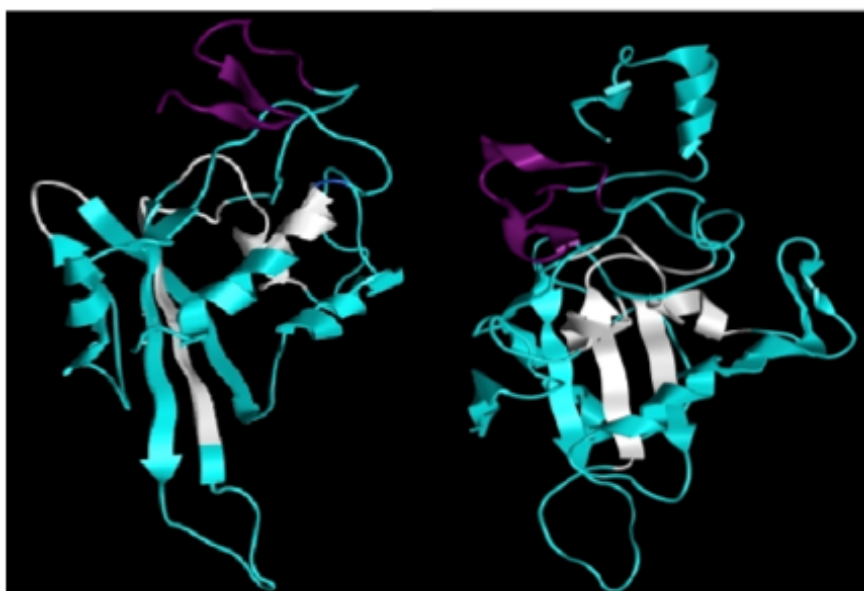


**Tesis de Maestría - PEDECIBA Biología
Biología Celular y Molecular**

**“Caracterización, producción y encapsulación de
proteínas CAPs de *Echinococcus granulosus* para
el desarrollo de una nanovacuna”**



Lic. María Cecilia Silvarrey

Montevideo, Agosto 2015

Tribunal:

Dra. Estela Castillo

Dra. Verónica Fernández

Dr. Eduardo Méndez

Orientación:

Dra. Adriana Esteves

RESUMEN

La Hidatidosis, causada por el cestodo *Echinococcus granulosus*, es una zoonosis parasitaria extendida mundialmente. Además, es una de las zoonosis parasitarias más importantes reportadas en Uruguay, Argentina, Brasil, Chile y Perú. Las pérdidas causadas por esta enfermedad se miden en términos de pérdidas económicas y de vidas. Si bien existen drogas tenicidas con buena eficiencia en perros como el praziquantel, para el hombre el tratamiento actual es el quirúrgico.

En las últimas 5 décadas, se ha intentado con escaso éxito, la generación de vacunas contra la hidatidosis. En 1996 se dio a conocer el desarrollo de la vacuna recombinante EG95 contra *E. granulosus* obteniendo un 96-98% de protección en ovejas vacunadas. En un primer estudio de impacto se detectaron dificultades operativas en el terreno para la aplicación de la vacuna. La vacunación de los perros significa un método de control complementario rentable, debido a que hay muchos menos perros que ovejas en las zonas donde el parásito es endémico, por lo tanto, se deben vacunar menos animales.

Algunas de las proteínas usadas como candidatos para el desarrollo de vacunas contra nematodos son las proteínas pertenecientes a la superfamilia CAP, con las cuales se obtuvieron resultados promisorios. En este trabajo, se han estudiado detalladamente las características estructurales de dos proteínas con el dominio CAP, expresadas en la etapa larval de *E. granulosus*, y su relación filogenética con otros miembros de esta superfamilia de proteínas, para ser usadas en el desarrollo de una nanovacuna oral, a ser aplicada en perros. Estas proteínas fueron llamadas EgVAL1 y EgVAL2.

Los estudios bioinformáticos indicaron que ambas proteínas presentan la estructura típica de la superfamilia y evidenciaron diferencias discretas entre EgVAL1 y EgVAL2, que podría indicar diferentes funciones.

Previo a nuestro trabajo, otros investigadores intentaron producir proteína suficiente utilizando distintos sistemas de expresión, lo que no fue logrado con éxito. Aquí, se logró producir cantidad suficiente de proteína para obtener anticuerpos y formular las nanopartículas poliméricas, utilizando como sistema de expresión distintas cepas de *E. coli*. Mediante la encapsulación de las EgVALs en nanopartículas poliméricas recubiertas con quitosan se logró obtener partículas con los parámetros deseado. Además, la encapsulación permitió preservar el antígeno cuando este fue sometido a las condiciones gastrointestinales. Futuros ensayos serán necesarios para evaluar la eficacia de estos antígenos en la generación de una vacuna para ser administrada de forma oral en perros.

Índice

1. Introduccion

1.1 <i>Echinococcus granulosus</i> e hidatidosis.....	7
1.1.1 Ciclo de vida de <i>Echinococcus granulosus</i>	7
1.1.2 Hidatidosis.....	8
1.1.3 Control de la hidatidosis.....	10
1.1.4 Tratamiento contra la hidatidosis.....	11
1.1.5 Inmunidad contra <i>E. granulosus</i> en perros infectados.....	12
1.1.6 Vacunas contra la hidatidosis.....	14
1.2 Proteínas de la superfamilia CAP.....	17
1.2.1 Proteínas CAPs de helmintos.....	19
1.2.2 Antecedentes de trabajo con proteínas CAPs de cestodos en la sección Bioquímica.....	20
1.2.3 Proteínas CAPs de helmintos como candidatos vacunales.....	22
1.3 Nanopartículas como sistema de entrega de antígenos.....	23
1.3.1 Polímeros sintéticos para la formulación de nanopartículas.....	26
1.3.2 Usos de nanopartículas para el desarrollo de vacunas orales.....	26

2. Objetivos

2.1 Objetivo general.....	28
2.2 Objetivos específicos.....	28

3. Materiales y métodos

3.1 Caracterización de EgVAL1 y EgVAL2.....	29
3.1.1 Estudios bioinformáticos.....	29

3.1.2 Modelado por homología de las EgVALs.....	30
3.1.3 Reconstrucción filogenética.....	30
3.2 Expresión y purificación de las EgVALs.....	31
3.2.1 Estudios de expresión de EgVAL2.....	31
3.2.2 Análisis de la expresión.....	31
3.2.3 Ruptura de las células.....	32
3.2.4 Purificación de EgVAL2 por cromatografía de afinidad.....	32
3.2.5 Optimización de la secuencia nucleotídica de EgVAL1.....	32
3.2.6 Clonado del fragmento optimizado.....	33
3.2.7 Estudios de expresión de EgVAL1 optimizada.....	34
3.3 Depleción de los sueros anti-EgVAL1 y anti-EgVAL2.....	34
3.4 Encapsulación de EgVAL1 y EgVAL2.....	34
3.4.1 Nanoprecipitación.....	34
3.4.2 Doble emulsión con evaporación del solvente.....	35
3.4.3 Recubierta de las nanopartículas con Chitosán.....	36
3.4.4 Calculo de la eficiencia de encapsulación.....	36
3.5 Estudios de estabilidad de las nanopartículas formuladas.....	36
3.5.1 Estudios de estabilidad de las nanopartículas en jugos gástrico e intestinal artificiales.....	36
3.5.2 Western Blot.....	37
3.5.3 Estudios de estabilidad de las nanopartículas durante el almacenamiento.....	37

4. Resultados

4.1 Caracterización de EgVAL1 y EgVAL2.....	38
4.1.1 Topología de secuencia.....	39

4.1.2 Reconstrucciones filogenéticas.....	41
4.1.3 Comparación con proteínas CAPs de helmintos.....	42
4.1.4 Modelado por homología.....	46
4.2 Expresión de las proteínas EgVAL1 y EgVAL2.....	53
4.2.1 Estudios de expresión de EgVAL2.....	53
4.2.2 Optimización de la secuencia de EgVAL1 para la expresión en <i>E. coli</i>	55
4.2.3 Clonado del fragmento optimizado.....	58
4.2.4 Estudios de expresión de EgVAL2 optimizada.....	59
4.3 Encapsulación de las EgVALs en nanopartículas poliméricas.....	63
4.3.1 Encapsulación de proteínas por el método de nanoprecipitación.....	63
4.3.2 Encapsulación de proteínas por el método de doble emulsión con evapoación del solvente.....	65
4.3.3 Calculo de la eficiencia de encapsulación.....	68
4.3.4 Encapsulación de EgVAL1 y EgVAL2 en nanopartículas de PLA por el método de doble emulsión con evaporación del sovlente.....	69
4.3.5 Determinación del potencial zeta de las nanopartículas formuladas.....	69
4.3.6 Eficiencia de encapsulación de las EgVALs.....	69
4.3.7 Recubrimiento de las nanopartículas con Chitosán.....	70
4.3.8 Estudio de la estabilidad de las nanopartículas en jugo gástrico e intestinal artificial.....	71
4.3.9 Estudio de la estabilidad de las nanopartículas durante el almaceniamiento.....	72
5. Discusión.....	74
6. Bibliografía.....	89

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Echinococcus granulosus* e hidatidosis

1.1.1 Ciclo de vida de *Echinococcus granulosus*

El género *Echinococcus*, (Platyhelminthes; Cestoda; Eucestoda; Cyclophyllidae; Taenidae) está representado por 9 especies validadas: *E. granulosus*, *E. felidis*, *E. multilocularis*, *E. shiquicus*, *E. equinus*, *E. oligarthra*, *E. vogeli*, *E. orteppi* y *E. canadiensis* (Thompson y McManus 2002; Xiao *et al.*, 2005; Nakao *et al.*, 2007; Huttner *et al.*, 2008).

Los carnívoros (cánidos y félidos) sirven como hospederos definitivos para el estadio adulto de *Echinococcus spp.* luego de ingerir vísceras de los mamíferos infectados con el estadio larvario, mientras que los herbívoros (roedores, lagomorfos y ungulados) se convierten en hospederos intermediarios para las larvas, por la ingestión de huevos presentes en las heces de los carnívoros. Los seres humanos son hospederos accidentales de las larvas de *Echinococcus spp.*, los cuales se infectan al ingerir los huevos presentes en alimentos, agua, suelos y animales domésticos carnívoros (Nakao *et al.*, 2013).

Echinococcus granulosus es un parásito de importancia médica debido a que infecta al menos 50 millones de personas a nivel mundial (Zheng *et al.*, 2013). El ciclo de vida se desarrolla en perros y otros cánidos (hospedero definitivo), en donde se produce la etapa sexual, y en ovejas, cabras, cerdos, vacas, etc. (hospederos intermediarios), en donde ocurre el estadio larvario. El adulto de *E. granulosus* reside en el intestino delgado de su hospedero definitivo, en donde elimina los huevos a través de las heces. Estos huevos son ingeridos por el hospedero intermediario en donde eclosionan y liberan las oncósferas, las cuales penetran en la pared intestinal y migran a través de la circulación sanguínea y linfática alcanzando varios órganos, especialmente el hígado y los pulmones. Una vez allí, la oncósfera se enquistas (estadio larvario) y los quistes crecen hasta producir protoescólices. El hospedero definitivo se infecta al ingerir vísceras con quistes de los hospederos intermediarios. Luego de la ingesta, los protoescólices se evaginan, se adhieren a la mucosa intestinal y se transforman en adultos, iniciando el ciclo nuevamente (Figura 1).

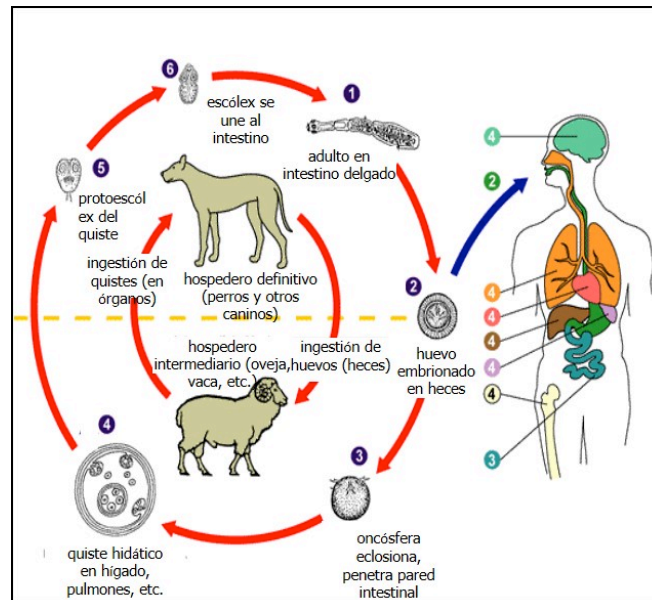
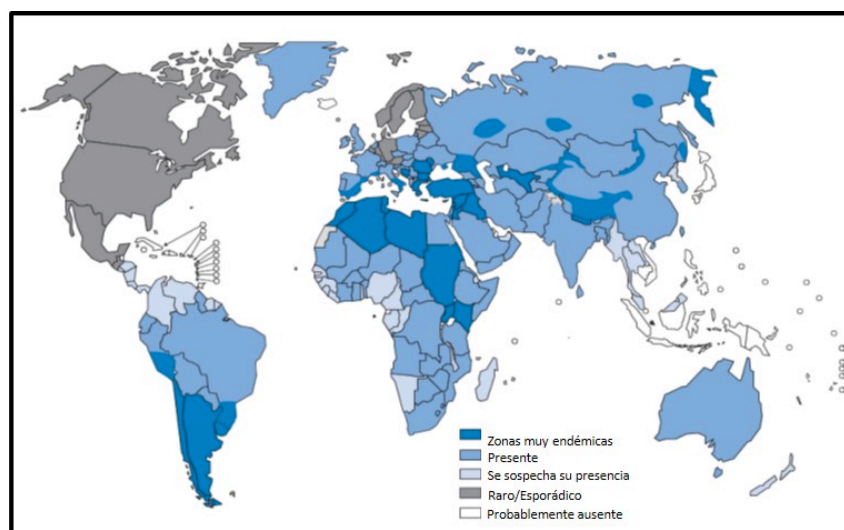


Figura 1. Ciclo biológico de *Echinococcus granulosus*. Los números indican los diferentes estadios larvarios. Modificado de <http://www.cdc.gov/parasites/echinococcosis/>.

1.1.2 Hidatidosis

La hidatidosis, también llamada echinococcosis quística, es una zoonosis causada por la forma larvaria de *E. granulosus* (metacestodo), extendida a nivel mundial (Moro y Schantz, 2006, Romig *et al.*, 2006, Magambo *et al.*, 2006, Thompson *et al.*, 2014) (Figura 2). Es de destacar que esta enfermedad es una de las más importantes zoonosis parasitaria reportada en Uruguay, Argentina, Brasil, Chile y Perú (Irabedra y Salvatella, 2010; Larrieu y Zanini,



2012).

Figura 2: Distribución de *E. granulosus* y la hidatidosis en el mundo (Modificado de informe WHO 2010).

En estos países, las condiciones ideales para el ciclo de la enfermedad se generan debido a la cría de ovejas y la cantidad de perros asociados a este trabajo, agravadas por el sacrificio de ovejas adultas para el consumo doméstico y el hecho de que los perros se alimenten de las vísceras infectadas. Se estima que alrededor de 2000 nuevos casos son notificados anualmente por esta región de Sudamérica (Moro y Schantz, 2006; Larrieu 2004).

Las pérdidas causadas por la hidatidosis se miden en términos de pérdidas económicas, de inhabilitación para trabajar y muertes. Los gastos generados por la enfermedad son de aproximadamente 4,1 mil millones de dólares al año, de los cuales 46% se asocia con el tratamiento humano y la morbilidad, y el 54% a los costos que genera la sanidad animal (informe WHO, 2010). Las pérdidas económicas a causa de la hidatidosis en la industria ganadera mundial se ha estimado en más de 2 mil millones de dólares anuales (Otero-Abad y Torgerson, 2013). A pesar del considerable impacto socioeconómico, la hidatidosis sigue siendo una enfermedad zoonótica desatendida; la Organización Mundial de la Salud ha incluido recientemente a la equinococosis humana dentro del grupo de las enfermedades desatendidas, y recomienda una estrategia de salud pública veterinaria como parte de un enfoque de control eficaz.

En Uruguay, mediante ecografía, se detectaron niveles de prevalencia de 1 a 2% en habitantes en áreas de riesgo (zonas rurales, centros poblados pequeños, áreas de contexto socioeconómico crítico) (Uruguay, Comisión Nacional de Zoonosis, Plan Estratégico 2006 – 2009). El test de ELISA coproantígeno, dio como resultado un 6,4% de predios infectados y dentro de ellos se reportó un 4,3% de perros positivos (Ferreira, 2006).

Estudios en poblaciones rurales de 13 departamentos del país revelaron que un 22.2% de hogares mantienen la práctica de alimentar a sus perros con vísceras, las que pueden estar infectadas con la forma larvaria, continuando así el ciclo del parásito hacia la forma adulta (Elola, 2009).

Se ha identificado a los perros domésticos como la principal fuente de infección para los seres humanos. Controlar la infección parasitaria en estos animales es crucial para reducir la incidencia de la hidatidosis.

1.1.3 Control de la hidatidosis

Los primeros programas de control en América del Sur fueron basados en las experiencias de los programas en las islas de Tasmania y Nueva Zelanda donde desparasitaron a los perros con praziquantel, un tenicida 100% eficaz contra el estadio adulto de *E. granulosus*. A partir de esta experiencia, se planificaron nuevos programas de control de la hidatidosis con éxito variable en el sur de Chile (1979-1997), Uruguay (1965-al presente) y el centro-sur de Argentina (1970-al presente) (informe WHO, 2010), así como en Brasil y Perú (Larrieu y Zanini, 2012).

El nuevo plan de control en estos países consistía en usar una dosis de praziquantel de 5 mg / kg en todos los perros en las zonas rurales, administrando el tratamiento cada 45 días. Así, a pesar de las reinfecciones constantes, los parásitos no alcanzarían la etapa de gravidez en los intestinos de los perros, y por lo tanto, los huevos no serían liberados en las heces. Si estas acciones eran sostenidas durante 10 años, período estimado necesario para reemplazar todas las ovejas infectadas con nuevos animales y para la inactivación de huevos preexistentes en el medio ambiente, el parásito podría ser erradicado (Eckert et al., 2001). Sin embargo, este plan de control tuvo importantes desafíos: gran infraestructura de campo a controlar, grandes poblaciones de perros ampliamente distribuidas y de difícil acceso, y finalmente contar con financiación durante todo el período que lleve el programa.

El programa de control de la hidatidosis en Uruguay fue lanzado en 1992 a través de la Comisión de Lucha contra la Hidatidosis, con vínculos administrativos con el sector de la salud. A principio de 1992, la tasa de infección en el ganado ovino era de aproximadamente 40%. El programa nacional fue reestructurado, llevando a cabo la desparasitación de los perros cada 30 días. Este hecho aumentó la cobertura del programa, involucrando veterinarios y vehículos todo terreno, financiado con el cobro de patente a los dueños de los perros. En 1995, la desparasitación era llevada a cabo en más de 90% del país; para 1997, la tasa de prevalencia entre los perros se redujo drásticamente de 10,7 en 1991 a 0,7%, y en consecuencia, la incidencia nacional en los seres humanos cayó de 11,3 /100.000 en 1993 a 6,5 / 100.000 individuos (Economides et al 2001 WHO; Cabrera et al 2003). En este punto, el modelo uruguayo había sido exitoso y estaba en camino de erradicar *E. granulosus* en Uruguay en 5 años.

En 2006-2007, los cambios políticos dieron lugar a cambios estructurales y la Comisión para

la lucha contra la hidatidosis se rebautizó con el nombre Comisión de Control de zoonosis. Se introdujeron nuevos sistemas de vigilancia y se adoptaron nuevas iniciativas como por ejemplo la castración de la población canina. Al momento, no se conocen los nuevos datos de prevalencia en nuestro país (Larrieu y Zanini, 2012).

La educación sanitaria, el control de faena y la desparasitación canina, fueron herramientas suficientes para la erradicación de la hidatidosis en ámbitos insulares, como Islandia, Tasmania y Nueva Zelanda. Sin embargo, estos logros no se pudieron repetir en ámbitos continentales.

1.1.4 Tratamiento de la hidatidosis

La elección de un tratamiento óptimo para la hidatidosis, debe evaluarse cuidadosamente en cada caso. No hay un tratamiento que sea mejor que otro y no existen datos comparativos de las diferentes modalidades de tratamiento: cirugía, quimioterapia y la técnica PAIR (punción - aspiración - inyección - re-aspiración). La elección del tratamiento es compleja y se basa en las características del quiste, en la experiencia y disponibilidad del equipo médico y la disposición de los pacientes a la vigilancia a largo plazo (Brunetti *et al.*, 2010).

La cirugía sigue siendo el tratamiento de elección para remover al quiste totalmente. Sin embargo, como nombramos anteriormente, existen tratamientos alternativos y/o complementarios como son el empleo de derivados imidazólicos. El albendazol actúa uniéndose a la beta-tubulina parasitaria inhibiendo así la polimerización de la tubulina y el transporte de glucosa microtúbulo dependiente. Este tratamiento ha demostrado resultados promisorios y tiene sus mayores indicaciones en hidatidosis múltiples, en pacientes de alto riesgo quirúrgico o inoperables, en hidatidosis ósea, cuando el paciente rechaza la cirugía y como quimioprofilaxis pre y postoperatoria. También se utilizan otros derivados imidazólicos como mebendazol y praziquantel. La quimioterapia parece ser más efectiva en pacientes jóvenes, probablemente debido a que los quistes pequeños de paredes finas y los quistes secundarios, son más susceptibles a este tratamiento (Gemmell *et al.*, 2001; Muñoz, 2007; Brunetti *et al.*, 2010).

Otra opción para el tratamiento de casos de hidatidosis, especialmente hepática, es la técnica PAIR. La punción quística se efectúa bajo monitoreo ultrasonográfico, se aspira el contenido y se inyectan, gota a gota, agentes escolicidas (alcohol 70-95%, solución salina 15-20% y

solución de cetrimida 0.5% son las más recomendadas), dentro de la cavidad para luego reaspirar después de al menos 15 minutos. Esta técnica, poco invasiva, ha demostrado tener excelentes resultados en pacientes en los cuales la cirugía no es posible o está contraindicada. Con esta técnica, el tiempo de hospitalización es menor, lo que conlleva un menor gasto en comparación con la cirugía (Gemmell *et al.*, 2001; Muñoz, 2007; Brunetti *et al.*, 2010).

1.1.5 Inmunidad contra *E. granulosus* en perros infectados

Una vez que el parásito llega al intestino del perro, el escólex penetra las criptas de Lieberkühn del intestino delgado y ocasionalmente, la lámina propia, lo que normalmente resulta en daño al epitelio de la mucosa. De esta manera, el parásito queda separado del sistema inmune del perro como son las células productoras de inmunoglobulinas, especialmente IgA sintetizada en la lámina propia, por una línea de células epiteliales del intestino (Zhang *et al.*, 2008).

El primer reporte de inmunidad adquirida fue de Gemmell y colaboradores (1986), quienes mostraron que la infección experimental de perros con *E. granulosus* daba lugar a una disminución del número de gusanos adultos resultantes, pero no estaba claro si se debía a la resistencia innata o factores genéticos de los perros. Sin embargo, los animales de más edad infectados naturalmente presentaron menor prevalencia en comparación con los individuos más jóvenes, lo que proporciona una fuerte evidencia de que los perros se vuelven parcialmente resistentes a la reinfección.

Al-Alkhalidi y Barriga (1986a) demostraron que la respuesta inmune contra *E. granulosus* está mediada por células T. Posteriormente, los mismos autores reportaron que hay una respuesta humoral dependiente de IgG e IgA sistémica y de IgA de mucosas. Por otro lado, animales infectados presentaron un test de hipersensibilidad de piel positivo frente a los antígenos del gusano adulto y de protoescolices, indicando que existe una respuesta específica de mucosas por el aumento de IgA y que además hay una respuesta alérgica mediada por IgE (Al-Alkhalidi y Barriga, 1986b).

Más adelante, otros autores también reportaron que en los perros infectados con *E. granulosus* se genera una respuesta inmune tanto local (en las placas de Peyer), como sistémica (Figura 3). Por otro lado, no existe asociación entre la respuesta IgA y la carga de parásitos en los perros, pero existe una correlación inversa entre el nivel de IgE antiparasitaria y la carga de parásitos al final de la infección (Zhang *et al.*, 2008).

