *In-vitro susceptibility of hydatid cysts of Echinococcus granulosus to nitric oxide and the effect of the laminated layer on nitric oxide production*. Parasite Immunol, 2001. **23**(8): p. 411-7.
14. Ferreira, A.M., et al., *Assessment of in vivo complement activation on the Echinococcus granulosus hydatid cyst wall*. Parasite Immunol, 2001. **23**(12): p. 655-8.
15. Walport, M.J., *Complement: First of two parts*. The New England Journal of Medicine, 2001. **344**(14): p. 1058 - 1067.
16. Dunkelberg, J.R. and Song, W., *Complement and its role in innate and adaptive immune responses*. Cell research, 2010. **20**: p. 34 - 50.
17. Molina, H., et al., *Markedly impaired humoral immune response in mice deficient in complement receptors 1 and 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**: p. 3357 - 3361.
18. Murphy, K., Travers, P., and Walport, M.J., eds. *Janeway's Immunology*. 7<sup>th</sup> ed. 2008, Mc Graw Hill.
19. Ochs, H.D., et al., *Complement, membrane glycoproteins, and complement receptors: their role in regulation of the immune response*. Clin Immunol Immunopathol, 1986. **40**(1): p. 94-104.
20. O'Neil, K.M., et al., *Role of C3 in humoral immunity. Defective antibody production in C3-deficient dogs*. J Immunol, 1988. **140**(6): p. 1939-45.

21. Carter, R.H. and Fearon, D.T., *CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes*. Science, 1992. **256**(5053): p. 105-7.
22. Sarma, J.V. and Ward, P.A., *The complement system*. Cell Tissue Res, 2011. **343**: p. 227 - 235.
23. Law, S.K. and Dodds, A.W., *The internal thioester and the covalent binding properties of the complement proteins C3 and C4*. Protein Sci, 1997. **6**(2): p. 263-74.
24. Janssen, B.J.C., et al., *Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity*. Nature, 2005. **437**: p. 505 - 511.
25. Janssen, B.J., et al., *Structure of C3b reveals conformational changes that underlie complement activity*. Nature, 2006. **444**(7116): p. 213-216.
26. Sim, R.B., et al., *Complement Factor I and Cofactors in Control of Complement System Convertase Enzymes*. Methods in Enzymology, 1993. **223**: p. 13 - 35.
27. Schreiber, R.B., Pangburn, M.K., and Müller-Eberhard, H.J., *C3 modified at the thioester site: acquisition of reactivity with cellular C3b receptors* Bioscience reports, 1981. **1**: p. 873 - 880.
28. Pangburn, M.K., Schreiber, R.B., and Müller-Eberhard, H.J., *Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3*. J Exp Med, 1981. **154**: p. 856 - 867.
29. Law, S.K., Lichtenberg, N.A., and Levine, R.P., *Evidence for an ester linkage between the labile binding site of C3b and receptive surfaces*. J Immunol, 1979. **123**(3): p. 1388 - 1394.
30. Dodds, A.W. and Sim, R.B., eds. *Complement, a practical approach*. Practical Approach Series. 1997, Oxford University Press. Vol. 182.
31. Bokisch, V.A., Müller-Eberhard, H.J., and Cochrane, C.G., *Isolation of a fragment (C3a) of the third component of human complement containing anaphylatoxin and chemotactic activity and description of an anaphylatoxin inactivator of human serum*. J Exp Med, 1969. **129**: p. 1109 - 1130.
32. Ross, G.D., et al., *Generation of three different fragments of bound C3 with purified factor I or serum. I. Requirements for factor H vs CR1 cofactor activity*. J Immunol, 1982. **129**: p. 2051 - 2060.
33. Dodds, A.W. and Law, S.K.A., *The phylogeny and evolution of the thioester-bond containing proteins C3, C4 and  $\alpha_2$ -macroglobulin*. Immunological reviews, 1998. **166**: p. 15 - 26.
34. De Bruijn, M.H.L. and Fey, G.H., *Human complement component C3: cDNA coding sequence and derived primary structure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**: p. 708 - 712.
35. Arlaud, G.J., et al., *Deciphering complement mechanisms: The contributions of structural biology*. Mol Immunol, 2007. **44**: p. 3809 - 3822.
36. Abdul Ajees, A., et al., *The structure of complement C3b provides insights into complement activation and regulation*. Nature, 2006. **444**(7116): p. 221-5.
37. Götze, O. and Müller-Eberhard, H.J., *The role of properdin in the alternate pathway of complement activation*. J Exp Med, 1974. **139**: p. 44 - 57.
38. Fearon, D.T. and Austen, F., *Properdin: Initiation of alternative complement pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(8): p. 3220 - 3224.
39. Maves, K.K. and Weiler, J.M., *Properdin: Approaching Four Decades of Research*. Immunol Res, 1993. **12**: p. 233 - 243.
40. Nolan, K.F. and Reid, K.B.M., *Properdin*. Methods in Enzymology, 1993. **223**: p. 35 - 46.
41. Farries, T.C., Lachmann, P.J., and Harrison, R.A., *Analysis of the interaction between properdin and factor B, components of the alternative-pathway C3 convertase of complement*. Biochem J, 1988. **253**(3): p. 667-75.