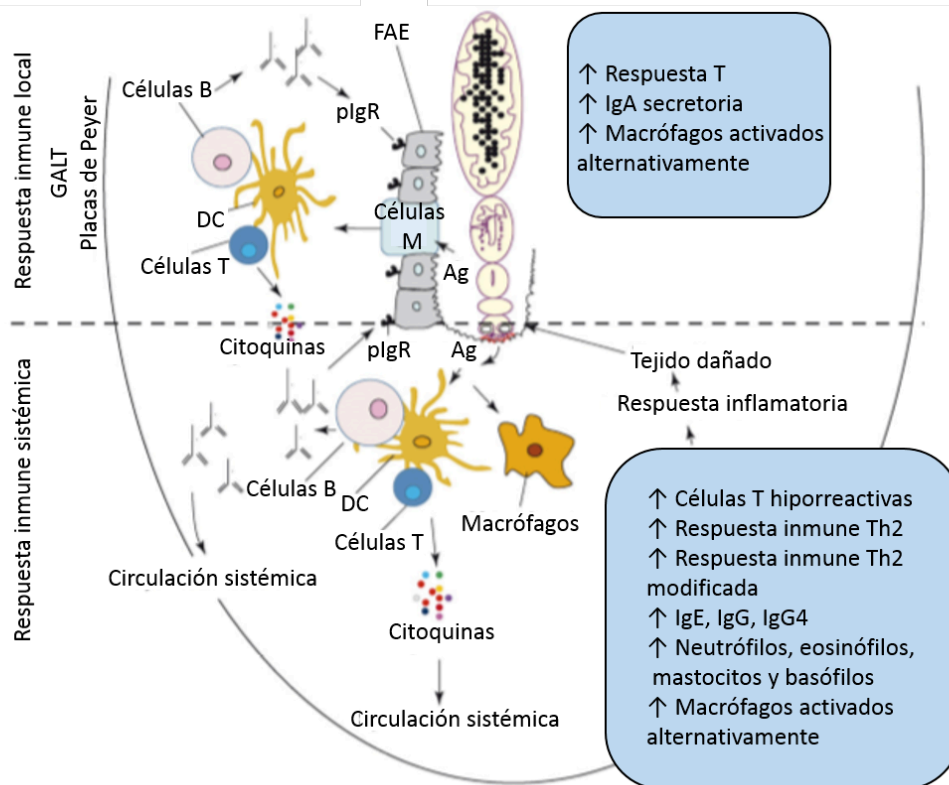


Figura 3. Respuesta inmune de mucosa local y sistémica contra *E. granulosus* en un perro infectado. El epitelio asociado a folículos (FAE), que cubre a las placas de Peyer, presentes en el tejido linfóide asociado a mucosas (GALT), contiene células M especializadas en internalizar los antígenos de los parásitos y transferirlos a las células dendríticas locales (DCs). A su vez, las DCs presentan los antígenos a las células B y T, las cuales producen anticuerpos y citoquinas respectivamente. Las células epiteliales del intestino expresan al receptor de inmunoglobulina polimérica (pIgR), que median el pasaje transcelular de los anticuerpos al lumen intestinal. Las DCs de la mucosa presentan antígenos al sistema inmune sistémico para estimular a las células B y T. Durante la infección, muchos parámetros inmunológicos (detallados en los cuadros celestes) se incrementan en ambos tipos de respuestas lo que resulta en una inflamación que daña el tejido epitelial del intestino. Adaptado de Zhang *et al.*, 2008.

Existe gran similitud entre la inflamación causada por las respuestas inmunes alérgicas a diferentes alérgenos ambientales y la respuesta causada por algunos antígenos de helmintos. La respuesta inmune en ambas situaciones se caracteriza por una respuesta predominante del tipo Th2 y la consecuente regulación positiva de las citoquinas IL-4, IL-5 e IL-13. Generalmente, esta respuesta es acompañada por una eosinofilia tisular, secreción de mucus y una aumento de los anticuerpos IgE (Afifi *et al.*, 2015).

Si bien existen estudios acerca de la inmunidad protectora contra *E. granulosus* en su hospedero definitivo, esta es escasa y se necesita mayor información para definir los mecanismos responsables de la misma. Dado los antecedentes, la generación de una respuesta de hipersensibilidad del tipo I, caracterizada por una reacción alérgica con aumento de IgE provocada por re-exposición a un alérgeno, en el intestino del perro lograría la expulsión de los gusanos adulto. El uso de proteínas alergénicas para la generación de una vacuna contra *E. granulosus* parece ser una buena estrategia.

1.1.6 Vacunas contra la hidatidosis

En las últimas 5 décadas, se ha intentado con escaso éxito, la generación de vacunas contra la hidatidosis. En 1996 se dio a conocer el desarrollo de la vacuna recombinante EG95 contra *E. granulosus*. EG95 es una proteína recombinante, cuyo ADNc fue clonado a partir de ARN mensajero obtenido de la oncósfera del parásito y se expresó como una proteína de fusión. Se demostró que EG95, aplicada junto con el adyuvante QuilA en ovejas, protege frente a la infección al inducir anticuerpos específicos contra la oncósfera del parásito (Lightowlers *et al.*, 1996). Las ovejas vacunadas con EG95 y desafiadas con oncósferas viables mostraron una protección de 96-98% contra el desarrollo de hidatidosis. Esta vacuna ha mostrado ser efectiva en diferentes especies de hospederos intermediarios, cabras, ovejas y bovinos (Heath *et al.*, 2003, Larrieu *et al.*, 2013). En un primer estudio de impacto se detectaron dificultades operativas en terreno para la aplicación de la vacuna: instalaciones deficientes, amplitud del periodo de parición, venta y movimiento de corderos vacunados, costos operativos para su aplicación y otros problemas tal como la sequía (Larrieu, 2013).

Las pruebas de vacunas hechas con extractos de parásitos para inmunizar perros contra infecciones repetidas por *E. granulosus* han generado diversos niveles de inmunidad. Los primeros intentos de desarrollar una vacuna contra *E. granulosus* en perros fueron realizados por Turner y colaboradores (1933), utilizando antígenos extraídos de protoescolices o de la pared de quistes hidáticos. El preparado fue inyectado intramuscularmente a intervalos de 3-6 días y a los 6-15 días, los perros fueron desafiados con protoescolices vivos. En 8 perros vacunados se encontraron de 0-6 gusanos adultos, mientras que los perros usados como grupo control presentaban grandes cantidades de gusanos. A continuación, realizaron un ensayo con 106 perros en donde solo la mitad de los vacunados resistieron la infección, comparado con el 95% de infección que se registró en los perros control.

Matov y Vasilev, en 1955, reportaron una protección parcial en perros vacunados con extractos de protoescólices. Forsek y Rukavina (1959), utilizaron pared de quiste y líquido hidático, logrando cierto grado de protección. Gemmel (1962b), mostró que la vacunación con antígenos preparados a partir de protoescólices o gusanos adultos liofilizados y administrados una vez con adyuvante basado en aceite o cinco veces sin adyuvante, reducía significativamente el número de gusanos adultos que se desarrollaban luego de la infección. El promedio de la reducción en 16 perros fue de 65% y se encontraron algunas evidencias de que los antígenos del gusano adulto eran más efectivos que los de los protoescólices. Los gusanos que lograron establecerse en los perros vacunados presentaron menor cantidad de segmentos terminales y poco desarrollados, comparados con los de los perros del grupo control. De estos segmentos no se desarrollaron huevos y aunque no se demostró que los gusanos fueron completamente estériles, se vio un efecto en la producción de huevos debido a la vacunación. Otros investigadores también consiguieron producir alguna protección mediante la inmunización parenteral: Movsesijan y Mladenovic en 1970, y Aminzhanov en 1980, lograron limitar el número de gusanos establecidos capaces de desarrollarse hacia la etapa grávida mediante la inmunización oral de los perros con protoescólices irradiados. Herd y colaboradores, en la década del 70, utilizaron antígenos de excreción - secreción de gusanos adultos de *E. granulosus* para vacunar a los perros, obteniendo como resultado una reducción en el número de gusano y una muy significativa supresión de la producción de huevos (Lightowlers, 1994; Zhang *et al.*, 2006).

La inmunización de perros con antígenos obtenidos de especies heterólogas de tenídeos no ha inducido una inmunidad adecuada contra *E. granulosus*, aunque en 1986, Gemmell y colaboradores lograron una respuesta inmunitaria breve con la inyección parenteral de oncósferas activadas de *E. granulosus*, *T. hydatigena*, *T. ovis*, *T. multiceps*, *T. psiferms* o *T. serialis* (Lightowlers, 1994).

Nuestro grupo de investigación, ha empleado varios antígenos recombinantes del estadio larvario, expresados en una cepa no patogénica de *Salmonella typhimurium*, a saber: rEgFABP1, rEgTrp, and rEgA31 (proteína de unión a ácidos grasos, tropomiosina y paramiosina respectivamente de *E. granulosus*) (Chabalgoity *et al.*, 1997; Fu *et al.*, 1999, Petavy *et al.*, 2008). Los resultados de un primer experimento en ratones para evaluar la respuesta inmune contra la proteína recombinante rEgFABP1 (antiguamente EgDf1) mostraron que el antígeno era capaz de desarrollar una fuerte respuesta inmune contra el

parásito, detectada por la reactividad del suero de los ratones en cortes histológicos de protoescolices, y por la respuesta celular contra la bacteria y el antígeno, así como la producción de citoquinas (Chabalgoity *et al.*, 1997). Estudios posteriores de inmunización en perros demostraron que la vacuna es bien tolerada por los animales vacunados oralmente. En algunos de los perros, se observó respuesta humoral y celular contra rEgFABP1 (Chabalgoity *et al.*, 2000). La proteína recombinante EgA31, utilizada para sensibilizar nódulos linfáticos y plóticos de perros, logró inducir una respuesta celular activa en los nódulos linfáticos. Esto sugiere que es posible lograr una respuesta inmune comparable en los tejidos linfoides de mucosa, tales como las placas de Peyer (Fu *et al.*, 1999). Petavy y colaboradores (2008), llevaron adelante dos ensayos experimentales en Marruecos y Túnez con los antígenos recombinantes ya mencionados, expresados en *Salmonella typhimurium* en 28 perros. Se estudiaron las respuestas histológicas tanto en los animales vacunados como en los empleados como control a nivel del duodeno donde se localiza el parásito, encontrando una disminución significativa de la carga de parásitos en perros vacunados (70% a 80%) y una menor tasa de desarrollo en los gusanos restantes.

Por otro lado, otro grupo de investigadores vacunaron perros con proteínas nativas solubles de protoescolices, logrando una significativa supresión del crecimiento y producción de huevos. Luego testearon la capacidad de proteínas recombinantes de una familia de genes regulados por el desarrollo, expresadas en el estadio adulto del parásito, logrando un alto nivel de protección (97-100%) en términos de supresión del crecimiento de los gusanos, en el desarrollo de los huevos y en la embriogénesis (Zhang *et al.*, 2006).

A la fecha, a pesar de los múltiples resultados promisorios mencionados, no hay reportes indicando que se haya continuado con la experimentación en el sentido iniciado, siendo la única vacuna que ha llegado al estadio comercial la elaborada a partir de EG95 con los resultados ya mencionados.

La vacunación de los perros es un método de control complementario rentable, debido a que hay muchos menos perros que ovejas en las zonas donde el parásito es endémico, por lo tanto, se deben vacunar menos animales. Por otro lado, es posible vacunar perros callejeros o salvajes sin tener que capturarlos, aplicando la vacuna en la comida distribuida por vía aérea en zonas donde no se puede entrar con vehículos.

1.2 Proteínas de la superfamilia CAP

La superfamilia de proteínas CAP [proteínas secretoras ricas en cisteínas (CRISP), antígeno 5 (Ag5), proteína relacionada con la patogénesis 1 (Pr-1)], anteriormente conocida como SCP / TAPS (Pfam: PF00188) han sido identificadas en la mayoría de los tejidos humanos y de ratones, y tienen roles significativos en la reproducción, el desarrollo, el sistema inmune y en patologías, incluyendo cáncer, daño nervioso, pancreatitis y problemas cardíacos (Gibbs *et al.*, 2008). La nomenclatura CAP deriva de las tres familias de proteínas originalmente identificadas, los cuales reflejan con mayor precisión la diversidad existente dentro de esta superfamilia. Las CRISP son proteínas presentes en el aparato reproductivo masculino de mamíferos, las proteínas Ag5 son las más abundantes e inmunogénicas en el veneno de insectos y las proteínas PR-1 están presentes en plantas luego de la invasión por patógenos (Cantacessi *et al.*, 2009).

Las CAPs de mamíferos incluyen nueve subfamilias: proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISPs), proteínas relacionadas con la patogénesis de glioma 1 (GLIPR1), proteínas relacionadas con la patogénesis de glioma 2 (GLIPR2) / proteínas relacionadas con la patogénesis del Golgi 1 (GAPR1), proteínas inhibidoras de peptidasa 15 (PI15), proteínas inhibidoras de peptidasa 16 (PI16), CRISPs con dominio LCCL 1 y 2 (CRISPLD1 / CAPLD1 y CRISPLD2 / CAPLD2), receptor de tipo manosa / proteínas con dominio CP, proteínas con dominio CTL (CAPCL) y la proteína de dominio tipo R3H (R3HMDL) (Gibbs *et al.*, 2008).

La superfamilia CAP está caracterizada por presentar secuencias conservadas, dos definidas por la base de datos PROSITE (<http://www.expasy.ch/prosite>): CAP1 [GDER][HR][FYWH][TVS][QA][LIVM][LIVMA]Wxx[STN] y CAP2 [LIVMFYH][LIVMFY]xC[NQRHS]Yx[PARH]x[GL]N[LIVMFYWDN] y dos definidas por Gibbs y colaboradores (2008): CAP3 (HNxxR) y CAP4 (G[EQ]N[ILV]).

La estructura terciaria muestra una gran conservación (Figura 4), a pesar de que en general, la identidad de secuencia suele ser baja y la distancia evolutiva significativa entre los organismos. La variación fuera de estas secuencias conservadas puede explicar las diferentes funciones que han sido reportadas. La presencia de miembros de la familia CAP en Archaeae, Eubacterias y Eukarya sugiere que estas proteínas estaban presente en el ancestro común de todas las formas de vida (Gibbs *et al.*, 2008).

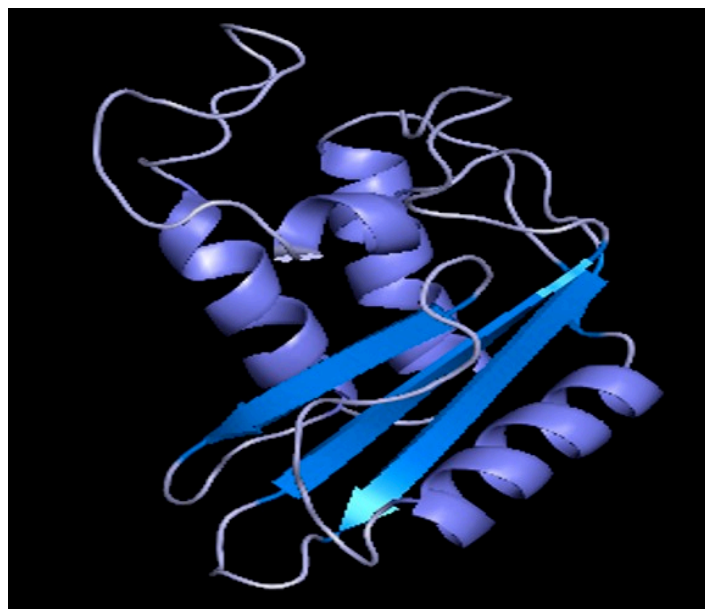


Figura 4. Representación de la estructura tridimensional típica de las CAPs

Los motivos CAP están presentes en un pequeño dominio estructuralmente conservado de 17-21 kDa y estabilizado por puentes disulfuros. Este dominio es llamado CAP (Gibbs *et al.*, 2008) o PR-1 (Lu *et al.*, 2013), según los autores. Su estructura cristalográfica revela una conformación común, que consiste en un sandwich α - β - α , en el que tres hebras β antiparalelas están flanqueadas por tres hélices α de un lado y una cuarta hélice del otro. Algunos miembros de la superfamilia tienen una extensión C-terminal conteniendo varias cisteínas que se conoce con el nombre de “Hinge” (bisagra). Esta región tiene una conformación característica que comprende tres hélices α , dos hebras β cortas y puentes disulfuro. Existen dominios adicionales que son únicos por ejemplo, el regulador de canal de iones (ICR) en la región C-terminal de las CRISPs; otros dominios adicionales muestran homología con dominios de familias de proteínas tales como el dominio lectina tipo C (CTL) y el dominio LCCL; y otros tienen extensiones de C-terminal sin homología con otras secuencias. Esta arquitectura multidominio sugiere que son proteínas multifuncionales (Gibbs *et al.*, 2008).

Estas proteínas tienen algunos de los atributos de las proteasas, sin embargo, carecen del sitio activo completo funcional que presentan las proteasas clásicas. Se desconoce si este sitio activo putativo incompleto representa la base estructural de la actividad inhibidora de proteasa reportada para la proteína PI15 humana o si representa una nueva clase de sitio activo de proteasas, como se propuso para la proteína Tex31 (Koshikawa *et al.*, 1996; Milne *et al.*, 2003). Hasta el momento, no existe una demostración definitiva de que las CAPs de

mamíferos presenten actividad proteasa.

1.2.1 Proteínas CAPs en helmintos

Las proteínas CAPs han sido descritas en varios organismos eucariotas incluyendo a los parásitos helmintos, en donde podrían tener un rol importante en la interacción hospedero-parásito. Las primeras reportadas fueron las de nematodos, llamadas proteínas secretadas de *Ancylostoma* (ASP) y más tarde se dieron a conocer las de platelmintos, a las que llamaron proteínas tipo veneno-alergeno (VAL).

Las ASPs, las cuales son secretadas luego de la transición de la forma larvaria de vida libre a la forma parasitaria, se clasifican en 3 grupos (1-3) según el alineamiento basado en la estructura. En general, existen 3 enlaces ditioeter (1-3) localizados en el núcleo de las proteínas CAP, mientras que los enlaces 4 y 5, cuando existen, se localizan en la porción C-terminal. En los grupos 1 y 3, todas las proteínas, salvo algunas excepciones, tienen los 5 enlaces ditioeter. Las proteínas del grupo 2 se diferencian del resto por no tener el enlace ditioeter 2 (Osman *et al.*, 2012). El grupo 1 incluye a ASP1 y ASP2 de *Necator americanus* (Na-ASP1 y Na-ASP2) y se caracteriza por la presencia de dos residuos de histidina conservados, His69 e His129, los cuales podrían estar involucrados en la interacción proteína-ligando dependiente de metales. Si bien los grupos 1 y 3 están muy relacionados filogenéticamente, lo que los diferencia es la ausencia de estos dos residuos en el grupo 3. El grupo 2 (por ejemplo, ASP de *Ancylostoma caninum*, Ac-ASP7) no tiene estos residuos conservados de histidinas y además carece de un considerable número de aminoácidos, 18 si comparamos las proteínas de este grupo con la Na-ASP2. Aunque se desconoce la función de las ASPs, su secreción por parte del parásito durante las primeras etapas de la invasión del hospedero, sugiere que tienen un papel clave en la patogénesis molecular de la infección (Cantacessi *et al.*, 2009; Osman *et al.*, 2012).

Si bien hay mucha información disponible sobre las CAPs de nematodos, muy poco se sabe acerca de las de platelmintos. Los primeros miembros de la familia VAL en platelmintos fueron reportados en el cestodo *Mesocostoides corti*, parásito modelo para el estudio de la relación hospedero-cestodo. Britos y colaboradores (2007) amplificaron 4 transcritos del estadio larvario del parásito a los que nombraron McCRISP1-4. Los resultados sugieren que las VALs de cestodos podrían participar de la interacción hospedero-parásito. Posteriormente, se realizaron búsquedas en bases de datos de EST que permitieron la identificación de

secuencias de proteínas de la superfamilia CAP de *Taenia asiatica*, *Taenia saginata*, *Taenia solium*, *Moniezia expansa* y *Echinococcus multilocularis* (Chalmers *et al.*, 2012). La base de datos de GeneDB del Instituto Sanger informa la presencia de varios miembros putativos en *E. granulosus*.

Los primeros miembros de la superfamilia CAPs reportados en trematodos fueron SmVAL4, SmVAL10 y SmVAL18 de *Schistosoma mansoni* (Curwen *et al.*, 2006). Más adelante, cuando el genoma completo de *S. mansoni* estuvo a disposición, se identificaron 28 genes que codificaban para proteínas con el dominio CAP (Chalmers *et al.*, 2008). Mediante análisis genómicos, transcriptómicos, filogenéticos y de estructura terciaria, las SmVALs se clasificaron en 2 grupos. El grupo 1 tiene un péptido señal, 3 enlaces disulfuro conservados y la región del primer bucle extendida. El grupo 2 no posee estas características pero cuenta con los residuos de tirosina 82 e histidina 21 altamente conservados. Estos residuos podrían ayudar a estabilizar la primera y tercer hélice del dominio CAP mediante enlaces de hidrógeno intramoleculares (Chalmers *et al.*, 2008). Las diferentes características de los dos grupos sugieren distintas localizaciones celulares: las VALs del grupo 1 podrían localizarse extracelularmente mientras que las del grupo 2 en compartimentos intracelulares (Gibbs *et al.*, 2008).

Las proteínas VALs están presentes en todas las especies de platelmintos, manteniendo la división en grupo 1 y grupo 2 (Chalmers *et al.*, 2012).

Estudios cristalográficos de varias de las proteínas de parásitos mencionadas, presentan la estructura tridimensional característica de la superfamilia (Asojo *et al.*, 2005; Asojo *et al.*, 2011; Osman *et al.*, 2012; Kelleher *et al.*, 2014).

1.2.2 Antecedentes de trabajo con proteínas CAPs de cestodos en la Sección Bioquímica

Como mencionamos previamente, las primeras proteínas CAPs reportadas en platelmintos fueron las McCRISPs del cestodo *M. corti*. Britos y colaboradores (2007) identificaron 4 secuencias codificantes del estadio larvario del parásito (tetratiridio), que mostraron homología de secuencia con las proteínas CRISPs de humanos y por eso su nombre. De las 4 secuencias, solo se obtuvo completa la de McCRISP2. Mediante la hibridación *in situ*, se localizó la expresión de McCRISP2 en la región apical del tetratiridio y en los proglótides de los gusanos segmentados. Los resultados sugieren que las proteínas CRISP de *M. corti*

podrían tener un rol como proteínas de productos de excreción/secreción y participar en procesos de diferenciación, como se ha propuesto para proteínas homólogas de otros organismos.

La MSc. Alicia Costábile continuó investigando estas proteínas, logrando aislar 6 nuevas secuencias mediante el uso de un cebador degenerado combinado con la estrategia RACE 3'. Posteriormente, intentó la expresión de McCRISP2 en los sistemas de expresión *Pichia pastoris* y *E. coli*, no logrando la producción de McCRISP2 de manera soluble ni con un buen rendimiento. Por último, a partir el análisis de la expresión de McCRISP2 a lo largo del desarrollo estrobilar de *M. corti* se evidenció la disminución del ARNm a medida que avanza la segmentación. En cuanto a la localización, se observaron diferentes perfiles que deberán ser corroborados mediante la colocalización de marcadores de tejido específicos (Costábile 2013, tesis de maestría).

Posteriormente, la Lic. Soledad Echeverría (2011) en su tesis de grado, aisló dos fragmentos de ADN codificantes para proteínas de la superfamilia CAP de *E. granulosus* empleando cebadores diseñados a partir del genoma de *Echinococcus multilocularis*, debido a que al momento de realizado el trabajo no estaba disponible el genoma de *E. granulosus*. Posteriormente, ensayó la expresión de las mismas en *Pichia pastoris*, sistema que se ha utilizado con éxito en la expresión de otros miembros de la superfamilia CAP (Farias *et al.*, 2012, Xiao *et al.*, 2008, Geldhof *et al.*, 2007, Goud *et al.*, 2005, Bethony *et al.*, 2005). Sin embargo, no fue posible producirlas en este sistema por lo que los ADNc de las proteínas fueron clonados en el vector procariota pET41a, para intentar expresarlas fusionadas a GST en la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Se realizaron diferentes protocolos de expresión y de procesamiento de las proteínas para obtenerlas de forma soluble y con buen rendimiento, lo cual no fue posible (datos no publicados).

Por otro lado, ambos ADNc fueron clonados en el vector de expresión pET22b(+) para transformar la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Ambos clones cedidos por la Dra. Estela Castillo, son el punto de partida de nuestro trabajo.

Por último, en un trabajo en colaboración con el grupo de la Dra. Collette Britton de la Universidad de Glasgow (Escocia), los ADNc de ambas proteínas de *E. granulosus*, fueron amplificados por PCR y clonados en un vector de expresión para *C. elegans*, por. Para ambos genes, se obtuvieron 4 líneas transgénicas estables. Se testeó la reactividad del anticuerpo

anti-His en el lisado de 100 gusanos de cada línea transgénica mediante *Western blot* para detectar la presencia de cada proteína pero no se detectó expresión en ninguna de las líneas transgénicas (datos no publicados).

1.2.3 Proteínas CAPs de helmintos como candidatos vacunales

La necesidad urgente de desarrollar nuevas drogas o vacunas para las especies de parásitos de importancia médica ha alimentado el interés en investigar la función de proteínas potencialmente protectoras. La participación de las proteínas de la superfamilia CAP en la interacción hospedero-parásito las hace posibles candidatos para el desarrollo de drogas o vacunas (Cantacessi y Gasser, 2012).

Estudios experimentales muestran que personas que producen IgE contra la proteína de *Ancylostoma caninum* ASP2 recombinante, tienen un menor riesgo de infección por este parásito. Posteriormente, se confirmó que Ac-ASP2 es un antígeno protector en perros vacunados, como se evidencia por las reducciones en los recuentos de huevos, carga de gusanos, y una mayor capacidad de los sueros de perros para inhibir la migración de las larvas L3 de *Ancylostoma*. Por estos motivos, se ha elegido a la Ac-ASP-2 como candidato para el desarrollo de una vacuna contra la anquilostomiasis humana (Bethony *et al.*, 2005). Otros investigadores han encontrado que proteínas de tipo ASP2 también actúan como antígeno protector contra la oncocercosis en ratones (McDonald *et al.*, 2004), contra la haemonchosis rumiante causadas por el nematodo *Haemonchus contortus* en corderos (Kooyman *et al.*, 2000) y contra *Ostertagia ostertagi* en terneros (Meyvis *et al.*, 2007).

La proteína nativa ASP-1 presente en las larvas del tercer estadio infeccioso de *Onchocerca volvulus* (Ov-ASP-1) podría cumplir múltiples funciones inmunorreguladoras. Se ha demostrado que la Ov-ASP-1 recombinante no solo es un antígeno protector en ratones vacunados contra *O. volvulus*, sino que también es un potente adyuvante ya que puede unirse a las células presentadoras de antígenos maduras y activar las células dendríticas (He *et al.*, 2009).

Debido a sus propiedades inmunológicas, Na-ASP2 también ha sido investigada como posible candidato vacunal. Los primeros estudios llevados a cabo en personas residentes en Estados Unidos, mostraron que el antígeno es bien tolerado e inmunogénico. Posteriormente, se realizaron estudios en una población de Brasil (zona endémica), registrándose una urticaria

generalizada. Estas reacciones se asociaron con IgE pre existente y específica contra Na-ASP-2, probablemente inducida por una infección anterior por anquilostomas (Diemert *et al.*, 2012).

La vacunación de terneros con la proteína ASP de doble dominio (ddASP) purificada a partir de los productos de excreción/secreción del estadio adulto de *Cooperia oncophora*, redujo la puesta de huevos del parásito en un 58.5% y la contaminación de las pasturas en un 65%, además de una reducción del 81.6% en el número de gusanos encontrados en los animales vacunados con respecto al grupo control. Esto demuestra la capacidad de la ddASP de controlar las infecciones por *C. oncophora* mediante vacunación (Vlaminck *et al.*, 2015).

Farias y colaboradores (2012) evaluaron las propiedades alergéneas de proteínas VAL de *Schistosoma mansoni* en un modelo murino de la inflamación de las vías respiratorias. Los resultados sugieren que las SmVALs tienen propiedades alergénicas que las hace buenas candidatos vacunales. Si bien los resultados son alentadores, hasta el momento no se han evaluado sus propiedades como vacunas contra la schistosomiasis.

1.3 Nanopartículas como sistema de entrega de antígenos

Las nanopartículas (NPs) se definen como partículas coloidales sólidas que incluyen tanto a las nanoesferas como a las nanocápsulas. Las primeras son sistemas vesiculares con una cubierta polimérica y un núcleo interno y las últimas consisten en una matriz polimérica. Una de sus características fundamentales es su tamaño, generalmente del orden de 5-10 nm con un límite de tamaño superior de aproximadamente 1000 nm (des Rieux *et al.*, 2006; Mora-Huertas *et al.*, 2010). Debido a la similitud de tamaño con los componentes celulares, las NPs pueden entrar en las células vivas utilizando el mecanismo de endocitosis celular (Zhao *et al.*, 2014).

La nanovaccinología terapéutica se aplica mayormente para el tratamiento del cáncer y se investiga su uso para el tratamiento de otras enfermedades o condiciones, como Alzheimer, hipertensión y adicción a la nicotina. La nanovaccinología profiláctica, por otro lado, se ha aplicado para la prevención de diferentes enfermedades. Varias han sido aprobadas para uso humano y otras están en los ensayos clínicos o preclínicos (revisado por Zhao *et al.*, 2014).

La unión de los antígenos a las NPs se logra mediante adsorción física simple o métodos más complejos, como la conjugación química o la encapsulación (Figura 5). La adsorción del

antígeno sobre una NP se basa en interacciones de cargas o hidrofóbicas. Por este motivo, la interacción entre las NPs y el antígeno es débil, lo que puede conducir a una disociación rápida del antígeno in vivo. La encapsulación y la conjugación química proporcionan una interacción más fuerte. En la encapsulación, los antígenos se mezclan con los precursores de las NPs durante su síntesis. En este caso, el antígeno se libera sólo cuando la NP se ha degradado in vivo o en el interior de la célula. En la conjugación química, los antígenos son químicamente entrecruzados (cross-linked) a la superficie de las NPs. El antígeno es internalizado por la célula dentro de la NP, donde luego es liberado. Cuando las NPs actúan como potenciador inmunológico, no es necesaria la unión o interacción con los antígenos. En este caso, el método elegido es el de la mezcla simple (Zhao *et al.*, 2014).

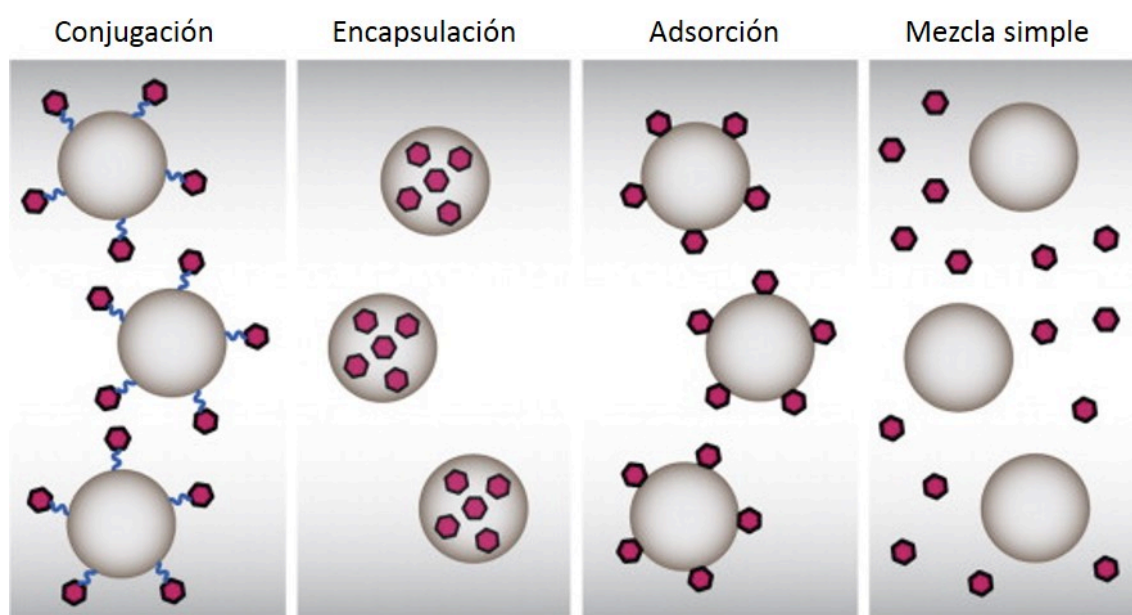


Figura 4. Interacción de las NPs con los antígenos de interés. Modificado de Zhao *et al.*, 2014.

La elección del método de preparación de NPs depende del polímero elegido y del compuesto activo que se quiere asociar (des Rieux *et al.*, 2006). Existen 6 métodos clásicos para la preparación de NPs por encapsulación: nanoprecipitación, emulsión-difusión, doble emulsión, emulsión-coacervación, recubrimiento por polímero y el método de capa por capa (Mora-Huertas *et al.*, 2010).

El método de nanoprecipitación se emplea para encapsular compuestos lipofílicos aunque se ha usado esta técnica para la encapsulación de compuestos hidrofílicos. El método de emulsión-difusión se usa para encapsular compuestos tanto hidrofóbicos como hidrofílicos. En ambos casos, el compuesto es dispersado en un solvente orgánico inmisible en agua,

como por ejemplo el acetonitrilo. La solución resultante es emulsionada con una fase acuosa que contiene un estabilizador como por ejemplo el alcohol polivinílico (PVA) y la fase orgánica es evaporada. Cuando se pretende encapsular un compuesto hidrofílico, se hace una primera emulsión de la fase acuosa (donde se encuentra el compuesto activo), en la fase orgánica (donde se encuentra el polímero). Luego, se agrega una segunda fase acuosa conteniendo el estabilizador para obtener la emulsión fase acuosa interna - fase orgánica - fase acuosa externa. Por último, se evapora completamente el solvente orgánico (revisado por des Rieux *et al.*, 2006).

El tamaño de las NPs así como su carga, son las características más importantes en este sistema de transporte de antígenos. Estas características determinan la distribución, las características biológicas, la toxicidad y la interacción con las células blanco de los tejidos. Los parámetros claves en la determinación del tamaño de las NPs durante el proceso de formulación se han estudiado ampliamente: el número de ciclos de homogeneización, la adición de excipiente a la fase acuosa interna, la concentración del compuesto activo y la relación de fase acuosa externa - fase orgánica. La concentración y la naturaleza del estabilizante también parecen influir en el tamaño: las NPs preparadas en presencia de polivinil alcohol (PVA) son más pequeñas que las producidas con dodecil sulfato de sodio (SDS). El peso molecular del polímero también influye: cuanto mayor sea el peso de polímero, las NPs son más pequeñas y menos polidispersas. Las propiedades superficiales de las NPs determinan la absorción de las mismas por parte de las células. La hidrofobicidad y la carga superficial están muy relacionadas con la composición de polímero. La superficie de las NPs puede ser modificada ya sea por recubrimiento o por injerto de moléculas para mejorar la absorción por parte de la célula blanco (revisado por des Rieux *et al.*, 2006).

Varios estudios demuestran que las proteínas pueden ser encapsuladas mediante el método de doble emulsión con evaporación del solvente (Zambaux *et al.*, 1998; Panyam *et al.*, 2003).

En resumen, existen varias ventajas en el uso de NPs como sistema de reparto de compuestos activos: 1) el tamaño y sus características superficiales pueden ser manipuladas fácilmente para lograr dirigir al compuesto tanto de forma pasiva como activa mediante varias vías de administración; 2) es posible controlar y mantener la liberación del compuesto activo durante su transporte y en el sitio de localización, alterando la distribución del mismo en los órganos diana con el fin de lograr un aumento de su eficacia terapéutica y reducción en los efectos secundarios; 3) el control de la liberación y las características de degradación de las NPs

pueden manipularse fácilmente mediante la elección de los constituyentes de la matriz; 4) el compuesto activo puede ser incorporado en las NPs sin ninguna reacción química, lo que favorece la preservación del mismo; 5) mediante la unión de ligandos a la superficie o por medio de direccionamiento magnético, se las puede dirigir a un sitio específico; 6) el sistema de entrega de compuestos activos mediante NPs puede ser utilizado en diversas vías de administración incluyendo la oral, nasal, parenteral, intra-ocular, etc. (revisado por Yun *et al.*, 2013).

1.3.1 Polímeros sintéticos para la formulación de NPs

Un gran número de polímeros sintéticos como los son el poli lactida co-glicolida (PLG), el ácido láctico coglicólico (PLGA), el ácido poliláctico (PLA), la poli caprolactona (PCL) el polietilenglicol (PEG) y el poliestireno, están siendo usados para preparar NPs. Los criterios principales tenidos en cuenta a la hora de elegir un polímero son su biodisposición, biocompatibilidad, la sencillez en su producción y el rango de degradación (des Rieux *et al.*, 2006; Mora-Huertas *et al.*, 2010). Una vez en sus sitios diana, estos polímeros sufren hidrólisis dando como resultado productos biocompatibles y biodegradables, como por ejemplo el ácido láctico y el ácido glicólico. Estos productos no interfieren en el ciclo normal de las células debido a que su formación se da a velocidades muy lentas (Panyam *et al.*, 2003).

La naturaleza de los polímeros que constituyen a las NPs afecta significativamente su tamaño y su perfil de liberación de la droga o el antígeno encapsulado. Los polímeros PLG y PLGA y PLA son los más utilizados debido a su excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad (des Rieux *et al.*, 2006; Mora-Huertas *et al.*, 2010).

1.3.2 Uso de NPs para el desarrollo de vacunas orales

La vacunación por vía de mucosas, donde se incluye a la vacunación por vía oral, ofrece muchas ventajas inmunológicas y logísticas con respecto a la vacunación sistémica. La vacunación por vía de mucosas no requiere inyección y no causa dolor, por lo que es mejor tolerada entre los pacientes de todas las edades. Además, simplifica los mecanismos de fabricación y de almacenamiento, así como logra la independencia del personal médico entrenado por lo que las hacen adecuadas para los programas de vacunación masiva, especialmente en los países en desarrollo.

El sistema inmune de la mucosa es más accesible para la inducción de una respuesta inmune, ya que las mucosas son los sitios de entrada de los patógenos. Otra ventaja muy importante es que la vacunación por vía mucosa tiene como objetivo sitios específicos e induce una “inmunidad de primera línea” en la entrada de los patógenos, lo que previene el establecimiento y la diseminación de la infección. Además, la inmunización en un sitio específico de la mucosa puede resultar en una secreción de anticuerpos sistémica, así como en otros sitios no específicos de la mucosa.

Una vacuna de mucosas exitosa debe ser capaz de penetrar la barrera de la mucosa de una manera controlada e inducir tanto las respuestas inmunitarias innatas y como las adaptativas, tales como la activación de células dendríticas, macrófagos, células epiteliales de la sistema inmune innato, células T efectoras y de memoria y células B específicas de antígeno, que cooperan entre sí para alcanzar la protección óptima (Holmgren y Czerkinsky, 2005).

Cuando se administran proteínas por vía oral, éstas deben de resistir la acción de los jugos gástricos e intestinales. Además, la biodisponibilidad de las proteínas disminuye debido a la baja permeabilidad de la mucosa y la falta de estabilidad en el tracto gastrointestinal, resultando en la degradación de la proteína antes de su absorción por parte del intestino. La asociación de las proteínas con NPs poliméricas es una de los enfoques propuestos para mejorar estos inconvenientes (Park *et al.*, 2011).

Fattal y colaboradores (2002), lograron protección contra *Salmonella typhimurium* en ratones, después de la administración oral de la fosforilcolina de *S. typhimurium* encapsulada en partículas de PLGA. Conway y colaboradores (2001), han investigado la inmunogenicidad y eficacia protectora de un antígeno de *Bordetella pertussis* encapsulado en micropartículas o NPs de PLGA en un modelo murino. Los antígenos encapsulados administrados por vía oral no sólo provocaron respuestas de la mucosa, sino también respuestas sistémicas, generando protección contra *B. pertussis*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es la caracterización, producción, purificación y encapsulación de dos proteínas CAPs de *Echinococcus granulosus*, EgVAL1 y EgVAL2, con el fin de desarrollar una nanovacuna para ser aplicada en el hospedero definitivo del parásito.

2.2 Objetivos específicos

1. Caracterización de EgVAL1 y EgVAL2 mediante estudios bioinformáticos incluyendo modelado por homología y reconstrucción filogenética.
2. Producción y purificación de las proteínas recombinantes EgVAL1 y EgVAL2 en cepas de *E. coli*.
3. Encapsulación de las proteínas recombinantes en nanopartículas poliméricas.
4. Evaluación de la integridad de los antígenos encapsulados y de las nanopartículas poliméricas a lo largo del tiempo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Caracterización de EgVAL1 y EgVAL2

3.1.1 Estudios bioinformáticos

Se determinó la masa molecular y el punto isoeléctrico teórico de EgVAL1-2 mediante el software ProtParam disponible en el portal ExPASy (<http://www.expasy.org/>) y sitios de glicosilación utilizando el software de predicción disponible en el sitio <http://www.cbs.dtu.dk/services/>.

Se buscaron los posibles epítopes lineales en ambas secuencias utilizando la herramienta bioinformática SVMTriP (<http://sysbio.unl.edu/SVMTriP/index.php>).

La búsqueda de secuencias similares a las secuencias de las proteínas EgVALs se realizó a través de BLAST (Altschul *et al.*, 1990) en las bases de datos GeneDB (<http://www.genedb.org/>) y NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Las coordenadas cristalográficas de las estructuras empleadas en este trabajo fueron obtenidas a través del “Protein Data Bank” (www.rcsb.org/pdb).

Se alinearon secuencias de proteínas de la superfamilia de las CAPs de trematodos y nematodos anotadas en el GenBank con las de *Echinococcus granulosus* en estudio, utilizando el algoritmo CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997), con la matriz Gonnet 250 y los parámetros “gap opening” de 10 y “gap extention” de 0.1. Se seleccionó una secuencia representativa de los grupos 1, 2 y 3 de *Schistosoma mansoni* (VAL-2 AAY43181, VAL-4 AAY43182 y VAL-13 ABB88843) y una de los grupos 1, 2 y 3 de *Necator americanus* y *Ancylostoma caninum* (Na-Asp2 AFR68662.1, ASP-7 AEJ86344.1, ASP-3 AAO63575), siguiendo la clasificación de Chalmers y Hoffman (2012) y Osman y colaboradores (2012), respectivamente.

Se alinearon secuencias de proteínas de la superfamilia de las CAPs de cestodos anotadas en el GeneDB y GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) con las de *E. granulosus*, utilizando el algoritmo CLUSTAL X, con la matriz Gonnet 250 y los parámetros “gap opening” de 10 y “gap extention” de 0.1. Se seleccionaron las secuencias EgGLIPR1 EgrG_000709300, EgGAPR1 EgrG_000376100, EgLCCL EgrG_001155900, EgVesV5

EgrG_001088800, EgPI16 EgrG_000766600, EgVAL EgrG_001147400, EgPI EUB60436.1, TsVAL2 TsM_000328700, TsPI16 TsM_000364700, TsLCCL TsM_000370900, TsR3HDML TsM_000593700, TsVesV5 TsM_000962100, TsVAL1 TsM_000490200, TsGLIPR1 TsM_000767500, EmGLIPR1 EmuJ_000709300, EmR3HDML EmuJ_000651500, EmLCCL EmuJ_001155900, EmVesV5 EmuJ_001088800, EmPI16 EmuJ_000096500, EmVAL EmuJ_000781600, EmVAL3 EmuJ_001147400, EmGAPR1 EmuJ_000376100, HmPI16 HmN_000896700, MvVAL2 AAT74668.2, y MvVAL1.

3.1.2 Modelado por homología de las EgVALs:

Los modelos por homología de EgVAL1 y EgVAL2 se llevaron a cabo empleando el paquete informático “Molecular Operating Environment” (MOE 2011.10) en un entorno Windows. La selección del molde para cada proteína se hizo mediante búsqueda en el banco de datos de proteínas “Protein Data Bank”, seleccionando las proteínas Stecrisp de *Trimeresurus Stejneger* (1RC9.pdb) y Pseudecina de *Pseudechis porphyriacus* (2DDb.pdb), obteniendo puntuaciones de 1.5×10^{-24} y 2×10^{-17} respectivamente. El alineamiento se realizó usando la matriz de sustitución BLOSUM62 para la construcción de pares iniciales, un “gap start” de 7 y “gap extend” de 1. Finalmente, para el alineamiento de estructura se emplearon los parámetros “gap start” de 1 y “gap extend” de 0.1. Cada modelo fue sometido a una minimización de energía en fase solvatada y una simulación de dinámica molecular de 5 nanosegundos (ns), usando el campo de fuerza Amber99 con condiciones periódicas (Wang *et al.*, 2000).

3.1.3 Reconstrucción filogenética:

Se alinearon diecisiete secuencias de proteínas completas obtenidas del GenBank, utilizando el software Clustal X con los siguientes parámetros: matriz Gonnet 250, una abertura de gap de 3 y extensión de gap de 1,8, siguiendo las recomendaciones B.G. Hall (2013). Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando el software MEGA (versión 6) (Kumar *et al.*, 1993) con las secuencias de aminoácidos de las EgVALs y de miembros representativos de la familia de proteínas CAP de ratón (*Mus musculus*). La topología y la longitud de las ramas se estimaron utilizando el método de “Maximum Likelihood” (método de distancia “Poisson-correction” y usando la opción de completa eliminación de gap y “bootstrapping” de 1000).

Las secuencias de proteínas de ratón utilizadas fueron: GLIPR1 NP_082884; GAPR1 NP_081726; GRIPR1L1 NP_081294; GRIPR1L2 NP_080499; PI16 NP_076223; Pi15

NP_444421; R3HDML NP_001092801; CRISP1 NP_033768; CRISP2 NP_033446; CRISP3 NP_033769; CRISP4 NP_084709; CRISPLD1 NP_113579; CRISPLD1 NP_084485 CAPCL Q7TSQ1. Se compararon topologías de árboles alternativos mediante los métodos de “Neighbour Joining”, “Minimum Evolution”, “UPGMA” y “Maximum Parsimony”.

3.2 Expresión y purificación de EgVALs

Los clones correspondientes a las secuencia codificantes de las proteínas EgVAL1 y EgVAL2 fueron cedidos por la Dra. Estela Castillo (Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay). La proteína EgVAL2 fue expresada en la cepa BL21 pLysS de *E. coli* transformada con el plásmido pET-22b (Novagen). La secuencia codificante de la proteína EgVAL1 fue optimizada para su expresión en *E. coli* por la compañía GenScript y se expresó en la cepa M15 pRep4 transformada con el plásmido pQE-TriSystem en el que previamente se había clonado la región codificante optimizada de EgVAL1.

3.2.1 Estudios de Expresión de EgVAL2

Para la expresión de la proteína EgVAL2 se realizó un pre-cultivo sembrando 3 µl de bacterias de la cepa BL21(DE3) pLysS transformadas con el plásmido pET22b-EgVal2 almacenadas en glicerol a -80 °C, por cada 3 ml de medio LB, con 100 mg/ml de Ampicilina. El pre-cultivo fue incubado durante toda la noche a 37 °C y a una agitación de 200 rpm. Posteriormente se transfirieron 6 ml de pre-cultivo a un matraz conteniendo 300 ml de medio 2TY. Las células de *E. coli* fueron incubadas en agitador en las mismas condiciones mencionadas anteriormente, dejándolas crecer hasta una absorbancia (D.O.) (λ 600 nm) entre 0.5 – 0.8. Una vez alcanzada esta absorbancia, se agregó isopropil- β -D-1 tiogalctopiranosido (IPTG) como inductor de la expresión, a una concentración final de 0.4 mM, durante 2 y 4 horas a 30 °C y 37 °C con igual agitación. Finalizada la inducción, las células fueron centrifugadas a 5500 rpm en rotor J14 (Beckman), durante 20 minutos a 4 °C. El precipitado fue resuspendido en 10 ml de tampón de unión (50 mM de Buffer fosfato pH 8, 300 mM de NaCl, 8 M de urea y 20 mM de imidazol) y almacenado a -20 °C.