42. Farries, T.C., Lachmann, P.J., and Harrison, R.A., *Analysis of the interactions between properdin, the third component of complement (C3), and its physiological activation products*. *Biochem J*, 1988. **252**(1): p. 47-54.
43. Liszewski, M.K., et al., *Control of the complement system*. *Adv Immunol*, 1996. **61**: p. 201-83.
44. Nilsson, S.C., et al., *Complement factor I in health and disease*. *Mol Immunol*, 2011. **48**: p. 1611 - 1620.
45. Zipfel, P.F. and Skerka, C., *Complement factor H and related proteins: an expanding family of complement-regulatory proteins?* *Immunology Today*, 1994. **15**(3): p. 121 - 126.
46. Sim, R.B., *Factor H*, in *Human Protein Data*. 1992.
47. Reid, K.B.M. and Day, A.J., *Structure-function relationships of the complement components*. *Immunology Today*, 1989. **10**: p. 177 - 180.
48. Perkins, S.J., Nealis, A.S., and Sim, R.B., *Oligomeric domain structure of human complement factor H by X-ray and neutron solution scattering*. *Biochemistry*, 1991. **30**(11): p. 2847-57.
49. DiScipio, R.G., *Ultrastructures and interactions of complement factors H and I*. *J Immunol*, 1992. **149**: p. 2592 - 2599.
50. Fearon, D.T., *Regulation by membrane sialic acid of  $\beta$ 1H-dependent decay-dissociation of amplification C3 convertase of the alternative complement pathway*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978. **75**: p. 1971 - 1975.
51. Pangburn, M.K. and Müller-Eberhard, H.J., *Complement C3 convertase: Cell surface restriction of  $\beta$ 1H control and generation of restriction on neuraminidase-treated cells*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978. **75**: p. 2416 - 2420.
52. Gordon, D.L., et al., *Identification of complement regulatory domains in human factor H*. *J Immunol*, 1995. **155**: p. 348 - 356.
53. Kühn, S., Skerka, C., and Zipfel, P.F., *Mapping of the complement regulatory domains in the human factor H-like protein 1 and in factor H1*. *J Immunol*, 1995. **155**: p. 5663 - 5670.
54. Blackmore, T.K., et al., *Identification of the second heparin-binding domain in human complement factor H*. *J Immunol*, 1998. **160**: p. 3342 - 3348.
55. Ram, S., et al., *A novel sialic acid binding site on factor H mediates serum resistance of sialylated *Neisseria gonorrhoeae**. *J Exp Med*, 1998. **187**(5): p. 743-52.
56. Jokiranta, T.S., et al., *Each of the three binding sites on complement factor H interacts with a distinct site on C3b*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(36): p. 27657-62.
57. Kajander, T., et al., *Dual interaction fo factor H with C3d and glycosaminoglycans in host-nonhost discrimination by complement*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011. **108**(7): p. 2897 - 2902.
58. Sjoberg, A.P., Trouw, L.A., and Blom, A.M., *Complement activation and inhibition: a delicate balance*. *Trends Immunol*, 2009. **30**(2): p. 83-90.
59. Díaz, A., et al., *Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* II: immunology*. *Trends Parasitol*, 2011. **27**(6): p. 264-73.
60. Ferreira, A.M., et al., *How *Echinococcus granulosus* deals with complement*. *Parasitol Today*, 2000. **16**(4): p. 168-72.
61. Irigoín, F., et al., *Comparison of complement activation in vitro by different *Echinococcus granulosus* extracts*. *Parasite Immunol*, 1996. **18**(7): p. 371-5.
62. Díaz, A., Ferreira, A., and Sim, R.B., *Complement evasion by *Echinococcus granulosus*: sequestration of host factor H in the hydatid cyst wall*. *J. Immunol.*, 1997. **158**(8): p. 3779-3786.
63. Irigoín, F., et al., *Resistance of the *Echinococcus granulosus* cyst wall to complement activation: analysis of the role of  $InsP_6$  deposits*. *Parasite Immunol*, 2008. **30**(6-7): p. 354-64.

64. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
65. Law, S.K. and Levine, R.P., *Interaction between the third complement protein and cell surface macromolecules*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. **74**(7): p. 2701-5.
66. Sim, E., et al., *Monoclonal antibodies against the complement control protein factor H (beta 1 H)*. *Biosci Rep*, 1983. **3**(12): p. 1119-31.
67. *Antibody purification: handbook*. 2002: Amersham Biosciences AB.
68. Sim, R.B. and Sim, E., *Autolytic fragmentation of complement components C3 and C4 under denaturing conditions, a property shared with alpha 2-macroglobulin*. *Biochem J*, 1981. **193**(1): p. 129-41.
69. Barret, A.J., Rawlings, N.D., and Woessner, J.F., eds. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 2<sup>nd</sup> ed. 2004, Elsevier Academic Press. Vol. 1 p. 395 - 396.
70. Casaravilla, C. and Díaz, A., *Studies on the structural mucins of the Echinococcus granulosus laminated layer*. *Mol Biochem Parasitol*, 2010.
71. Fearon, D.T. and Austen, K.F., *Activation of the alternative complement pathway due to resistance of zymosan-bound amplification convertase to endogenous regulatory mechanisms*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. **74**(4): p. 1683-7.
72. Super, M., Levinsky, R.J., and Turner, M.W., *The level of mannan-binding protein regulates the binding of complement-derived opsonins to mannan and zymosan at low serum concentrations*. *Clin Exp Immunol*, 1990. **79**(2): p. 144-50.