3.2.2 Análisis de la expresión

Con el fin de verificar si hubo inducción adecuada para comenzar con la purificación de la proteína, se tomaron alícuotas de las células antes y después del agregado de IPTG para analizar mediante electroforesis SDS-PAGE. Las alícuotas sufrieron el mismo tratamiento que

las células contenidas en el matraz (centrifugación a 5500 rpm, durante 20 minutos a 4 °C; resuspensión del precipitado en tampón de unión con y sin urea para estudiar las fracciones soluble e insoluble). Las muestras se analizaron en gel de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes y se visualizaron con Azul de Coomassie.

3.2.3 Ruptura de células y liberación de la proteína

Se realizó la ruptura de las células mediante congelado y descongelado, y posterior sonicación (Sonic ruptor 250, Omni International) en hielo, a 40 % de amplitud y pulsos de 2 segundos durante 15 minutos. Por último las células se centrifugaron a 13000 rpm rotor JA – 20 (Beckman) durante 30 minutos a 4 °C.

3.2.4 Purificación de EgVAL2 por cromatografía de afinidad

Se realizó una cromatografía de afinidad empleando Ni Sepharosa High Performance como matriz en una columna pre-enpaquetada de 5 ml (GE Healthcare). La columna se equilibró con al menos 5 volúmenes de columna con el tampón de unión (50 mM de Na-Fosfato pH 8; 300 mM de NaCl; 8 M de urea; 20 mM de imidazol). Previo a cargar la muestra, la misma se centrifugó a 13000 rpm en rotor JA20 (Beckman) durante 20 minutos a 4 °C para eliminar posibles precipitados. Luego se filtró con filtro de acetato de celulosa con un tamaño de poro de 0,2 µm. La carga se realizó con bomba peristáltica con un flujo constante de 5 ml/min. La elución se realizó en pasos con concentraciones crecientes de imidazol utilizando el tampón 50 mM de Sodio-Fosfato pH 8; 300 mM de NaCl; 8 M de urea, con diferentes concentraciones de imidazol: 20 mM, 50 mM, 100 mM, 300 mM y 500 mM. La elución se realizó a un flujo de 2 ml/min, colectando 2 ml por tubo. Las fracciones colectadas se analizaron mediante electroforesis SDS – PAGE y se visualizaron por tinción de Azul de Coomassie. Los tubos en donde la proteína se obtuvo sin otras proteínas visibles a la tinción con Azul de Coomassie se seleccionaron para calcular la cantidad de proteína obtenida.

3.2.5 Optimización de la secuencia nucleotídica de EgVAL1

Ensayos anteriores realizados por la Lic Soledad Echeverría, (Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay) mostraron que la proteína EgVAL1 no se expresaba en cantidades apreciables. Con el fin de optimizar su expresión, se envió la secuencia original al servicio GenScript, el cual utiliza el algoritmo OptimunGene™ para estudiar los parámetros críticos, necesarios para obtener una buena eficiencia de expresión en el organismo

seleccionado (http://www.genscript.com/gene_synthesis.html).

3.2.6 Clonado

La región codificante optimizada de EgVAL1 en el plásmido pUC57 se utilizó para transformar células DH5 α (cedidas por el Lic. Danilo Segovia) según el protocolo que se describe a continuación.

Las células competentes se descongelaron en hielo durante 10 minutos agregando luego 50 ng de plásmido por cada 50 μ l de células. Se incubaron durante 20 minutos en hielo y 90 segundos a 42°C. A continuación, se incubaron las células durante 2 minutos en hielo. Por último, se agregó 350 μ l de medio LB y se incubó durante 60 minutos a 37°C con agitación. 50 μ l de bacterias fueron cultivadas en placas conteniendo medio LB agar y ampicilina (100 mg/ml) durante toda la noche a 37°C.

Se seleccionaron varias colonias aisladas para realizar pre-cultivos de 3 ml de medio LB con ampicilina (100 mg/ml), los cuales se utilizaron para extraer el ADN plasmídico por el método alcalino. Luego analizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% en tampón TAE y tinción con GelRed (Biotium). Los plásmidos recuperados fueron digeridos con las enzimas de restricción *Hind III* y *Bam HI* (Fermentas), en un volumen final de 50 μ l. A continuación, se incubó una hora a 37°C y luego en frío para inactivar la reacción. Paralelamente, se realizó la digestión del vector pQE-TriSystem (Qiagen) con las mismas enzimas de restricción. Los productos obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, en las condiciones ya mencionadas. Las bandas en el gel de agarosa correspondientes al vector lineal y al fragmento con la región codificante de EgVAL2 fueron purificadas mediante el uso de kit de purificación de bandas (Quiagen).

A continuación, se realizó la ligación de la región codificante de EgVAL1 (50 ng) al vector de expresión pQE-TriSystem (44 ng), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Con 5 μ l del producto de ligación obtenido, transformamos células M15 pRep4 según el protocolo de transformación por choque de calor de baja eficiencia que se detalla a continuación: se centrifugó 1 ml de pre-cultivo de M15 pRep4 durante 2 minutos a 5000 rpm. Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con CaCl₂ 0.1 M frío y estéril. Repetimos el primer paso y resuspendimos el pellet en 100 μ l de CaCl₂ 0.1 M frío y estéril. Incubamos durante 1 hora en hielo y luego agregamos 2 μ l del plásmido pQE-TriS-EgVAL2. Incubamos

30 minutos en hielo y posteriormente realizamos el choque térmico de 90 segundos a 42 °C y 90 segundos en hielo. Por último, agregamos 500 µl de medio de cultivo LB y cultivamos las bacterias en placas conteniendo medio LB agar, ampicilina (100 mg/ml) y kanamicina (10 mg/ml) durante toda la noche a 37°C.

Para verificar que las bacterias crecidas en las placas fueran transformantes, se seleccionaron 8 colonias, se extrajo el ADN plasmídico y se digirió con las enzimas de restricción *Hind III* y *Bam HI*, según protocolos detallados anteriormente.

3.2.7 Estudios de expresión de EgVAL1

Se siguió el mismo protocolo que para EgVAL2.

3.3 Depleción de los sueros anti-EgVAL1 y anti-EgVAL2

Los sueros anti-EgVAL1 y anti-EgVAL2 fueron producidos en ratones por el laboratorio Covalab (Lyon, Francia). Se realizó la depleción según el siguiente protocolo:

Se realizó la expresión de proteínas de *E. coli* transformadas con el vector pQE-TriSystem, según el protocolo de expresión utilizado para expresar las células transformadas con pQE-TriSystem-EgVALs. El extracto de proteínas obtenidas se incubó en contacto con dos membrana de nitrocelulosa durante 2 hs a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se lavaron con 3 lavados de 10 minutos cada uno con TBST. Por último, se incubó cada membrana de nitrocelulosa con uno de los sueros (anti-EgVAL1 y anti-EgVAL2) durante 2 hs a temperatura ambiente y se recuperó el suero depletado.

3.4 Encapsulación de EgVALs

Se evaluaron dos metodologías de encapsulación: nanoprecipitación y el método de doble emulsión con evaporación del solvente. Todos los ensayos fueron realizados en el laboratorio de parasitología y micología médica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Claude Bernard Lyon 1, Francia. A continuación se detalla el protocolo de cada uno de los métodos.

3.4.1 Nanoprecipitación

Para evaluar el método de nanoprecipitación, se ensayaron 3 condiciones en donde se varió la cantidad de polímero disuelto en el solvente orgánico y se empleó a la proteína sero albúmina

bovina (BSA).

Se disolvieron 200 (ensayo 1), 100 (ensayo 2) y 50 (ensayo 3) mg de policaprolactona (PCL) de 14000 Da, en 25 ml de acetona. En el ensayo 3 se agregó 5 mg de seroalbúmina bovina (BSA) para evaluar la eficiencia de encapsulación. Esta primera solución se agregó, gota a gota y con agitación, a 50 ml de una solución de Tween 80 0.1%. Una vez agregadas, dejamos agitando la formulación final durante 10-20 minutos.

La acetona se evaporó utilizando un evaporador con rotación. Los parámetros iniciales fueron: baño de agua a 40 °C, 100 rpm de rotación y presión a 250 miliBar. Luego, bajamos la presión, paso a paso, a 50 miliBar.

El tamaño de las partículas obtenidas en cada ensayo se determinó mediante difracción laser usando el equipo Mastersizer (Malvern).

3.4.2 Doble emulsión con evaporación del solvente

Se realizaron varios ensayos de encapsulación por esta metodología. Se evaluaron dos polímeros diferentes (PCL y ácido poliláctico (PLA)) variando sus concentraciones y las de proteína para determinar los mejores parámetros para la formulación de las nanopartículas finales.

Los parámetros evaluados utilizando PCL fueron los siguientes:

- 1 ml de BSA (10 mg/ml y 100 mg/ml)
- 10 ml de solución de PLC (50 a 200 mg de PCL disuelto en etil acetato)
- 20 ml de PVA 2%

Los parámetros evaluados utilizando PLA fueron los siguientes:

- 1 ml de una solución 1 mg/ml de EgVAL1 (o EgVAL2)
- 10 ml de solución de PLC
- 20 ml de PVA 2%

La primera emulsión se obtuvo sonicando, durante 2 minutos y a 25° de amplitud, la solución acuosa y la solución de polímero. A esta emulsión se le agregó la solución de PVA sonicando durante 2 minutos a 25° de amplitud y con agitación para evitar la formación de precipitados.

En cada caso, se ensayaron distintas condiciones para lograr la evaporación del solvente. En algunos ensayos, la evaporación se realizó en las mismas condiciones que se usaron para el método de nanoprecipitación y en otros primero se diluyó 1/10 la formulación de nanopartículas y luego se evaporó con el rotaevaporador en las mismas condiciones que se usaron en los ensayos de nanoprecipitación. Por último, se evaluó la evaporación del solvente “overnight” sin usar el rotaevaporador.

El tamaño de las nanopartículas obtenidas se determinó mediante difracción laser usando el equipo Zetasizer (Malvern).

3.4.3 Nanopartículas con Chitosan

Para el agregado de Chitosan a las soluciones de nanopartículas de EgVAL1 y EgVAL2, se centrifugó 10 ml de cada solución durante 15 minutos a 15000 rpm con el fin de precipitarlas. El pellet se resuspendió en 40 ml de Chitosan al 0.1%. Luego dejamos la solución en agitación durante toda la noche a temperatura ambiente.

3.4.4 Eficiencia de la encapsulación

Se centrifugaron 200 µl de NPs durante 15 minutos a 14000 g. Se separó el sobrenadante, y el pellet se resuspendió en 200 µl de tampón de unión. Tanto a estas muestras, como a 200 µl de NPs sin centrifugar (NPs totales), se les agregó 1 ml de acetonitrilo y se incubaron con agitación hasta la total disolución de las NPs. Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 30 minutos a 14000 g, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 75 µl de tampón de unión.

Las muestras se analizaron en geles de acrilamida 15% mediante electroforesis SDS-PAGE y tinción con Azul de Coomassie.

3.5. Estudios de estabilidad

3.5.1 Estudio de la estabilidad de las nanopartículas en jugo gástrico e intestinal artificial

Se centrifugaron 100 µl de NP-EgVAL1, y 400 µl de NP-EgVAL1 con chitosan, a 14000 g durante 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 100 µl de H₂O miliRo. Posteriormente, se agregó 1 ml de fluido gástrico simulando estado de ayuno

(FaSSGF) según Vertzoni y colaboradores (2005) y se incubó durante 2 hs a 37 °C y 200 rpm. Luego de la incubación, se centrifugaron todas las muestras durante 20 minutos a 14000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 100 µl de H₂O miliRo. Se agregó 1 ml de fluido intestinal simulando estado de ayuno (FaSSIF) según Galia y colaboradores (1998) y se incubó durante 2 hs a 37 °C y 200 rpm. Luego de la incubación se centrifugaron todas las muestras durante 20 minutos a 14000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 100 µl de H₂O miliRo. A cada muestra se le agregó 1 ml de acetonitrilo para disolver el polímero de las NPs y liberar a las proteínas.

La estabilidad de EgVAL1 luego de la incubación con FaSSGF y FaSSIF se estudió mediante Western blot.

3.5.2 Western blot

La proteína EgVAL1 recuperada luego de disolver las nanopartículas que se sometieron a los fluidos FaSSGF y FaSSIF, fue sembrada en un gel de acrilamida 15%. Terminada la electroforesis, se transfirió el gel a una membrana de nitrocelulosa equilibrada con el tampón de transferencia. La transferencia se realizó en un cuba de transferencia (Amersham) durante 1 hora y media a 4 mA / cm² de membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, se incubó la membrana en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. La membrana bloqueada se incubó con el anticuerpo primario (anti-EgVAL1 depletado) diluido 1 / 500 en solución de bloqueo, durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se lavó la membrana con 3 lavados con TBST de 10 minutos cada uno con agitación y se incubó con el anticuerpo secundario (IgG anti-ratón) conjugado a fosfatasa alcalina diluido 1 / 10000 en TBST. Se lavó la membrana con 3 lavados con TBST de 10 minutos cada uno con agitación y el revelado se realizó agregando el sustrato de la fosfatasa alcalina NBT / BCIP.

3.5.3 Estudio de estabilidad de las nanopartículas durante el almacenamiento

Para evaluar la estabilidad de las NPs luego del almacenamiento en solución a 4°C durante 9 meses, se midió la distribución de tamaño de las formulaciones NP-EgVAL1, NP-EgVAL1-Chitosan, NP-EgVAL2, NP-EgVAL2-Chitosan utilizando el equipo Zeta Plus (BrookHaven) en el laboratorio de biomateriales de la Facultad de Ciencias. Previo a cada medida, las soluciones se filtraron con filtro de celulosa de 0,45 micras (Millipore) y se dejaron reposar durante 2 minutos para evitar movimientos bruscos, que puedan interferir con la medida.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterización de EgVAL1 y EgVAL2

Los clones empleados en este trabajo fueron cedidos por la Dra. Estela Castillo. La secuencia y la traducción virtual estuvo a cargo del grupo que ella dirige, comprobando que el marco abierto de lectura era el esperado.

El análisis de las secuencias obtenidas indica que la proteína EgVAL1 tiene un peso molecular de 18,8 kDa y un punto isoeléctrico (pI) de 8,96 mientras que la EgVAL2 tiene un peso de 24,2 kDa y un pI de 8,83. Los datos fueron obtenidos a través del software ProtParam disponible en el portal ExPASy (<http://www.expasy.org/>). Es importante destacar que los clones de partida no incluyen la región correspondiente al péptido señal. La predicción de los sitios de glicosilación a través del servicio de predicción CBS (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>) indica que EgVAL1 tiene 4 sitios posibles de O-glicosilación en las posiciones 25, 143, 149 y 153 y un sitio de N-glicosilación en la posición 82. Por su parte, EgVAL2 tiene 4 sitios posibles de O-glicosilación en las posiciones 160, 162, 169 y 180 y un sitio de N-glicosilación en la posición 97.

La búsqueda en el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990) indicó una alta similitud entre EgVAL1 y EUB54826.1 (92%) y EgVAL-2 y EUB55880.1 (94%). Estas dos secuencias son producto del proyecto PRJNA182977 (Zheng *et al.*, 2013); a la fecha no hemos encontrado nueva información sobre estas secuencias.

Se realizó la búsqueda de epítopes lineales en ambas proteínas mediante la herramienta bioinformática SVMTriP (<http://sysbio.unl.edu/SVMTriP/index.php>). EgVAL1 presenta 5 posibles epítopes, 3 de ellos recomendados por el sitio debido a su alto “score” y EgVAL2 presenta 3, 1 de ellos recomendado por el sitio (Tabla 1).

Predicción de epítopes lineales de EgVAL1					Predicción de epítopes lineales de EgVAL2			
	Localización	Epítpe	Score			Localización	Epítpe	Score
1	27-46	MMLMKHSPRLNLAERWARR	1		1	26-45	ASNMMLLLYSSHLEQLADYW	1
2	3-22	EEDRRSILELHTAAREQVRP	0,929		2	66-85	GQNIAAVGGFKPAFTEAVCG	0,496
3	60-79	LVPTVRWLANMWKAEVKYYT	0,911		3	95-115	YFNNSCTHICGHYTMVWAT	0,439
4	89-108	KVCGHYTQMVMWADSTELGCA	0,782					
5	133-152	AGNFIGRKPYTEGGSCTKCP	0,553					

Tabla 1. Predicción de epítopes lineales de las proteínas EgVALs. En rosado se indican los epítopes significativamente recomendados por el sitio.

4.1.1 Topología de secuencia

El análisis de la estructura primaria de las EgVALs reveló la presencia de los motivos CAP, definidos por Gibbs y colaboradores (2008), con un alto grado de conservación y una región bisagra rica en cisteínas. Estos elementos nos permitieron considerar a estas proteínas como miembros de la superfamilia CAP (Figura 1A). Los motivos específicos de cada una de las nueve familias presentes en mamíferos están ausentes en las EgVALs, como por ejemplo los motivos LCCL, R3H o ICR de las familias CRISPLD1-2, R3H y CRISP respectivamente.

El motivo CAP3 (HNxxR) no está totalmente conservado y fue encontrado como HhxxR y HtxxR. Esta misma situación ocurrió en el motivo CAP2 en EgVAL2 que fue encontrado como YFTvCQYKtGNh. Las regiones bisagras de las EgVALs tiene un espaciamento entre las cisteínas de $Cx_2Cx_5Cx_4C$ y no tienen ningún motivo específico mas allá de la región bisagra, como ocurre con varias familias de proteínas CAP de mamíferos (Gibbs et al., 2008) (Figura 1B).

A



B

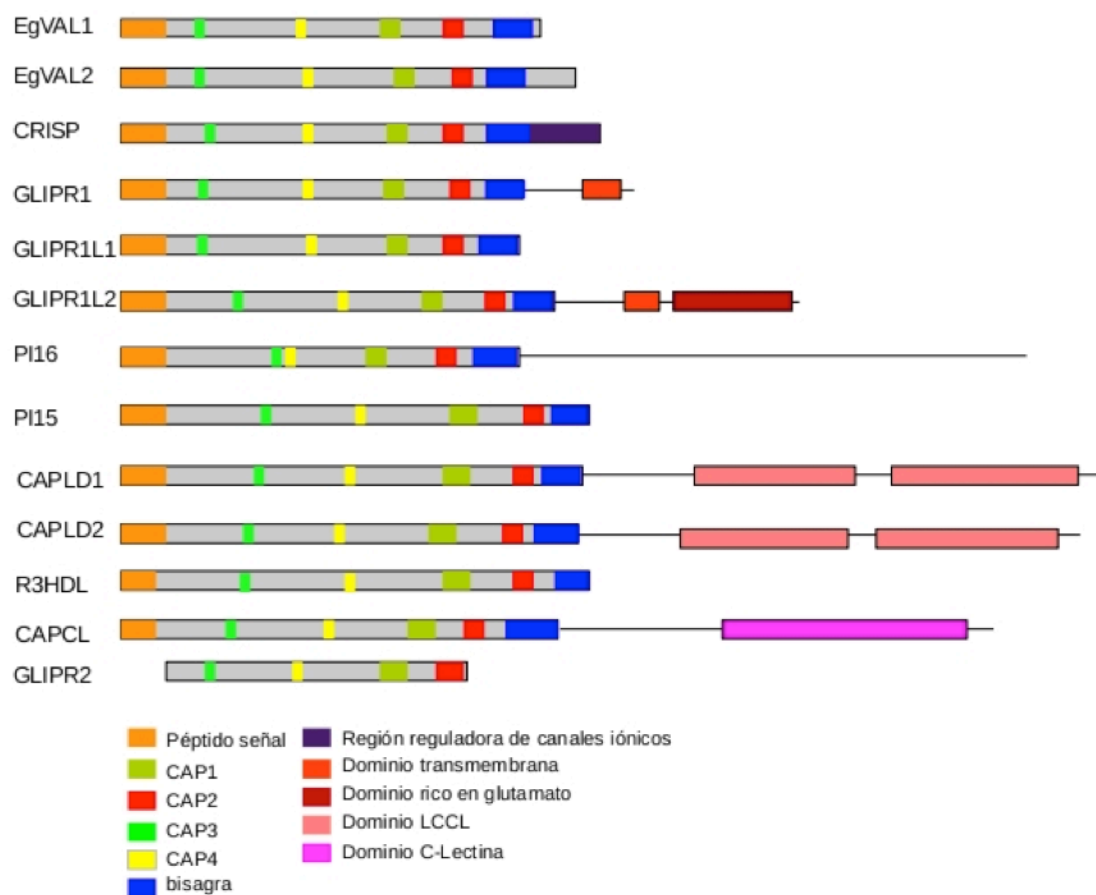


Figura 1. Motivos conservados de las proteínas CAP. A) Secuencias de EgVAL1-2 indicando motivos consenso. Los motivos CAP se muestran en colores (sin colorear los aminoácidos no conservados). B) Representación esquemática de cada familia CAP de mamíferos mostrando los motivos consenso. Modificada a partir de Gibbs *et al.*, 2008.

4.1.2 Reconstrucciones filogenéticas

Para evaluar la relación de las EgVALs con las nueve familias descritas para mamíferos, se aplicaron algoritmos filogenéticos empleando secuencias de *Mus musculus* (Mm) representativas de cada familia. El análisis filogenético mostró que las proteínas de *E. granulosus* se incluyeron en el mismo clado que las proteínas R3HDML, PI15 y CRISPLD1/2 (Figura 2). CRISPLD1 y CRISPLD2 se caracterizan por la presencia de un dominio C-terminal (Ct) LCC que no fue encontrado en las proteínas de *E. granulosus* en estudio (Figura 1B).

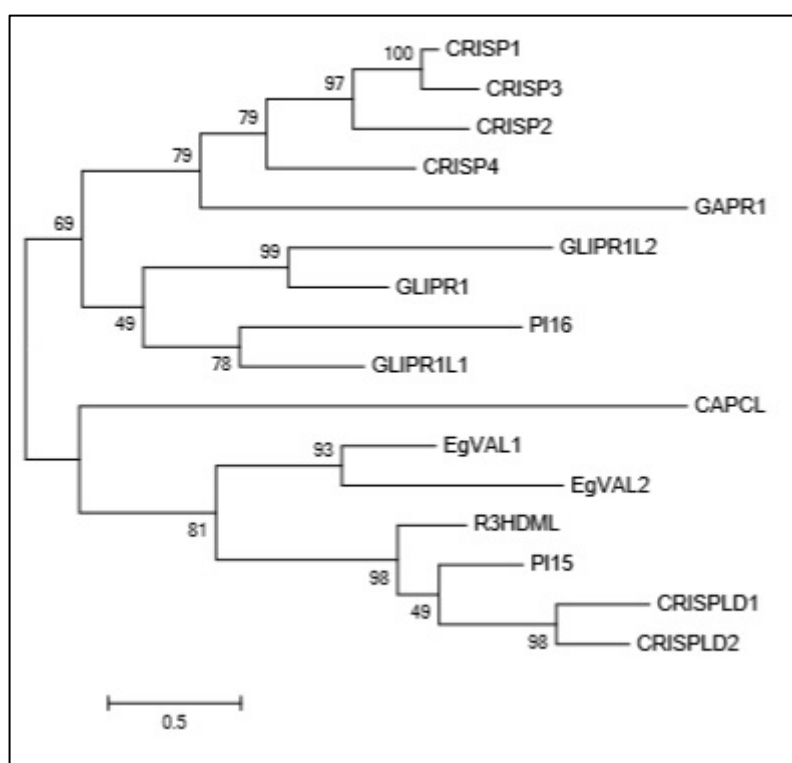


Figura 2. Relaciones filogenéticas. Árbol filogenético obtenido mediante análisis de máxima verosimilitud de las secuencias EgVALs y las secuencias de ratón representativas de cada familia. (Mm): *Mus musculus*. Los números en los nodos indican “bootsraping”.

Se realizaron además, reconstrucciones filogenéticas empleando los métodos “Neighbour Joining”, “Minimum Evolution”, “UPGMA” y “Maximum Parsimony”. Todo ellos arrojaron resultados similares al mostrado en la figura 2.

4.1.3 Comparación con proteínas CAP de helmintos

Las secuencias de las proteínas EgVALs fueron comparadas con secuencias de proteínas CAP de helmintos (nemátodos, tremátodos y cestodos).

Las CAPs de nematodos, conocidas con el nombre de ASP, se clasifican en 3 grupos, mientras que las de trematodos, conocidas como VALs, se clasifican en 2 grupos (Chalmers *et al.*, 2012; Osman *et al.*, 2012). Ambas clasificaciones consideran inserciones o deleciones de residuos. La comparación con los grupos de proteínas de nemátodos mostró que EgVAL1 coincide con el grupo 2 (ausencia del residuo conservado His69 y del enlace disulfuro N° 2) y EgVAL2 presentaba elementos típicos del grupo 1 (conservación de residuos de histidinas y posición de los enlaces disulfuro). La comparación con las secuencias de proteínas de *S. mansoni* mostró que ambas EgVALs comparten elementos característicos del grupo 1 (ausencia de los residuos conservados His21 y Tyr82). A pesar de que las proteínas ASPs de *Ancylostoma caninum* no tiene los motivos CAP típicos, presenta la estructura de sándwich α - β - α característica de la superfamilia (Figura 3).

Los datos preliminares obtenidos de proyectos genoma de los cestodos *T. solium*, *E. multilocularis*, *E. granulosus* y *Hymenolepis microstoma* indican la presencia de los motivos CAP y de residuos conservados compartidos con la superfamilia. Se tendrá una visión más clara de la familia VAL de cestodos, una vez que los proyectos genomas de los mismos se hayan completado.

Los motivos CAP consenso en las secuencias de cestodos aquí analizadas presentan un alto grado de conservación. En el motivo CAP1, de los 9 residuos que lo componen, los residuos de las posiciones 3, 4, 5 y 7 tienen entre un 80-85% de conservación. En el caso del motivo CAP2, de los 12 residuos, los que ocupan las posiciones 2 y 4 presentan un 85% de conservación. El motivo CAP3 se presenta altamente conservado en todas las secuencias analizadas, destacándose el residuo de la posición 5, una arginina, que se encuentra 100% conservada. Esta arginina es el único residuo que se encuentra con un 100% de conservación en estas secuencias. Por último, el motivo CAP4 también se encuentra altamente conservado en las secuencias de cestodos analizadas. Fuera de estos motivos, se observan una importante conservación de varios residuos como puede observarse en la figura 4.

		cap3		
EgVAL1	-----LSEEDRRSILELHTAAREQVR-----	PPASNMMLMKHSPR	35	
EgVAL2	-----QFPNEVEKAHLETHHDARENVY-----	PPASNMMLLLYSSH	37	
SmVAL4	-----EFKLSEGRRAIYNFHKVKRKDVKNCRIPG-----	QPPAKNLTKLKWNKL	44	
SmVAL13	-----MVDEQLNHDALNEHNRRLALHG-----	CPPLKYDRRLAREAQ	37	
NaAsp2	-----GCP-DNGMSEEARQKFLLEHNSLRSSVALGQAKDGAGGNAPKAAKMTMAYDCE	53		
AcASP3	-DADYSKCPQNEIMNNDMREKVTDMHNAYRSKFAR-----	DHQASKMRKLVYDCA	49	
AcASP7	LDIVIDNQSGGCMVDRPFREAITDFHNGLRQRIAKGEAEG----	YGPAREMYGLVYDCG	55	
		d		
		cap4		
EgVAL1	LENLAERWARRCR-----GVGQNLAAAGGL-----	VPTVRWLANMWKAEVK	76	
EgVAL2	LEQLADYWASRCRFEHPDWSHYPH--YHIGQNLAAVGGF----	KPAFTEAVCGWRHEEK	91	
SmVAL4	LANKAKQQAQRCKYDSNDPNDFIIGDFESIGQNLADY-----	PTIEGAMKDWLEEK	96	
NaAsp2	VEKTAMNNAKQCQVFKHSQPNQR-----KGLGENIFMSSDSGMDKAKAAEQASKAWFGELA	108		
SmVAL13	AWAENLARLKIMKHSICD-----EYGENLASAQSTG- KAEMTGARATRNWYDEIH	86		
AcASP3	IEKGIYESDTKCEMKP-----SMEENVEVIDGNSDDLTVISEAGNSWSEIL	97		
AcASP7	LEEEARKEIKLPGYAD-----LHHRGVTRFSG-----	DYEGSAISALKEIL	96	
		2/b		
		cap1		
EgVAL1	YYTYSNNSCIP----FKVCGHYTQMVAADSTELGCAINRCDSMLPAWRPPVYLVLCQYSP	132		
EgVAL2	YYSYFNNST-----HICGHYTQMVAATKWIGCAMRRGGMRADWHNPQYFTVCQYKT	145		
SmVAL4	NYNFEKNQCN-----GDCKNYKQMVWNTTIEIGCGYEKCG-----	KNYLIVCNYP	142	
SmVAL13	YHNFNKQFQSQ-----SGHFTQLIWKNTSKAGFGIHSVDG-----	HHVFIVGRYEP	133	
NaAsp2	EKGVGQNLKL TGGFLSRGVGHYTMVWQETVKLGCVYACS-----	NMCYVVCQYGP	160	
AcASP3	DLKGKDVYNS-----VDNTSEIANMAWESHAKLGCAVVECS-----	KKTHVVCRYGP	144	
AcASP7	ETFSADKNSMR-----QWYYPKATRFGCSGRLRRNKKTG--	MRRMDWVCVYDK	142	
		a		
		cap2		
EgVAL1	AGNFIGRKPY-----TEGGSCTK--CPTGYD--CTHNQ--CWSR--	165		
EgVAL2	AGNHYGERPY-----XYGPSCSQ--CPKRHS--CYRKQ--CVAYPTCKRVFPLMKL	190		
SmVAL4	GD--SEDRPY-----EAKP-ESK--CNKSE-----	162		
SmVAL13	PGNVNGQFLENVPPPIHQSTPKSKVPSYKHNEQNGPRRTYQDELIVIVRETDRKDHNHNSN	193		
NaAsp2	AGNMMGKDIY-----EKGEPCSK--CEN--CDK--EGLCSA-----	191		
AcASP3	EGKGEGKKIY-----EKGETCSQ--CSDYGQGVTCNDDEWEGLLCS-----	183		
AcASP7	KPK-DGESFE-----GGKPCNENKDYKYST-CEWNL--CYTFF-----	179		
		4		
		5/d		
		4		
		5		
EgVAL1	-----			
EgVAL2	AADRKDKVIPKVIDWT-----	206		
SmVAL4	-----			
SmVAL13	HITLIDSSKRSRDETIPNKNEVRIIRAEEKRQRRCAKRCSIM	236		
NaAsp2	-----			
AcASP3	-----			
AcASP7	-----			

Figura 3. Comparación de EgVALs con proteínas de nematodos y trematodos. La numeración de los aminoácidos indicada al derecho del alineamiento, comienza en el primer residuo después de péptido señal. La conectividad de los residuos de cisteínas en los enlaces disulfuro de *Ancylostomatidae* se indican con números. La conectividad de los residuos de cisteínas en los enlaces disulfuro de *Schistosoma mansoni* se indican con letras. Las cisteínas que podrían participar de enlaces disulfuro en EgVALs de acuerdo al modelado por homología se indican sombreados en amarillo. Los residuos típicos de las secuencias del grupo 2 de *S. mansoni* (His21, Tyr82) y del grupo 1 de *Ancylostomatidae* (His69, His129) se indican en anaranjado. Los residuos consenso de los motivos CAP están subrayados. Secuencias representativas de cada grupo: SmVAL4 grupo 1, SmVAL13 grupo 2, NaASP2 grupo 1, AcASP3 grupo 2, AcASP7 grupo 3.

KqVAL1	-----MNSANAETITLAIMIKAAHITLALFAVVRHAKKKD-----	39	
EgVAL2	-----MVCARNSLFVVKVFGILITLISTASCOFPNEVEKACQL-----	36	
EgGLIPR1	MIIVVLSAETPKHAAYVINVSTLDTTPHIDIPKAYNILLBYTNVKKPIYALVLPPIVYAKAIPTRKKKK	70	
EgGAPR1	-----MKVDLTFNKEGKIAHNFRLRLDGGCTFLVMGLDLAESAQAYAVV-----	44	
KqPI	-----MISKPIYAVLITPLVASKALNSKPKKK-----	28	
EgLOCL	-----MATFIYILTFATLVASNTPTAKERKDL-----	20	
EgVAL	-----MPRTMCPALITGVVPTNNRVETMKACIT-----	28	
EgVesV5	-----DGIGLAICFFIILSSVANAEFFNLTGGERQWLI-----	33	
EgPI16	-----MVDQCRFQVALIFQLVVCVLCVOCVRAEKIDVMRI-----	35	
EgVAL	-----MPRLMCFDALLCSVYTDNRVETMKAGLI-----	28	
EmGLIPR1	MGVLSALTILKRAAVSM-----LLNVTMIRKICALVLTPLVASEAPTEQEDRDLE-----	50	
KMR3HMDL	-----MKSAIN-----LIGGVMSLIGLISATMCCYVITNVKRAQL-----	35	
EmLOCL	-----MAKFIYILTFATLVVSNTPSAKERKDL-----	20	
EmVesV5	-----MIRPCLALCPPIIMRVANARIPENLTGGERQWLI-----	34	
EmPI16	-----MPLYLIFHSTVLITSLAAEISTSDREMLT-----	29	
EmVAL	---MNVANFLEELILESYHAAWWSHKKCKKCPDLD---DICKKFINETKCIIDKDAQKAPASTLSKKKK	66	
EmVAL3	-----MPRLMCFDALLCSVYADNRVETMKAGLI-----	28	
EmGAPR1	-----MKVDLTFNKEGKIAHNFRLRLDGGCTFLVMGLDLAESAQAYAVV-----	44	
EmVAL1	-----RFMFASFVGHFLQGGRLILLACLTCILVTEPPSQNGRQAIL-----	41	
EmVAL2	-----MTRIVCLILILISQVMAQVDTREARRAIL-----	28	
TsVAL2	-----ARGLVFN-----SARGITLVASEAPTEQEDRDLE-----	24	
TsVAL1	-----MRVANFFLLILLSAFQAIARWWSQEOCKCPGLDNDGSPFFINTFGGVDEDDSCAEVASELSKEKRELL-----	67	
TsGLIPR1	-----MKRNQCTMARLICHIVLITPLVASKALNSKPKKK-----	35	
TsPI16	-----MIRVAGLLTVLFVVTHITLNDGGERKDL-----	27	
TsICD1	-----MISKPIYAVLITPLVASKALNSKPKKK-----	28	
TsR3HMDL	-----MARFQCILILVTFVTSNTPTAKERKDL-----	20	
TsVesV5	-----MOQLVCFITVMVAVGDTATETMKACIT-----	29	
EmPI16	-----MISVLIILILNFTTLFARKANPQSVTQLE-----	28	
Cap 3		Cap 4	
EgVAL1	ELSTAAECGR-----PLASNMILMCHSPHILMCAKFAARRK-----	44	
EgVAL2	ETIDDAENYZ-----SEASNMILLISILHCCADYASRDETEED-----	WSQYPIYHGLICNIA	94
EgGLIPR1	DKNNKKCLAG-----PLATMILKMMVNSCKLMMAVKVKRCKKKH-----	WKRYPKYKRIICNIA	128
EgGAPR1	ARENGLIHSGLP-----DVGENLARLDGSEFMDISAAQVTLWYNEIKNYPFVGEDPIRCCGHPSILW-----	100	
KqPI	DKNNKKCLAG-----SEVANNILKMMVNSCKLMMAVKVKRCKKKH-----	WKRYPKYKRIICNIA	86
EgLOCL	HYNNHKAASK-----SEATNMELMVSLHMLADHWKRIYEDEN-----	STQYPEYROYICNIV	96
EgVAL	KAKKKHNNKK-----FRCKKLTPLKSTHKLMMAVKVKRCKKKH-----	KIKKPKANISAVI	83
EgVesV5	KTRNQISSEED-----SEAPNMEFLKSLIEVHEHASKLLSDAON-----	ISKMEMKSYNMLA	90
EgPI16	TRCCQYSLTQ-----AADWKMTRVMTERTATVVEKCPKSVRA-----	VRAQTRIDICNIA	91
EgVAL	EAKKSFNNFK-----FRGCKLTPLKSTHKLMMAVKVKRCKKKH-----	IDRRFANISAVI	83
EmGLIPR1	NFTNCKRSNN-----SEATNMELMVSLHMLADHWKRIYEDEN-----	WKRYPKYKRIICNIA	108
KMR3HMDL	EALQLVEMNL-----PLASNMILMCHSPHILMCAKFAARRK-----	PNIYHEKRIICNIA	93
EmLOCL	HYNNHKAASK-----SEATNMELMVSLHMLADHWKRIYEDEN-----	STQYPEYROYICNIV	96
EmVesV5	KTRNQISSEED-----SEAPNMEFLKSLIEVHEHASKLLSDAON-----	ISKMEMKSYNMLA	89
EmPI16	FLVVSAPVQC-----SEAVNMFPLMSSELDKIDARTAKTSNGTDFOP-----	AIPEEKPLFYVNICIA	94
EmVAL	DKNNKKCLAG-----FRCKKLTPLKSTHKLMMAVKVKRCKKKH-----	AKRTAKWVNICIA	123
EmVAL3	EAKKSFNNFK-----FRGCKLTPLKSTHKLMMAVKVKRCKKKH-----	IDRRFANISAVI	83
EmGAPR1	ARENGLIHSGLP-----DVGENLARLDGSEFMDISAAQVTLWYNEIKNYPFVGEDPIRCCGHPSILW-----	108	
EmVAL1	DYNRTGSSQ-----PLASNMILMCHSPHILMCAKFAARRK-----	PAIYTKYQGVNICIA	94
EmVAL2	EYTCQVHEED-----SEATNMELMVSLHMLADHWKRIYEDEN-----	PNIYTKYQGVNICIA	86
TsVAL2	NFTNCKRSNN-----SEATNMELMVSLHMLADHWKRIYEDEN-----	VNQHPEYSUNICNIA	97
TsVAL1	DEQNDYRIRARGQVPG-----SSSKHIDLCHPTDLAASQRIADTCCPAIDSE-----	ARMTAKWVNICIA	104
TsGLIPR1	DKNNKKCLAG-----SEVANNILKMMVNSCKLMMAVKVKRCKKKH-----	VNQHPEYSUNICNIA	83
TsPI16	DETCQISSEED-----PLASNMILMCHSPHILMCAKFAARRK-----	PQONPEYSUNICNIA	95
TsICD1	HYNNHKAASK-----SEATNMELMVSLHMLADHWKRIYEDEN-----	VTRYPEYUNICNIA	86
TsR3HMDL	HYNNHKAASK-----SEATNMELMVSLHMLADHWKRIYEDEN-----	LTQYPEYUNICNIA	96
TsVesV5	KVMSHNNKK-----FRCKKLTPLKSTHKLMMAVKVKRCKKKH-----	KIKKPKANISAVI	84
EmPI16	DSNQASSEDS-----SEATNMELMVSLHMLADHWKRIYEDEN-----	KN DMYENTICNIA	95
Cap 1			
EgVAL1	ASGGVL-----PIVRLANMCAVICYITYSNNSIIPKVGCHTIDVHADSTELSCINRDSMLP-----	146	
EgVAL2	AVCCFK-----DAPTEAVCCRDCEKYSEYFNSTI-----HIICHTQCNVANTGWICIMRRDCLRA-----	154	
EgGLIPR1	LSGGSK-----RNILVAQATQNNVAYETIYANNITASGKVKSTILVNASGELSCVVKQDILKP-----	140	
EgGAPR1	KNTTANG-----MGVAESADKTAVTVVAIXRPGNTRGQGNVNFLLIIGIPIHATSVEELTGAMNAE-----	170	
KqPI	LSGGSK-----RNILVAQATQNNVAYETIYANNITASGKVKSTILVNASGELSCVVKQDILKP-----	128	
EgLOCL	LPGGVS-----RNLVEMAARKWEVHDTSEYERNKLAERKVCIDIDVNSTNELSCVVKQDILKP-----	140	
EgVAL	RHPIYA-----RIVRHWLTHMTKRIANPATGKTI-----ASTQCHTGVVQPNDFNFCVVKFLVVKP-----	144	
EgVesV5	LSTKGR-----ASVEELATAHQKAITNASKDSC-----MNGEKKVYANSTUNSCAKAGNNSS-----	147	
EgPI16	SATYPPHQAQC-----YFKDQTSIIDQWGSORNYYPDKZIP-----CHPIIDWVVSANACVSTKVKVTPKN-----	158	
EgVAL	SSPIYA-----SIVRWIRIMSTERGANPATGKTI-----ASTQCHTGVVQPNDFNFCVVKFLVVKP-----	144	
EmGLIPR1	LSCCSR-----RNILVAQATQNNVAYETIYANNITASGKVKSTILVNASGELSCVVKQDILKP-----	170	
KMR3HMDL	LYFGKK-----PPLDSVCCASAVKRIYISINRCS-----RVLRKILVANTUELGCMMRYDVLPE-----	153	
EmLOCL	LPGGES-----RNLVQMAARKWEVHDTSEYERNKLAERKVCIDIDVNSTNELSCVVKQDILKP-----	140	
EmVesV5	LSYNGK-----ASVKKIATASCHKAKHNASIKSHC-----VDEKGGKMMANRRHMKCAISNNNS-----	128	
EmPI16	MISTEGLRDPNEAPPSIETFFNIDINRINFELNIERGGYGGQEQIIRADTEYLGRSVLDQGVK-----	150	
EmVAL	YS-----SRVARNVEMMNYKIDNNYRHHYH-----CICQCHTGVVQPNDFNFCVVKFLVVKP-----	182	
EmVAL3	SSPIYA-----SIVRWIRIMSTERGANPATGKTI-----ASTQCHTGVVQPNDFNFCVVKFLVVKP-----	144	
EmGAPR1	KNTTANG-----MGVAESADKTAVTVVAIXRPGNTRGQGNVNFLLIIGIPIHATSVEELTGAMNAE-----	170	
EmVAL1	IIGGKK-----PAMEELAEKIDZKIDYIDNSAGGKVGCHTILVNASGELSCVVKQDILKP-----	161	
EmVAL2	LSGCKP-----OSPTOMATITVYVFNITVHARRS-----SVQCHTGVVQPNDFNFCVVKFLVVKP-----	146	
TsVAL2	LSGGSS-----RNILVQASQNNVYNTYTTINTATGKVGCHTIDVHADSTELSCVVKQDILKP-----	149	
TsVAL1	YS-----SSVQNVEMMNYKIDNNYRHHYH-----CICQCHTGVVQPNDFNFCVVKFLVVKP-----	190	
TsGLIPR1	LSGGSS-----RNILVQASQNNVYNTYTTINTATGKVGCHTIDVHADSTELSCVVKQDILKP-----	155	
TsPI16	ISGGKA-----PDVGLSCQADVHYKITYGNSITFGKAGHTICNVNSTSKELSCINRDNIFP-----	147	
TsICD1	LSGKNN-----RNLVMAARKWEVHDTSEYERNKLAERKVCIDIDVNSTNELSCVVKQDILKP-----	128	
TsR3HMDL	LSGGVS-----RNLVMAARKWEVHDTSEYERNKLAERKVCIDIDVNSTNELSCVVKQDILKP-----	140	
TsVesV5	RHPIHW-----PIVRHWLTHMTKRIANPATGKTI-----CHPIIDWVVSANACVSTKVKVTPKN-----	145	
EmPI16	ITFGHQN-----VDFEIVDIDILKEKIDYIDNSAGGKVGCHTILVNASGELSCVVKQDILKP-----	147	

	Cap 2	bisagra	
EgVAL1	<u>A</u> WRDPVYV <u>Y</u> Q <u>Y</u> SSACNPTGRKP-----YTFGAGCTKCPPTGV-DCTHNQGWAR-----		194
EgVAL2	DWNPNQYFTVQCKTAGNYHGEWF-----YKYQPSCSQCPKRH-SCYRKQCVAIPTCKSVFPLM-----		212
EgGLIPR1	TWERPIYLMAQQAAPGNVGERP-----YTSITSCSKCPNGT-TCVNKLCSKGGSQTNSTP-----		216
EgGAPR1	PKSVKKEERATPSSQTSARDTNQLLDKSEDSLEHTEFPAS-PSKREMKVQSPKADLPFTLTQMNE		239
EgPI	DWEKPIFLMAQQAAPGNVGMKEP-----YKIDASCSCQCPHGT-TCVNKLCSKGRGPQTTTTTAPSKPST		212
EgLCCL	DWEFPVYLLAQQAAPGNVGMKEP-----YKIDRSCRDCEPFT-KCNMLCSTK-----		196
EgVAL	A-PIPSHLSVQLRAVDQCTPIQQ-----REG-LTACITRN-TTTRGQTTTT-TITTTTATKAPTPTT		203
EgVesVh	-----ALLCLSSGGNWSREQP-----YIKITAGSGCKGNV-TCQNGQCEPETSCKSLG-----		196
EgPT16	-----TMYCTNSRANNEEDAP-----PKTKAGSACPYCYSKCPQCMGVARKNLLTEPEPLDGLDA		216
EgVAL	A-PIPSHLSVQLRAVDQCTPIQQ-----REG-LTACITRN-TTTRGQTTTT-TITTTTATKAPTPTT		203
EmGLIPR1	DWEKPIFLMAQQAAPGNVGERP-----YTSITSCSKCPNGT-TCVNKLCSKGGSQTNSTP-----		226
EmR3HDM1	GYQNPQYLIVCQAPGNVAGQRP-----YISSELGCGNSTQ-SCLRNQCAKHNNSR-LYPE-----		210
EmLCCL	DWEFPVYLLAQQAAPGNVGMKEP-----YKIDRSCRDCEPFT-KCNMLCSTK-----		196
EmVesV5	-----ALLCLSSGGNWSREQP-----YIKITAGSGCKGNV-TCQNGQCEPETSCKSLG-----		197
EmPI16	R-DVLVCCYVSSGNVSELQP-----YQHLESEGDFPLDE-EPWIMQPYEETFTFPLDS-----		209
EmVAL	-----WSVTTVRVCTG-----MAPDHTKVLK-SCDFT-----		209
EmVAL3	A-PIPSHLSVQLRAVDQCTPIQQ-----REG-LTACITRN-TTTRGQTTTT-TITTTTATKAPTPTT		203
EmGAPR1	PKSKKKEKCVAPSSQTSARDTNQLLDKSEDFSLCTAFPSAS-PSKRETKCVQSPKADLPFTLTQMNE		239
MvVAL1	SWKPKVYLMAQQAAPGNVYIG-----YKIDRSCRDCEPFT-KCNMLCSTK-----		182
MvVAL2	EWTELVYLMAQQAAPGNVYIGWF-----YKIDRSCRDCEPFT-KCNMLCSTK-----		202
TsVAL2	DWEFPVYLLAQQAAPGNVGMKEP-----YIGITSCS-----		181
TsVAL1	N-AVYVVCKGGSSD-----DFTWDHFWRW-ICLYML-----		222
TsGLIPR1	DWEFPVYLLAQQAAPGNVGMKEP-----YIGITSCSQCPSGT-KCVNNLCSREGSRASTAASYTWKCA		219
TsPT16	PWPKPIYLIAQQAAPGNVYIGKP-----YKIDRSCRDCEPFT-KCNMLCSTK-----		196
TsLCCL	DWEKPIFLMAQQAAPGNVYIGKP-----YTSITSCSCEPPT-ACVNNLCSKGGDHQAAM-----		204
TsR3HDM1	QWSDPVYLLAQQAAPGNVYIGKP-----YKIDRSCRDCEPFT-KCNMLCSTK-----		164
TsVesV5	K-PKEMLSVQLRAEKQSDPIQLGAHSVITTCSTTTYMTA-TSISESDTTGSEVLSSTSELPFVPI		213
EmPI16	GHPQPTLYVCCQAPGNVYIGKP-----YKIDRSCRDCEPFT-KCNMLCSTK-----		195
EgVAL1			194
EgVAL2	ELADIKKKVIEKCV IANK		230
EgGLIPR1	STGPITRVGGMALFTTILAYAF		269
EgGAPR1	EESAGSASKVKNFASLKPRQIDEGAVFAMEVFMALNQRRVALGLPFTLNEDFDHLAQELAKELKSGDS		309
EgPI	TKASNTACTTSTASITWVGTALFATILVYAF-----		245
EgLCCL	-----SASYTRFEGLLLCAVLIVYFL-----		219
EgVAL	VTSTGSDPAPSVSTILSEETQRLQYFTVFPVDNDSEVVRGSDKEEVG-EGEEDV-QVEEDEKEE-RED		269
EgVesV5	-----TIFWGIMAAIFYYTF-----		212
EgPI16	APSTGENDNTEINDSGTDSYGDPEUSTSLVLLTSSICIFLUSLLV		262
EgVAL	VTSTGSDPAPSVSTILSEETQRLQYFTVFPVDNDSEVVRGSDKEEVG EGEEDV QVEEDEKEE KED		269
EmGLIPR1	STGPITRVGGMALFTTILAYAF		249
EmR3HDM1	-----ALKNPKYKTLKCLNITP-----		228
EmLCCL	-----SASTRRFRERILLCAMIMVYYP-----		219
EmVesVh	-----TIFWGIMAAIFYYTF-----		212
EmPI16	-----PMANSPBALVLMCFAPLIS-----		224
EmVAL			209
EmVAL3	VTSTGSDPAPSVSTILSEETQRLQYFTVFPVDNDSEVVRGSDKEEVG-EGEEDV-QVEEDEKEE-RED		269
EmGAPR1	EESAGSASKVKNFSSSLKPRQIDEGAVFAMEVFMALNQRRVALGLPFTLNEDFDHLAQELAKELKSGDS		309
MvVAL1			182
MvVAL2			202
TsVAL2			181
TsVAL1			222
TsGLIPR1	IG-LNVEGQACEGDFLRHLITALFDTRFTVRQ-----		250
TsPI16			195
TsLCCL	-----STASITRAUGVLLAVILAHFV-----		227
TsR3HDM1			164
TsVesV5	STEMEIEADGIVKEDDEEEKKEESFKSDYEGDEEEKKEESFKSENEGDEEGKEESIKLESEVDERKKE		203
EmPT16			195

Figura 4. Comparación de EgVALs con proteínas CAP de cestodos. Los residuos consenso de los motivos CAP están subrayados. En azul claro se indican los residuos con un 70% de similitud y en azul oscuro los residuos idénticos con igual proporción.

4.1.4 Modelado por homología

Se realizó el modelado por homología de EgVAL1 y EgVAL2 utilizando como molde los datos cristaloográficos de las proteínas que tienen mayor identidad con las proteínas en estudio. La desviación de la media cuadrática (RMSD) global entre los modelos y sus moldes fue de 1,65 Å para EgVAL1 y 1,21 Å para EgVAL2. El RMSD es la medida de la distancia promedio entre los átomos de proteínas superpuestas. Para verificar la estabilidad e integridad de los modelos, se determinó la evolución de la energía potencial (dinámica molecular). En ambos modelos se observa el dominio central típico de las proteínas de la superfamilia CAP, compuesto por un sándwich α - β - α de tres hebras β rodeadas de hélices α por ambos lados, y un dominio C-terminal compuesto por dos hebras β cortas y dos enlaces disulfuro. El modelo de EgVAL2 tiene una extensión adicional de 29 residuos.

Se identificaron 3 enlaces disulfuro en EgVAL1: Cis107-Cis128 que conecta dos cadenas β del dominio central; Cis148-Cis157 y Cis151-Cis162 en la región bisagra que conecta el subdominio N-terminal con el dominio CAP. El modelo de EgVAL2 tiene el mismo patrón de enlaces disulfuro que EgVAL1 en las posiciones Cis120-Cis141; Cis161-Cis170; Cis164-Cis175 y un cuarto puente adicional que conecta la Cis49 con la Cis125. La figura 5 indica la estructura secundaria de cada proteína modelada luego de los 5 picosegundos de dinámica molecular mientras que las estructuras terciarias de las EgVALS modeladas, se muestran en las figuras 6 y 7.



Figura 5. Estructura secundaria de EgVALs. Las ondas rojas indican las α hélices. Las líneas azules indican giros β . Las flechas amarillas indican las cadenas β . Los recuadros en rojo indican las cisteínas que participan en enlaces disulfuro.

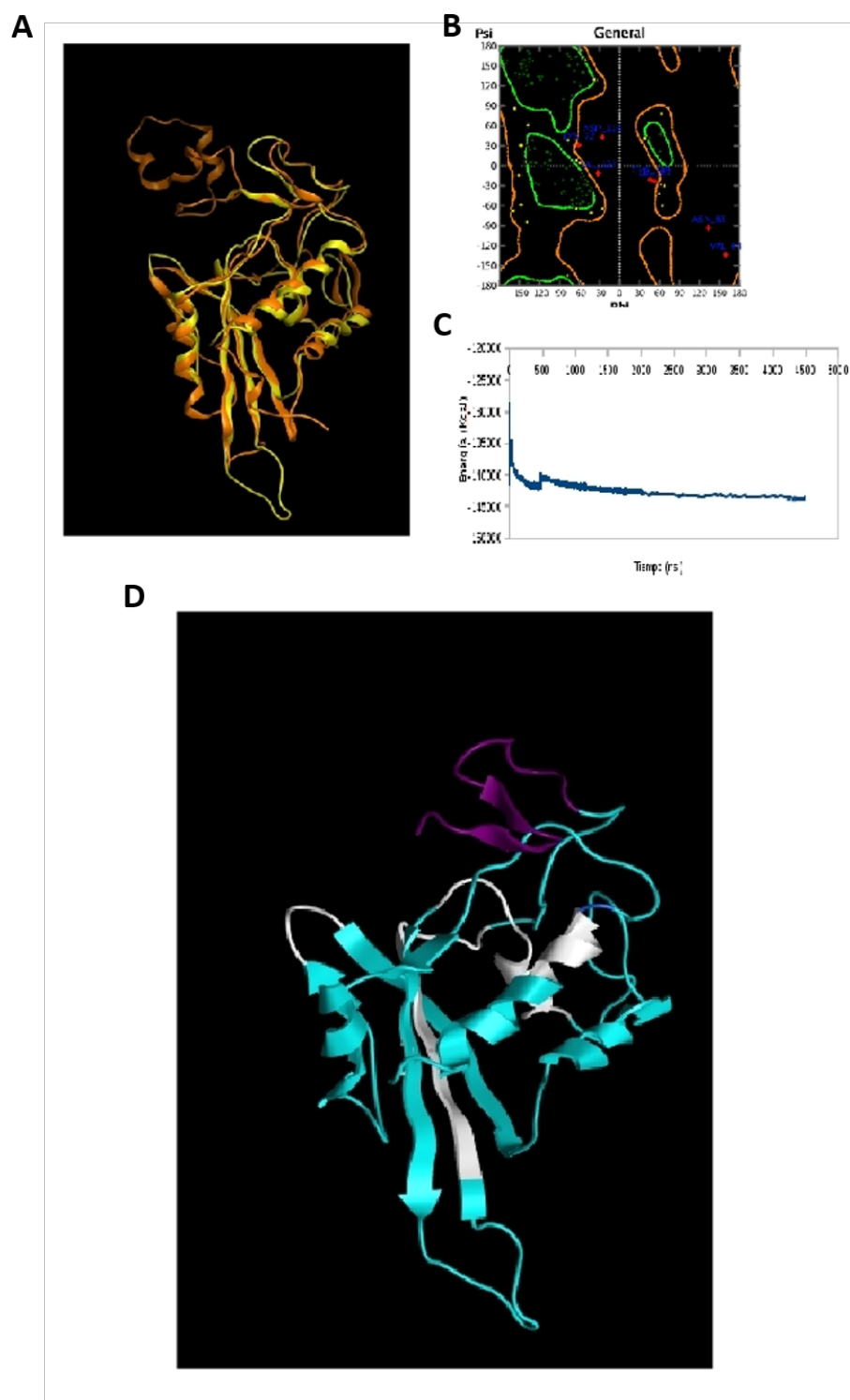


Figura 6. Modelado por homología de EgVAL1. A) Superposición del molde (1RC9.pdb) con el modelo de EgVAL1 obtenido. B) Mapa de Ramachandran. C) Dinámica molecular hasta los 5 picosegundos. D) Modelo luego de 5 picosegundos de simulación. En blanco se indican los motivos CAP y en violeta la región bisagra.

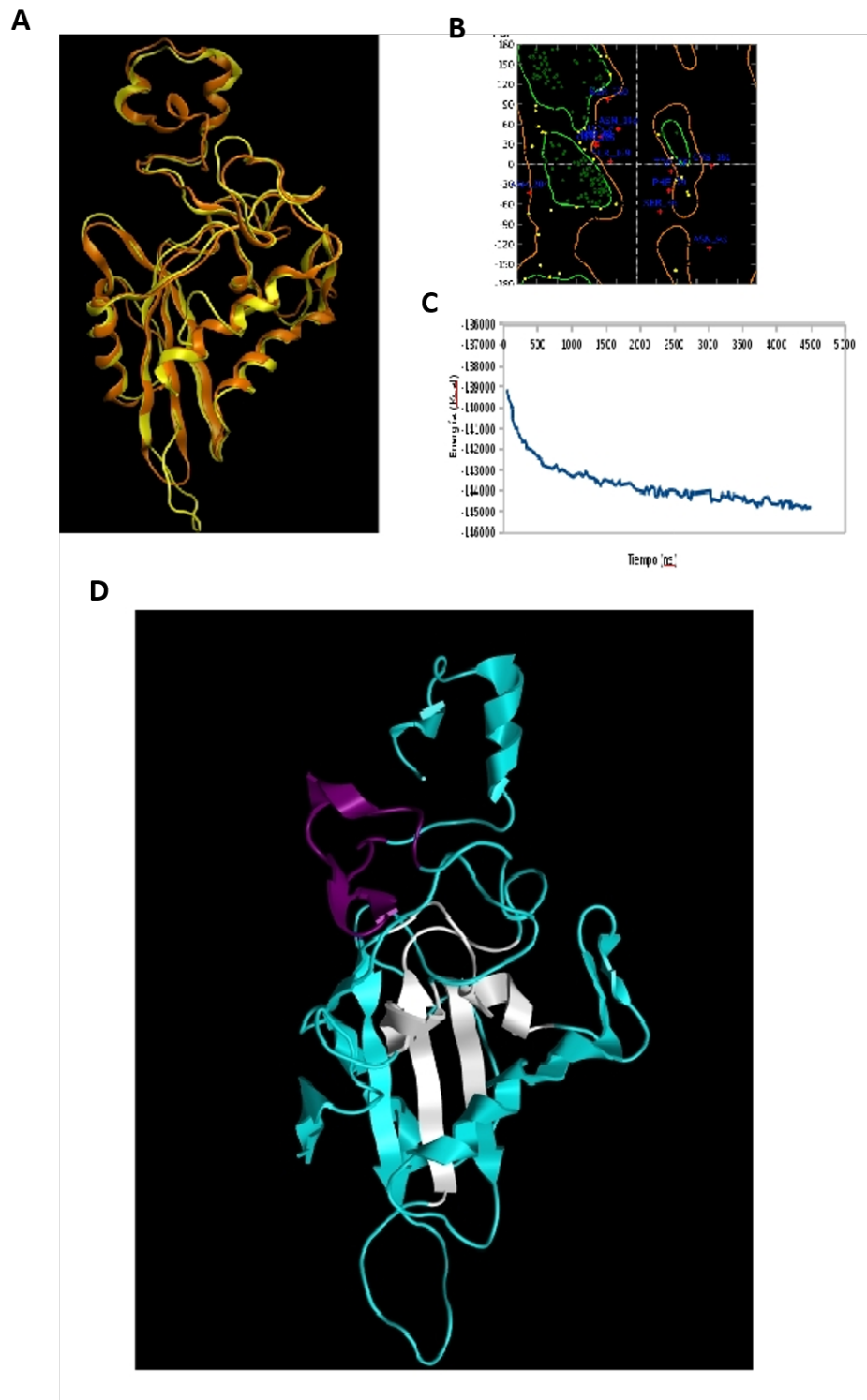
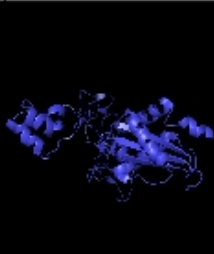
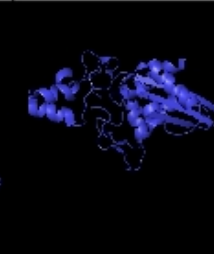
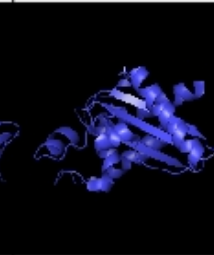
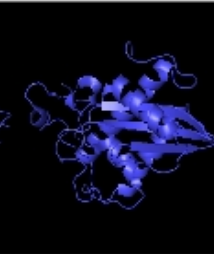
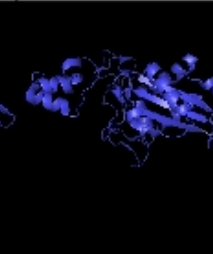
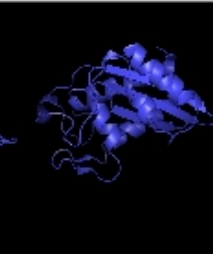


Figura 7. Modelado por homología de EgVAL2. A) Superposición del molde (2DDB.pdb) con el modelo de EgVAL2 obtenido. B) Mapa de Ramachandran. C) Dinámica molecular hasta los 5 picosegundos. D) Modelo luego de 5 picosegundos de simulación. En blanco se indican los motivos CAP y en violeta la región bisagra.

En la figura 8, se observan las proteínas CAP cuya estructura se conoce. Es interesante observar que EgVAL2 tiene una extensión C-terminal similar a las proteínas Triflin, Stecrisp, Ves V5, Pseudecin y Natrin. Este región presente en las proteínas de la familia CRISP (Figura 9), es similar a los de la pequeña toxinas peptídicas SHK y BGK, las cuales se piensa que están relacionadas con el bloqueo de canales iónicos (Shikamoto et al., 2005). Sin embargo, en el caso de EgVAL2, este dominio no presenta todos los elementos característicos de los bloqueadores de canales iónicos. Por otro lado, la EgVAL1 presenta similitud estructural con GliPR-1, Na-ASP2 y Ac-ASP7. Además de presentar el sándwich α - β - α , estas proteínas presentan el subdominio N-terminal de la región C-terminal de las proteínas de la familia CRISP. Es intresante mencionar que Na-ASP2, proteína de *Necator americanus* secretada en el estadio larvario infectivo, ha sido evaluada como candidato vacunal en ratones, generando protección contra las infecciones por *N. americanus* (Diemert et al., 2012).

Figura 8. Estructuras tridimensionales de las CAPs

Triflin (1WVR.pdb) Veneno de serpiente		P14 (1CFE.pdb) Toxina del tomate		Na-Asp2 (1U53.pdb) Alergeno de Ancylostoma	
Stecrisp (1RC9.pdb) Veneno de serpiente		Soli-3 (2VZN.pdb) Veneno de hormiga colorada		Na-Asp1 (3NT8.pdb) Alergeno de Ancylostoma	
VesV5 (1QNX.pdb) Toxina de avispa		Tablisyn-15 (3U3N.pdb) Toxina de tábano		Asp7 (3GS6.pdb) Alergeno de Ancylostoma	
Pseudecin (2DDB.pdb) Veneno de serpiente		GAPRI (1SBM.pdb) Humana		Asp1 (4TPV.pdb) Alergeno de Ostertagia	
Natrin (1XTA.pdb) Veneno de serpiente		GLIPR-1 (3Q2U.pdb) Humana		Val4 (427.pdb) Alergeno de Schistosoma	

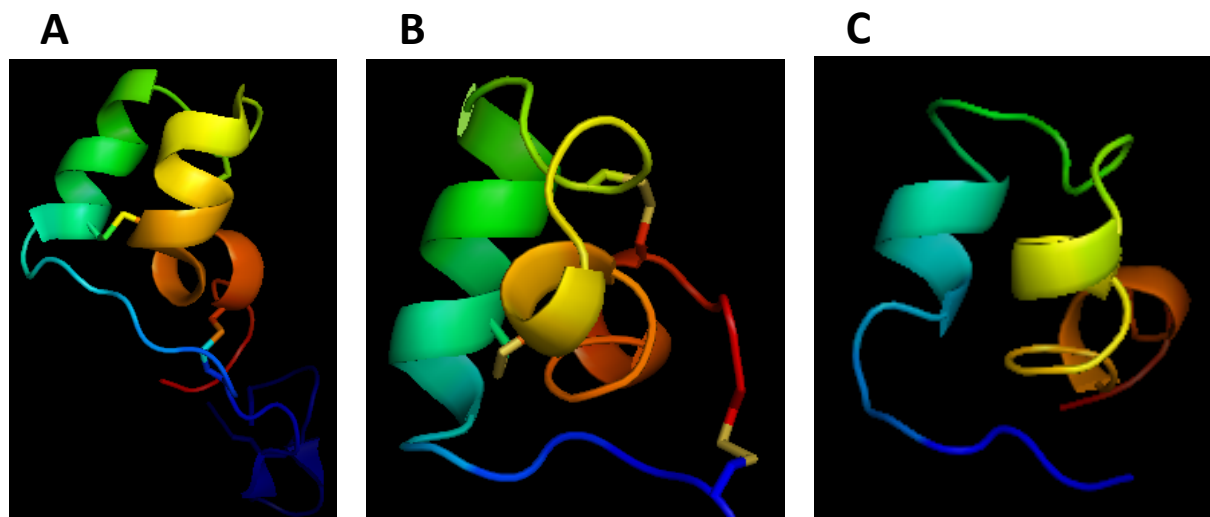


Figura 9. Comparación de la estructura de la toxina Bgk con el subdominio C-terminal de Triflin y EgVAL2. A) Estructura del dominio C-terminal de la proteína Triflin (1WVR.pdb). B) Estructura de la toxina Bgk (BGK.pdb). C) Estructura de la extensión C-terminal de EgVAL2.

A partir de la estructura tridimensional de proteínas de la superfamilia, se ha descrito una hendidura donde se ubican residuos altamente conservados y accesible al solvente: His, Glu / Gln y Ser (Fernández *et al.*, 1997; Szyperski *et al.*, 1998; Chalmers *et al.*, 2008; Asojo *et al.*, 2004). Dado que estadísticamente los sitios activos de las enzimas están localizados en hendiduras, esto sugiere que las proteínas de la superfamilia podrían tener funciones enzimáticas cuyo sitio activo estaría formado por estos aminoácidos (Laskowski *et al.*, 1996). El modelado por homología de la superficie accesible demostró que ambas EgVALs poseen la hendidura que contiene a los residuos His93 y Glu74 de EgVAL1, y His53, Glu89 y His106 de EgVAL2 en una posición tridimensional conservada. La Figura 10 muestra la superposición de los residuos conservados con la proteína Triflin.

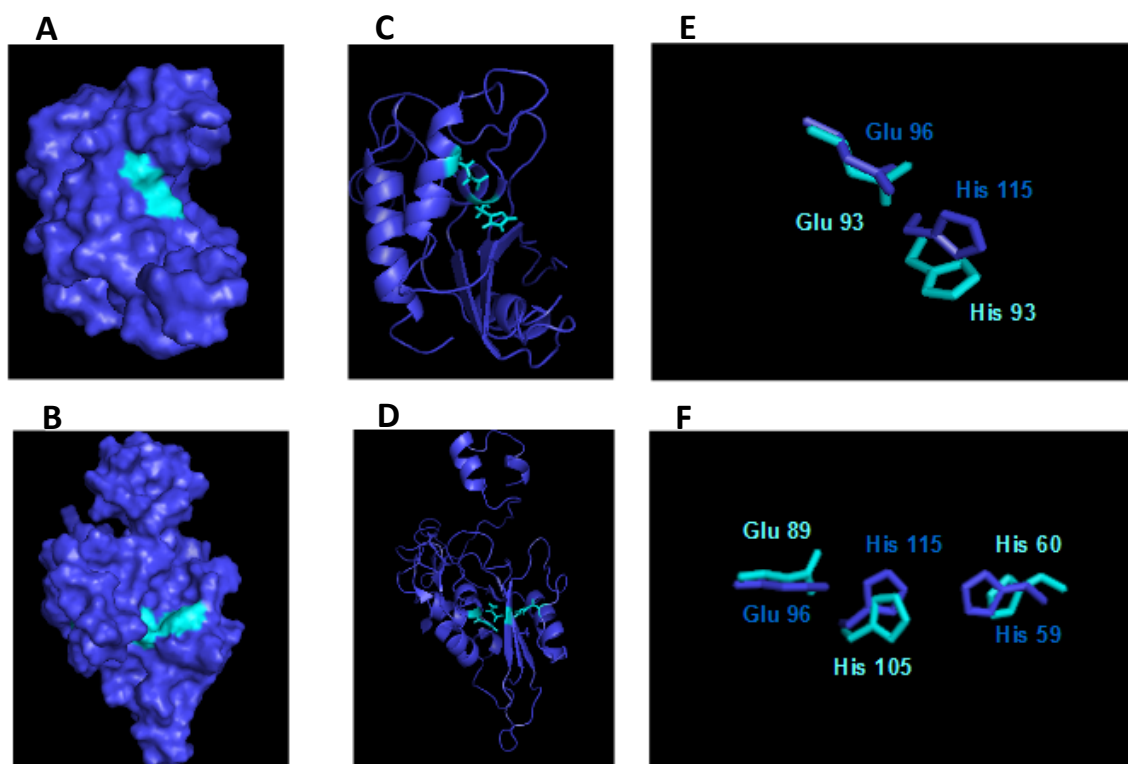


Figura 10. Representación de la hendidura conservada. A y B) Superficies accesibles al solvente de las EgVAL1 (A) y EgVAL2 (B). C y D) Representación en cintas de la estructura tridimensional de EgVAL1 (C) y EgVAL2 (D). E y F) Superposición de los aminoácidos conservados de EgVAL1 (E) y EgVAL2 (F) con la proteína Triflin, (azul). En turquesa se muestran los residuos conservados de EgVALs.

4.2 Expresión de las proteínas EgVAL1 y EgVAL2

4.2.1 Estudios de expresión de EgVAL2

Los antecedentes de producción de las proteínas EgVAL detallados anteriormente, hizo necesario mejorar las condiciones de expresión para obtener ambas proteínas con buen rendimiento y de forma soluble. Uno de los motivos que explicarían la baja expresión obtenida de las EgVALs por el grupo de la Dra. Estela Castillo, es que la proteína pueda resultar tóxica para las bacterias. Por dicha razón, eligieron la cepa BL21(DE3)pLysS y el vector de expresión pET22b(+).

El vector de expresión de EgVAL2 es el pET22b(+), que tiene una secuencia señal pelB en el extremo N-terminal, para potenciar de localización periplásmica de las proteínas y una cola de 6 histidinas en el extremo C-terminal. La localización periplásmica influye en el correcto plegado, la solubilidad y la formación de enlaces disulfuro de las proteínas expresadas (GE Healthcare Life Sciences, Recombinant Proteins Purification). La secuencia codificante es transcrita por la ARN polimerasa del bacteriófago T7. La cepa de *E. coli* elegida para expresar a EgVAL2 fue BL21(DE3) pLysS. Esta cepa permite la expresión con alta eficiencia de genes que estén bajo el control del promotor de T7 y que tengan un sitio de unión al ribosoma. Además, está optimizada para la expresión de proteínas tóxicas ya que reprime a la ARN polimerasa T7 hasta el momento de la inducción con IPTG, evitando la expresión basal. Si bien Costábile (2013) la utilizó para la expresión de proteínas CAP de *M. corti* sin tener un buen resultado, en este trabajo evaluamos distintas condiciones de expresión de las proteínas en este sistema. Algunos cambios en las condiciones del cultivo, como la baja de la temperatura y la variación de los tiempos de inducción pueden reducir la tasa de crecimiento de las bacterias y de esta manera optimizar la expresión de las proteínas en forma soluble. Se estudió así, la expresión de las EgVALs a diferentes temperaturas (30°C y 37°C) y tiempos de inducción (2 hs y 4 hs).

Partiendo de cultivos de 250 ml de medio, se ensayaron las 4 condiciones mencionadas. Se colectaron alícuotas antes y después de realizar la inducción de la expresión con IPTG en la fracción soluble e insoluble, las cuales fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%, en condiciones desnaturalizantes y visualizadas por tinción de Azul de Coomassie, no observándose una inducción evidente en la fracción soluble (no se muestra). A

pesar de este resultado, seguimos adelante con las purificaciones agregando 8 M de urea al tampón de unión.

El resto de cultivo se centrifugó y se homogeneizó en el tampón de unión conteniendo 20 mM de imidazol. La adición de 20 mM de imidazol evita la unión de proteínas de forma inespecífica. Se realizaron luego las cromatografías de afinidad en pasos, a concentraciones crecientes de imidazol (de 20 a 500 mM). No se visualizaron picos en los cromatogramas que evidenciaran la presencia de la proteína por lo que se eligieron fracciones seriadas para analizar por electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturizantes y posterior tinción con Azul de Coomassie (Figura 11). La razón por la cual no se vió picos en estos cromatogramas es que el imidazol presenta absorbancia a 280 nm y la cantidad de proteína expresada es muy poca, por lo que el pico correspondiente a la elución de EgVAL2 se ve enmascarado por la absorbancia del imidazol (no se muestra).

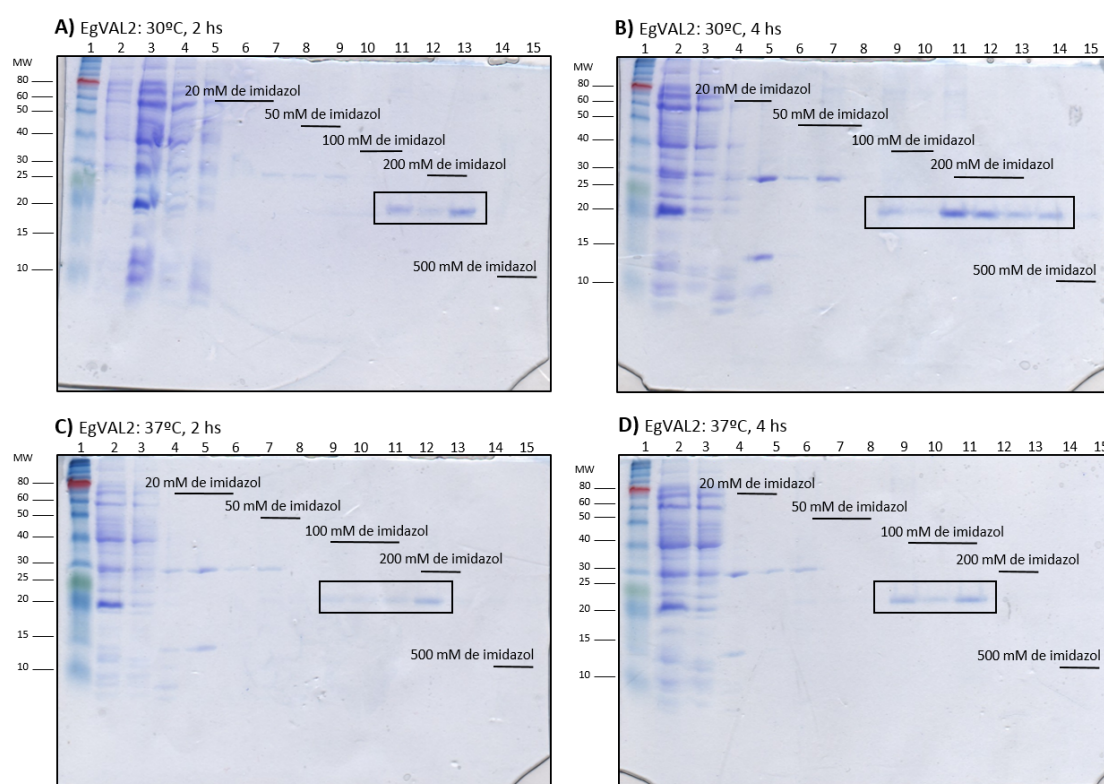


Figura 11. Cromatografías de afinidad de EgVAL2. Electroforetogramas (SDS-PAGE 15%) de las muestras seleccionadas. A) Expresión de EgVAL2 durante 2 hs a 30°C. Carriles 1-4: marcador de peso molecular, muestra no inducida, muestra inducida, percolado; carriles del 5 al 15 volúmenes de elución: 3.4 ml, 8.5 ml, 11.9 ml, 15.3 ml, 18.7 ml, 23.8 ml, 27.3 ml, 32.3 ml, 37.4 ml, 47.6 ml y 51 ml. B) Expresión de EgVAL2 durante 4 hs a 30°C. Carriles 1-3: marcador de peso molecular, muestra inducida, percolado, carriles del 4 al 15 volúmenes de elución: 5.1 ml, 8.5 ml, 13.6 ml, 17 ml, 22.1 ml, 27.3 ml, 30.6 ml, 35.7 ml, 39.1 ml, 42.5 ml, 47.6 ml y 51 ml. C)

Expresión de EgVAL2 durante 2 hs a 37°C. Carriles 1-15: marcador de peso molecular, muestra inducida, percolado, volúmenes de elución: 5.1 lml, 8.5 ml, 11.9 ml, 17 ml, 20.4 ml, 25.5 ml, 28.9 ml, 32.3 ml, 37.4 ml, 42.5 ml, 47.6 ml y 51 ml. D) Expresión de EgVAL2 durante 4 hs a 37°C. Carriles 1-3: marcador de peso molecular, muestra inducida, percolado, volúmenes de elución: 5.1 ml, 8.5 ml, 15.3 ml, 18.7 ml, 22.1 ml, 25.5 ml, 30.6 ml, 35.7 ml, 39.1 ml, 42.5 ml, 47.6 ml y 51 ml. El recuadro indica a EgVAL2. Se indica la concentración de imidazol adicionada al buffer de unión en cada paso. En todos los casos se cargó 10 µl de marcador de peso molecular (BioLabs), 3 µl de muestra no inducida, muestra inducida y percolado y 15 µl de cada fracción.

Analizando el resultado de las cuatro cromatografía concluimos que se obtuvo un mayor rendimiento cuando la inducción se realizó a 30°C durante 4 hs (Figura 11D). La cantidad de proteína obtenida por litro de cultivo fue 1 mg. A pesar de los cambios realizados para obtener la proteína soluble. A continuación se muestra la proteína purificada y concentrada solubilizada en 8 M de urea.

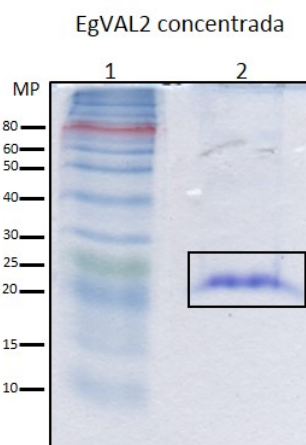


Figura 12. EgVAL2 concentrada. SDS-PAGE al 15%. Carril 1: marcador de peso molecular (10 µl), carril 2: EgVAL2 pura y concentrada (22.5 µl). El recuadro indica a EgVAL2.

4.2.2 Optimización de la secuencia de EgVAL1 para su expresión en *E. coli*

En trabajos previos realizados por el grupo de investigación de la Dra. Estela Castillo, se observó un bajo rendimiento de EgVAL1 con respecto al obtenido con EgVAL2 se envió la secuencia original de EgVAL1 al servicio GenScript, el cual utiliza el algoritmo OptimunGene™ para mejorar la expresión del gen en cepas de *E. coli*.

La optimización de la secuencia se realizó mediante ajuste del uso de codones, ajuste del contenido GC, ajuste de sitios para enzimas de restricción y elementos actuando en *cis* y remoción de secuencias repetidas. La secuencia nativa de EgVAL1 emplea codones raros en tándem que pueden reducir la eficacia de la traducción o incluso desenganchar la maquinaria

de traducción. Se sesgó el uso de codones de la secuencia para *E. coli* mediante la mejora del índice de adaptación de codón (CAI) de 0,61 (secuencia original) a 0,87 (secuencia optimizada) (Figura 13). El CAI fue definido por Sharp y Li (1987) para cuantificar las similitudes del uso de codones entre una secuencia de codificación y un conjunto de secuencias de referencia. Cuando existen codones sinónimos para un aminoácido dado, los genes altamente expresados prefieren algunos de ellos, de acuerdo a la abundancia de los tRNA. Existe evidencia experimental de que ciertos codones pueden afectar nivel de expresión. Esto sugiere que para tener un nivel de expresión máximo de un gen heterólogo, es necesario que el uso de codones se corresponda con el del huésped elegido (Ramazzotti *et al.*, 2007; Sharp y Li, 1987). Además, recientemente se descubrió que el uso de los codones no óptimos desestabiliza al ARNm (Presnyak *et al.*, 2015).

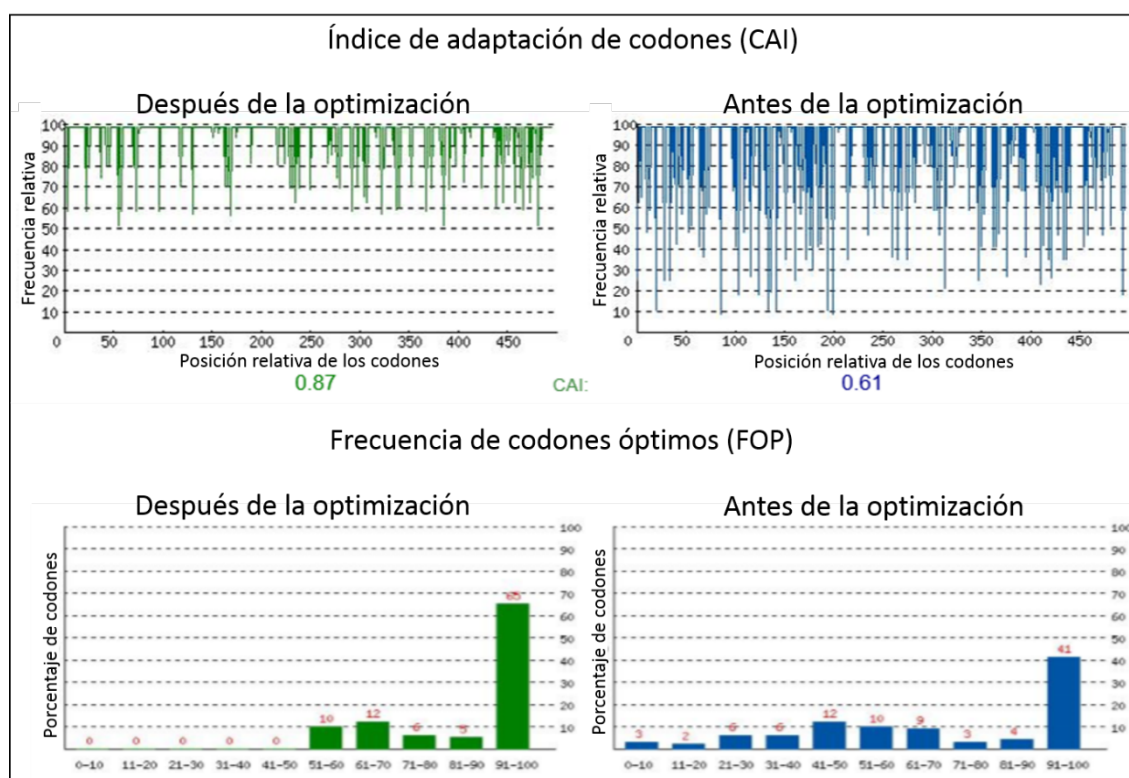


Figura 13. Optimización del uso de codones.

Por otro lado, se optimizó el contenido de GC (Figura 14) para prolongar la vida media del ARNm. Se rompieron las estructuras de tallo-bucle que desfavorecen la unión del ribosoma al ARNm y la estabilidad del mismo. Además, el proceso de optimización modificó los elementos que actúan en *cis* de forma negativa.

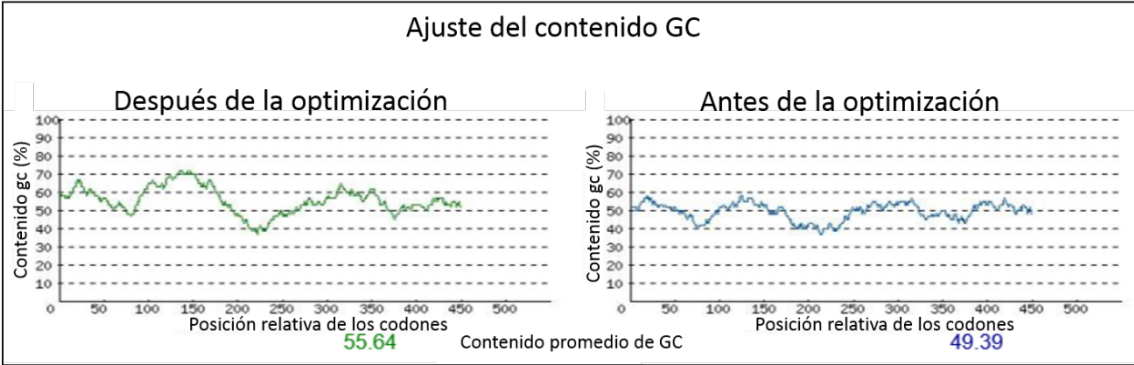


Figura 13. Ajuste del contenido GC en la secuencia de EgVAL1.

A continuación se muestra el alineamiento entre la secuencia original y la secuencia optimizada:

Optimized	8	CTGTCAGAA GAAGAT CGT CGCTCAATCCTG GA ACTGCACACCGCCGCC CGTGAACAA GTCT
Original	8	CTTAGTGAAGAGGACCGTAGGAGCATTCTTGA ACTTCACACAGCAGCT CGTGAGCAAGTG
Optimized	68	CGTCCGCGGG CCTCAAAT ATGATG CTGATGAAACATTCA CCGCGTCTG GAAAACTG GCA
Original	68	CGCCACCTGCTTCCAACATGATGCTAATGAAACATTCTCCAAGACTGGAGAATT TGGCA
Optimized	128	GAA CGTTGGGCTCGT CGCTG CCGCGCGTGGGT CAGAAT CTGGCAGCATCGGGCGGTCTG
Original	128	GAAAGATGGGCTAGGCGATGCAGGGGTGTTGGACAGAATCTTGCCGCTTCTGGAGGGTTA
Optimized	188	GTG CCGACCGTTCGCT TGG CTGGCGAACATGTGGAAGCCGAAGTTAAATACTAC CGTAC
Original	188	GTTCCAACAGTTAGGTGGCTAGCGAATATGTGGAAGGCAGAAGTGAAATATTACACTTAC
Optimized	248	AGCAACAAC TCTTG CATT CCGTTTAAAGTTTGTGGCCACTACACC CAGATGGTCTGG GCA
Original	248	TCCAACAAC TCTGCATTCTTTT AAGTCTGCGGACATTACACGAGATGGTTTGGGCC
Optimized	308	GATAGTACGGA ACTGGGTTGCGCTATCA ACCGT TGTGACTCCATGCTGCCGGCAT GGCGT
Original	308	GACTCAACTGA ACTCGGCTGTGCAATCAATCGTTGCGACAGCATGCTTCCAGCTTGGCGT
Optimized	368	CCGCGGTCTAT TACCTGGTG TGT CAATATTCTCCGGCCGGCAATTTCA TTGGT CGTAAA
Original	368	CCACCAAGTATATTATTTGGTTTGTCACTACTCTCTGCGGGCAATTTCA TAGGGCGTAAG
Optimized	428	CCGTAC ACCGAAGGCGGTTCCTGTACGAAATGTCCGACG GGTTACGACTGC ACG CACAAT
Original	428	CCCTACACTGAAGGAGGATCCTGCACCAAATGCCCACTGGTTACGACTGC ACTCACAAT
Optimized	488	CAAT TGTTGGAGCCGC
Original	488	CAATGCTGGAGCAGA

Figura 14. Alineamiento de las secuencias de EgVAL1 original y optimizada. Las letras en rojo indican las bases cambiadas en la secuencia optimizada con respecto a la original.

4.2.3 Clonado

La región codificante de EgVAL1 optimizada e insertada en el plásmido pUC57 se utilizó para transformar células DH5 α , según el protocolo de transformación de células competentes. La cepa de *E. coli* DH5 α es recomendada por su eficiencia en el subclonado y propagación de plásmidos. Se plaquearon las células transformadas y se eligieron 4 colonias aisladas para realizar precultivos, los cuales se utilizaron para extraer el ADN plasmídico. Se realizó una doble digestión del plásmido pUC57-EgVAL1 con las enzimas de restricción *Bam* HI y *Hind* III. La figura 15 muestra el resultado de la doble digestión. Además, la presencia del inserto con la región codificante de EgVAL1 fue confirmada por PCR utilizando cebadores específicos: Fw 5'TCGGGCGGTCTGGTGCCGAC3' y Rev 5'TCTGCCCAGACCATCTGGGT3' (no se muestra).

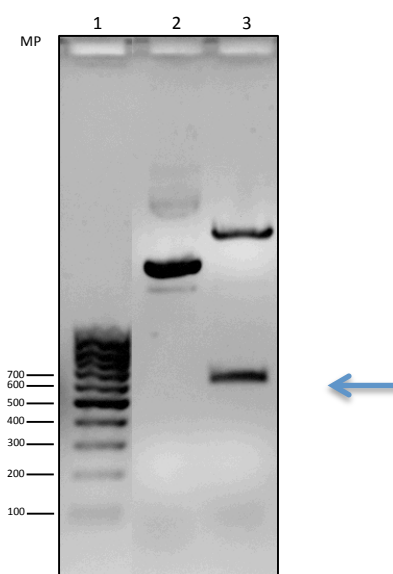


Figura 15. Doble Digestión de pUC57-EgVAL1. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Carril 1: marcador peso molecular (MP) MassRuler (Life Technologies) (3 μ l), carril 2: a) pUC57-EgVAL1 sin digerir, carril 3: pUC57-EgVAL1 digerido. La flecha indica el fragmento correspondiente a EgVAL1.

El fragmento correspondiente a la región codificante de EgVAL1 digerida con las enzimas de restricción *Bam* HI y *Hind* III fue aislado a partir del gel de agarosa mediante kit comercial (Bioline), obteniéndose una concentración de 6,5 ng/ μ l.

Posteriormente, se digirió el plásmido pQE-TriSystem con las mismas enzimas de restricción, obteniéndose una concentración de 13 ng/ μ l, para ligar la región codificante de EgVAL1. El

producto de ligación se empleó para transformar la cepa M15pREP4 de *E. coli*. Se eligieron algunas colonias para extraer el ADN plasmídico y se confirmó, mediante secuenciación, la presencia del inserto en el vector elegido.

4.2.4 Estudios de expresión de EgVAL1 optimizada

Uno de los objetivos de la optimización de la secuencia de ADNc de EgVAL1 era poder expresar a la proteína de forma soluble. Una vez clonada la región codificante optimizada en el vector pQE-TriSystem, se transformaron cepas de *E. Coli* M15 pRep4. El vector pQE-TriSystem permite la expresión de proteínas en varios sistemas de expresión tanto eucariotas como procariotas. Este plásmido contiene el promotor del fago T5 que es reconocido por la ARN polimerasa de *E. coli*, permitiendo la expresión eficiente de las proteínas recombinantes, y dos secuencias del operador *lac* que incrementan la unión del represor *lac* y garantizan la represión del promotor de T5. La expresión de proteínas codificadas en los vectores pQE se induce por el agregado de IPTG que inactiva la represor *lac*. Además contiene un trecho de 8 histidinas en el extremo C-terminal. Este tipo de vector puede ser mantenido en la cepa de *E. Coli* M15 pRep4. Esta cepa está optimizada para la expresión de proteínas que puedan resultar tóxicas para la cepa y recomendada para lograr altos niveles de expresión. Contiene el plásmido pRep4 que codifica para el represor *lac*, asegurándose una expresión altamente regulada. El pRep4 se mantiene mediante selección por resistencia al antibiótico kanamicina.

Luego de la transformación, realizamos el estudio de las fracciones soluble e insoluble de la expresión de EgVAL1 en 50 ml de medio de cultivo LB, durante 4 horas a 37°C (Figura 16).

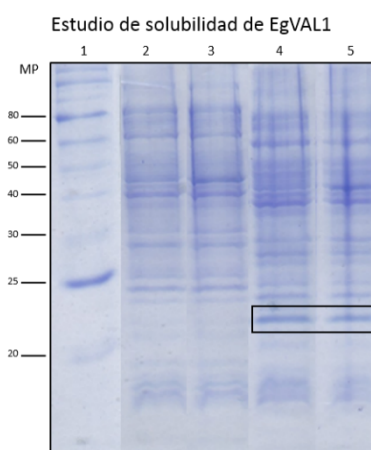


Figura 16. Estudio de solubilidad de EgVAL1 optimizada. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%. Carril 1: marcador de peso molecular (BioLabs) (12 µl), carril 2: fracción soluble no inducida (20

μl), carril 3: fracción insoluble no inducida (20 μl), carril 4: fracción soluble inducida (12 μl), carril 5: fracción insoluble inducida (7 μl). El recuadro indica a la proteína EgVAL1.

El estudio de solubilidad indicó que la proteína estaba presente tanto en la fracción soluble como en la insoluble. A continuación, realizamos la purificación de EgVAL1 en la fracción soluble mediante cromatografía de afinidad en pasos, a concentraciones crecientes de imidazol (20, 100, 200, 300 y 500 mM). Se seleccionaron fracciones seriadas, las cuales fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%, en condiciones desnaturalizantes y visualizadas por tinción de Azul de Coomassie. No se detectó la presencia de la proteína (no se muestra).

Posteriormente se realizó la purificación de EgVAL1 en la fracción insoluble a 37°C durante 4 horas (Figura 17).

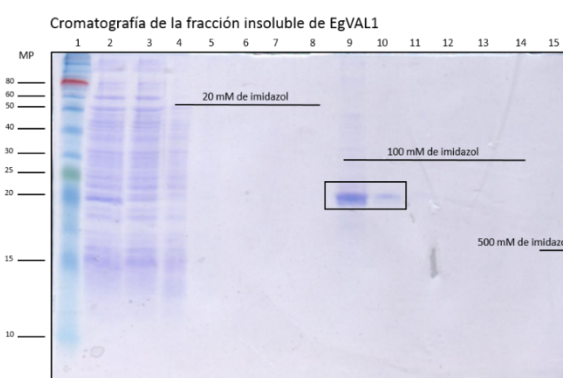


Figura 17. Cromatografía de afinidad de la fracción insoluble de EgVAL1. Electroforetogramas (SDS-PAGE 15%) de las muestras seleccionadas. Carril 1: marcador de peso molecular (BioLabs) (10 μl), carril 2: muestra inducida (11.25 μl), carril 3: percolado (11.25 μl), carriles 4 al 15: volúmenes de elución 3.6 ml, 5.4 ml, 9 ml, 16.2 ml, 27 ml, 32.4 ml, 36 ml, 39.6 ml, 43.2 ml, 50.4 ml, 55.8 ml, 61.2 ml. Se indica la concentración de imidazol de cada fracción. El recuadro indica a EgVAL1. Se cargó 15 μl de cada fracción menos en la fracción de 3.6 ml, donde se cargaron 7.5 μl y la fracción de 5.4 ml en donde se cargó 11,25 μl .

En conclusión, mediante la optimización de la secuencia de EgVAL1 no se logró producir la proteína de forma soluble, si bien en un principio se pensó que sí. Probablemente, una pequeña fracción de la proteína se expresó de forma soluble pero no de manera estable, por lo que no fue posible visualizarla una vez purificada. De todas maneras, aunque solubilizada en 8 M de urea, luego de la optimización de secuencia se obtuvo mayor cantidad de proteína.

A continuación, se estudió la expresión de la proteína a 30°C y 37°C y la purificación de la misma por gradiente de imidazol (de 20 a 150 mM), utilizando el equipo ÄKTAprime plus (GE Healthcare). Se eligieron algunas fracciones para su estudio las cuales fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%, en condiciones desnaturalizantes y visualizadas por tinción de Azul de Coomassie. (Figura 18).

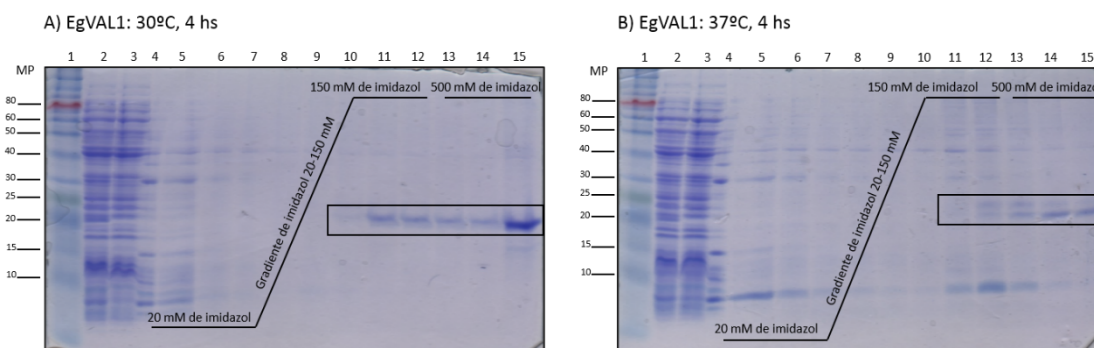


Figura 18. Cromatografías de afinidad de EgVAL1. Electroforetogramas (SDS-PAGE 15%) de las muestras seleccionadas. A) Expresión de EgVAL1 durante 4 hs a 30°C. Carril 1-15: marcador de peso molecular, muestra inducida, percolado, volúmenes de elución: 8.5 ml, 11.9 ml, 20.4 ml, 25.5 ml, 30.6 ml, 35.7 ml, 40.8 ml, 49.3 ml, 54.4 ml, 59.9 ml, 64.6 ml y 69.7 ml. B) Expresión de EgVAL1 durante 4 hs a 37°C. Carril 1-15: marcador de peso molecular, muestra inducida, percolado, volúmenes de elución: 6.8 ml, 15.3 ml, 20.4 ml, 25.5 ml, 28.9 ml, 34 ml, 39.1 ml, 42.5 ml, 45.9 ml, 51 ml, 59.5 ml y 68 ml. El recuadro indica a EgVAL2. Se indica el gradiente de imidazol. En todos los casos se cargó 10 µl de marcador de peso molecular (BioLabs), 2.25 µl carga, 4 µl de percolado y 15 µl de cada fracción.

Al igual que ocurrió con la proteína EgVAL2, se obtuvo un mayor nivel de expresión de EgVAL1 cuando esta se expresó durante 4 horas a 30°C. En los siguientes siguientes se eligieron los parámetros de 30°C y 4 hs de inducción. La cantidad de proteína obtenida por litro de cultivo fue 1 mg, calculada por densitometría, utilizando el software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

Una vez optimizados los parámetros de expresión de ambas proteínas, las mismas fueron liofilizadas para continuar con su encapsulación. La encapsulación se llevó a cabo en el “Laboratoire de parasitologie et mycologie medicale” de la universidad Claude Bernard Lyon 1, en Lyon, Francia. Por tal motivo, fue necesario liofilizarlas para llevarlas en condiciones adecuadas para su preservación. Previamente, se estudió el posible efecto que la liofilización pudiera tener sobre las proteínas, una vez que éstas fueran resuspendidas. Se realizó una

electroforesis en gel de poliacrilamida 15% en condiciones desnaturalizantes de las proteínas antes y después de ser liofilizadas. En la figura 19 se muestra el resultado de este ensayo. Como puede observarse en esta figura, el proceso de liofilización no afectó a ninguna de las proteínas.

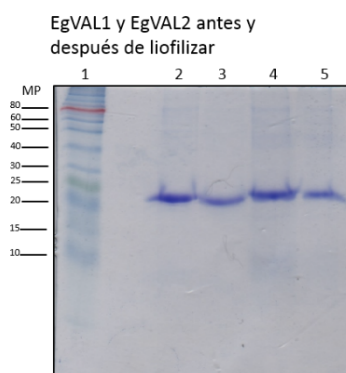


Figura 19. Estudio de los efectos de la liofilización sobre las EgVALs. Electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 15%. Carril 1: marcador de peso molecular (BioLabs), carril 2: EgVAL1 antes de liofilizar (22.5 μ l), carril 3: EgVAL1 luego de la liofilización (22.5 μ l), carril 4: EgVAL2 antes de liofilizar (22.5 μ l), carril 5: EgVAL2 luego de la liofilización (22.5 μ l), carril 6 al 8: 1, 3 y 5 μ g de lisozima.

4.3 Encapsulación de las EgVALs en nanopartículas poliméricas

Previo a la encapsulación de las EgVALs, se ensayaron varias condiciones de encapsulación mediante el método de nanoprecipitación y el método de doble emulsión con evaporación del solvente, usando la proteína sero albúmina bovina (BSA) y el biopolímero poli caprolatona (PCL). Si bien los diferentes polímeros pueden influir en el tamaño final de las nanopartículas, se utilizó PCL debido a que su costo es mucho menor al costo del polímero PLA, que fue el que se utilizó para la encapsulación de las EgVALs. Por otro lado, debido al bajo rendimiento en la producción de las EgVALs, decidimos usar BSA como proteína de prueba. Esto nos permitió estandarizar parámetros tales como concentración de polímero y tiempo de sonicación, que luego fueron usados para encapsular a las EgVALs con el polímero PLA.

4.3.1 Encapsulación de proteínas por el método de nanoprecipitación

Empleamos el método de nanoprecipitación que empleara Bilati y colaboradores (2005a, 2005b). Si bien este método fue ideado para compuestos hidrofóbicos, las modificaciones introducidas por los autores, tales como tipo de solvente, proporción solvente / no solvente y concentración de polímero, lograron encapsular proteínas en nanopartículas poliméricas (NPs) de 130-560 nm. A continuación se muestra un esquema del método de nanoprecipitación:

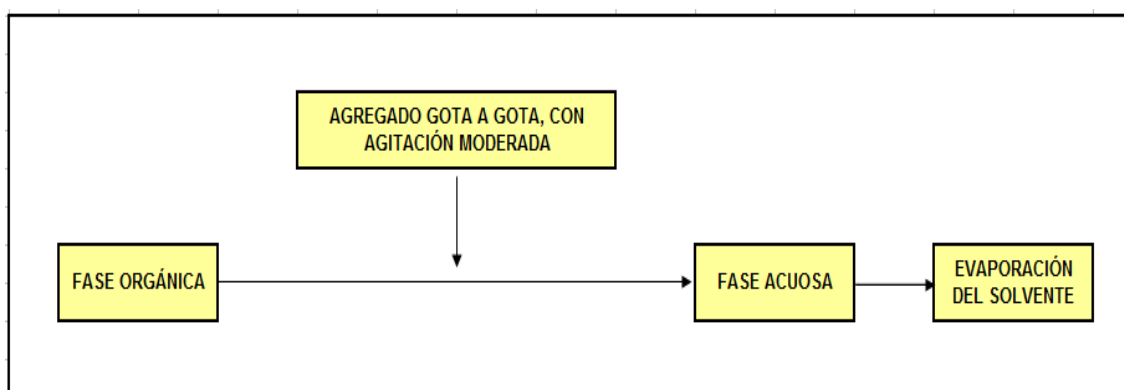


Figura 20. Esquema del método de nanoprecipitación para la formulación de NPs. La fase orgánica que contiene al polímero y al compuesto a encapsular es agregado gota a gota y con agitación a la fase acuosa que contiene al estabilizante. Por último, se evapora al solvente.

Se realizaron 3 ensayos de encapsulación por nanoprecipitación usando distintas concentraciones de PCL. En el tercer ensayo, se agregó BSA para evaluar la eficiencia de encapsulación.

Ensayo 1: se utilizó una solución de PCL (200 mg) disuelto en acetona a una concentración final de 0,8 % m/v (fase orgánica) y una solución de Tween 80 al 0,1 % (fase acuosa). Se obtuvieron NPs de un tamaño promedio de 244 nm (Figura 21A).

Ensayo 2: se utilizó una solución de PCL (100 mg) disuelto en acetona a una concentración final de 0,4 % m/v (fase orgánica) y una solución de Tween 80 al 0,1 % (fase acuosa). Se obtuvieron NPs de un tamaño promedio de 193 nm (Figura 21B).

Ensayo 3: se utilizó una solución de PCL (50 mg) disuelto en acetona a una concentración final de 0,2 % m/v (fase orgánica) a la cual se le agregó 5 mg de BSA disuelta en acetona y una solución de Tween 80 al 0,1 % (fase acuosa). Se obtuvieron NPs de un tamaño promedio de 4983 nm (Figura 21C).

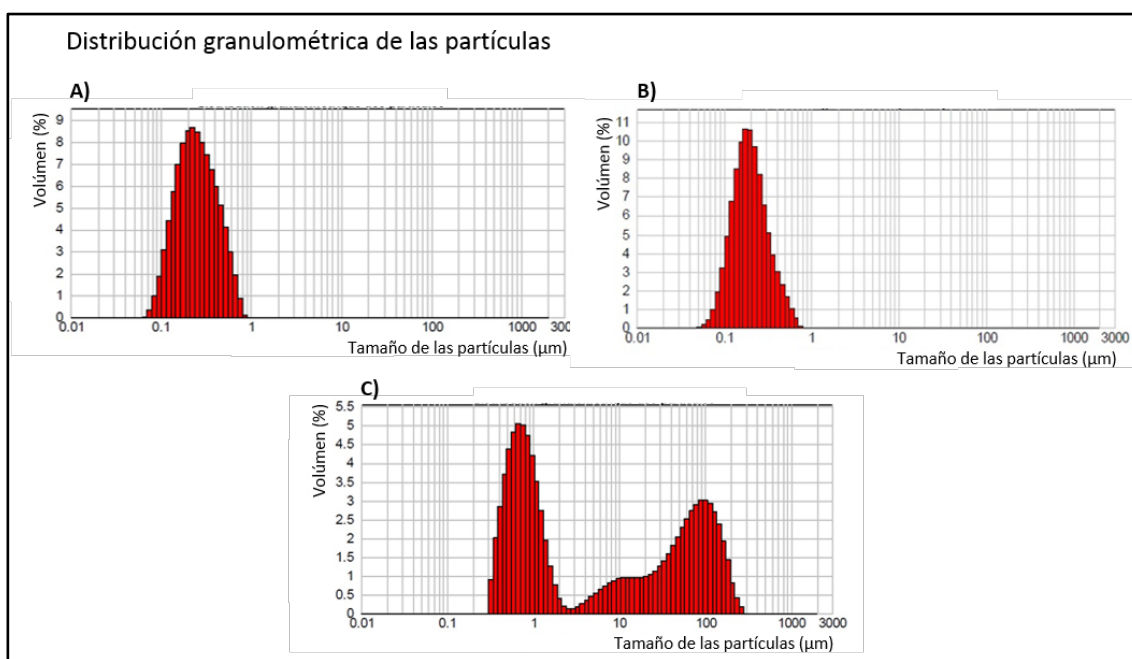


Figura 21. Distribución granulométrica de las partículas. La medida de la distribución granulométrica se realizó mediante difracción laser, utilizando el equipo Mastersizer 2000 (Malvern). A) Ensayo 1, B) Ensayo 2, C) Ensayo 3.

Los valores más importantes que hay que tener en cuenta al momento de evaluar las NPs obtenidas son el tamaño y el índice de polidispersión (PI). El tamaño se obtiene mediante la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS). La DLS mide el movimiento browniano y lo relaciona con el tamaño de las partículas; se iluminan a las partículas con un laser y se analiza la intensidad de las fluctuaciones de la luz dispersada. El PI es un parámetro obtenido de manera simultánea con el tamaño de partícula. Los valores cercanos a 0 indican que la

muestra es monodispersa y valores cercanos a la unidad indican que la muestra es polidispersa, es decir, presenta gran variedad de tamaños. En los tres ensayos realizados esperábamos obtener partículas con un tamaño de aproximadamente 200 nm y un PI con un valor menor a 0,3.

En los dos primeros ensayos, se logró obtener NPs de una tamaño de 193 y 244 nm. En este caso, la cantidad de polímero agregada influyó en el tamaño de las NPs obtenidas, si bien en ambos ensayos se obtuvieron NPs del tamaño deseado. Sin embargo, como se observa en la figura 21 C, no fue posible obtener NPs cuando se agregó proteína a la formulación (ensayo 3). Además, la población de partículas obtenidas no fue homogénea, visualizándose dos poblaciones de diferente tamaño en el gráfico de distribución granulométrica (muestra polidispersa). Esto se puede deber a que la BSA precipitó en presencia de la acetona, interfiriendo con la encapsulación y el tamaño de las partículas obtenidas. Se filtró la solución de partículas con un filtro de 0.45 μm para deshacernos de los precipitados y se volvió a medir el tamaño, comprobándose nuevamente que no se obtuvieron NPs del tamaño deseado mediante estos parámetros de formulación.

A continuación, ensayamos la formulación de NPs por el método de doble emulsión con evaporación del solvente.

4.3.2 Método de doble emulsión con evaporación del solvente

Mediante este método, es posible encapsular compuestos hidrofílicos como lo son las proteínas. Tiene la ventaja de que las mismas pueden ser disueltas en la fase acuosa y no en la orgánica como ocurre en el método de nanoprecipitación. Sin embargo, las etapas de sonicación y la exposición de la proteína a la interfase orgánica / acuosa pueden afectar su estabilidad (Bilati *et al.*, 2005b). A continuación, se muestra un esquema del método de doble emulsión con evaporación del solvente:

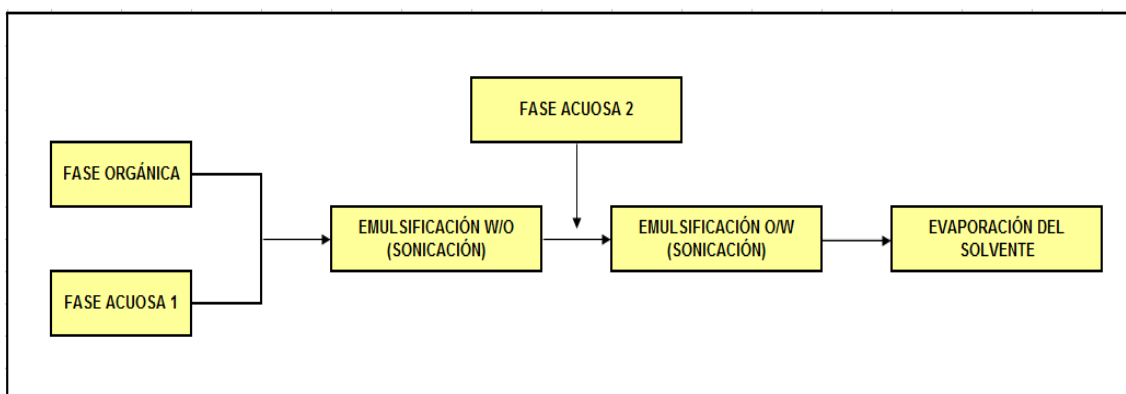


Figura 22: Esquema del método de doble emulsión con evaporación del solvente para la formulación de NPs. Se realiza la primera emulsión mediante sonicación de la fase acuosa y que contiene a la proteína con la fase orgánica que contiene al polímero. Posteriormente, sónica la fase acuosa 2 que contiene al estabilizador y la primera emulsión, logrando así la segunda emulsión. Por último, se evapora el solvente.

Se ensayaron diversas condiciones de encapsulación mediante el método de doble emulsión con evaporación del solvente las cuales se resumen en la tabla 2.

Ensayo	BSA	PCL en etil acetato	PVA	Tiempo de sonicado	Evaporación del solvente	Tamaño de partículas obtenidas	Índice de polidispersión	Comentarios
1	2 ml de BSA (10 mg/ml)	20 ml de PCL (200 mg/ml)	40 ml al 2%	2 minutos a 25° de amplitud	Por rotaevaporación	233,8 nm	0,517	
2	2 ml de BSA (10 mg/ml)	20 ml de PCL (100 mg/ml)	40 ml al 2%	2 minutos a 25° de amplitud	Por rotaevaporación	151,36 nm	0,074	
3	2 ml de BSA (10 mg/ml)	20 ml de PCL (50 mg/ml)	40 ml al 2%	2 minutos a 25° de amplitud	Por rotaevaporación	165,2 nm	0,317	
4	Sin BSA	20 ml de PCL (50 mg/ml)	40 ml al 2%	2 minutos a 25° de amplitud	Por rotaevaporación	164,8 nm	0,074	Control
5	4 ml de BSA (10 mg/ml)	40 ml de PCL (50 mg/ml)	40 ml al 2%	2 minutos a 25° de amplitud	Se dividió la formulación en 3 alícuotas: 1- evaporación overnight, 2- evaporación por dilución 1/10 y rotaevaporación, 3- rotaevaporación	1- 414,4 nm; 2- 150,96 nm; 3- 203,8 nm	1- 0,408; 2- 0,075; 3- 0,401	Se evalúa la estabilidad de 20 ml de la primera emulsión. No es estable debido a que no tiene PVA. El resto se utilizó para la segunda emulsión.
6	Sin BSA	20 ml de PCL (200 mg/ml)	40 ml al 2%	2 minutos a 25° de amplitud	Por rotaevaporación	332,2 nm	0,455	Control
7	2 ml de BSA (100 mg/ml)	20 ml de PCL (50 mg/ml)	40 ml al 2%	2 minutos a 25° de amplitud	Se dividió la formulación en 2 alícuotas: 1- rotaevaporación, 2- dilución 1/10 y rotaevaporación	1- 179,9 nm; 2- 174 nm	1- 0,122; 2- 0,102	

Tabla 2. Resultados de los ensayos de encapsulación por el método de doble emulsión con evaporación del solvente.

En el ensayo 5, se evaluó la estabilidad de la primera emulsión al no realizar la segunda emulsión con la solución de PVA al 2%. El resultado indicó que la primera emulsión no es estable por lo que es necesario agregar PVA como estabilizador. Éste paso se debe realizar inmediatamente después de haber realizado la primera emulsión.

Se ensayaron formulaciones con distintas concentraciones de polímero para evaluar el efecto que este tiene en el tamaño y en el PI de las NPs. Como se desprende de los resultados, se obtienen NPs de menor tamaño y menor PI cuando se usa menos cantidad de polímero (ensayos 3, 5 y 7). En el ensayo 1 y 6, en donde se usó 200 mg / ml, si bien se obtuvieron NPs del tamaño deseado, el PI está por encima de 0,3 lo que indica que la muestra es polidispersa. Por otro lado, si comparamos el ensayo 4, el ensayo 5, al evaporar el solvente por dilución y posterior rotaevaporación y solo por rotaevaporación, y el ensayo 7, vemos que el agregado y la cantidad de BSA no modificó el tamaño de las NPs obtenidas. Sin embargo, el método de evaporación del solvente en el ensayo 5 influyó en el valor de PI, indicando que se obtienen NPs más polidispersas cuando el solvente se evaporó durante toda la noche o por rotaevaporación sin la dilución previa. Este último resultado no se condice con las nanopartículas que se obtuvieron en los demás ensayos en donde el solvente se evaporo por rotaevaporación.

En el ensayo 7 también se evaluó la evaporación del solvente por dilución y luego rotaevaporación y por rotaevaporación, concluyendo que no hay diferencia en el tamaño y PI de las NPs obtenidas.

En la figura 23 se muestran las medidas del tamaño de las partículas obtenidas. El tamaño se midió con el equipo Zetasizer, el cual es más específico para la medida de NPs que el equipo Mastersizer utilizado para medir el tamaño de las partículas obtenidas por nanoprecipitación.

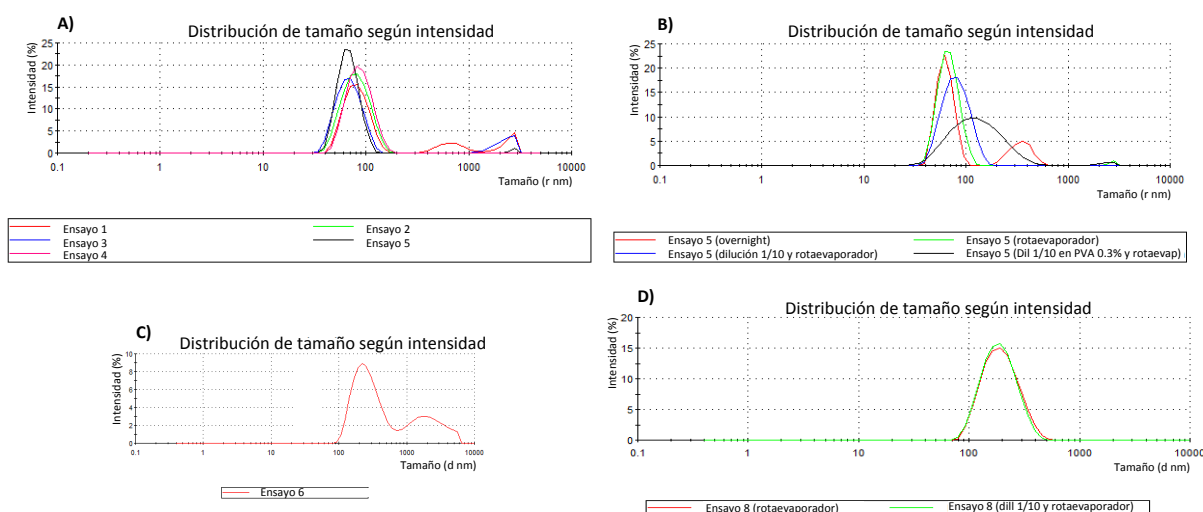


Figura 23. Distribución del tamaño de las NPs formuladas por el método doble emulsión con evaporación del solvente. A) Distribución de tamaño de las NPs formuladas en los ensayos 1, 2, 3, 4 y 5. B) Distribución de tamaño de las NPs formuladas en el ensayo 5 según los distintos métodos de evaporación del solvente. C)

Distribución de tamaño de las NPs formuladas en el ensayo 6. D) Distribución de tamaño de las NPs formulada en el ensayo 7 según los distintos métodos de evaporación del solvente.

El ensayo 7 se realizó por triplicado, obteniéndose en todos los ensayos NPs de un tamaño entre 164 y 179 nm y un PI menor a 0,3.

Debido a estos resultados, se decidió utilizar la siguiente formulación para las NPs con las EgVALs encapsuladas:

- 1 volumen de la solución con la proteína (concentración variable)
- 10 volúmenes de la solución de PVA al 2% (20 mg/ml)
- 20 volúmenes de la solución del polímero al 5% (50 mg/ml)

El tiempo y amplitud de sonicación para lograr cada emulsión es de 2 minutos y 25°.

4.3.3 Eficiencia de encapsulación

Se intentó calcular la eficiencia de encapsulación de BSA en las NPs de PCL mediante el método de Bradford (SIGMA). Brevemente, se tomó una alícuota de cada formulación y se centrifugaron para separar las NPs de la fase acuosa. Las NPs fueron disueltas con el solvente orgánico y se agregó a cada fracción el reactivo de Bradford. Se midió la absorbancia a 595 nm. No fue posible obtener resultados coherentes, probablemente por la presencia del solvente orgánico utilizado para disolver el polímero y liberar a la proteína encapsulada, el cual interfiere con el reactivo.

El Dr. Uruguaysito Benavides, puso a punto el cálculo de la eficiencia de encapsulación mediante análisis de geles de acrilamida obtenidos por electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Brevemente, se tomaron alícuotas de cada formulación y se centrifugaron para separar a las NPs (pellet) de la fase acuosa (sobrenadante). Posteriormente, las NPs fueron incubadas en el solvente orgánico para disolver el polímero y liberar a la proteína encapsulada. Las dos fracciones fueron analizadas por electroforesis, resultando en una alta eficiencia debido a que la proteína se encontraba en el pellet y no se evidencio la presencia de la misma en el sobrenadante (datos no publicados).

4.3.4 Encapsulación de EgVAL1 y EgVAL2 en nanopartículas de PLA por el método de doble emulsión con evaporación del solvente

Se encapsularon las proteínas EgVAL1 y EgVAL2 utilizando el polímero PLA.

Se formularon 20 ml de nanopartículas con EgVAL1 (NPs-EgVAL1) (10 ml de PLA al 5% disuelto en etil acetato, 20 ml de PVA al 2% disuelto en agua destilada y 1 ml de proteína a una concentración de 1 mg/ml) y 10 ml de nanopartículas con EgVAL2 (NPs-EgVAL2) (5 ml de PLA al 5% disuelto en etil acetato, 10 ml de PVA al 2% disuelto en agua destilada y 500 μ l de proteína a una concentración de 1 mg/ml). El tamaño de las NPs-EgVAL1 fue de 165,8 nm y el de las NPs-EgVAL2 fue de 153 nm. Por otro lado, el PI de las NPs-EgVAL1 fue de 0,086 y el de las NPs-EgVAL2 fue de 0,086. Este resultado es el esperado debido a que el tamaño óptimo que tienen que tener las nanopartículas para ser captadas por las células M del intestino debe ser menor a 1 μ m (des Rieux *et al* 2005, Awaad *et al* 2012).

4.3.5 Determinación del potencial zeta.

El potencial zeta (PZ) es la medida de la magnitud de la repulsión o atracción entre las partículas. Se determinó el valor del PZ de las NPs, el cual está directamente relacionado con la densidad de carga superficial. La medida se realizó usando la celda de flujo acuoso con el equipo Zetasizer. El PZ de las NPs-EgVAL1 fue de -1,16 mV y de las NPs-EgVAL2 -1,2 mV.

Si bien el tamaño de las NPs era el esperado, este valor de PZ podría indicar que las NPs no son estables. Cuando las partículas tienen un valor de PZ muy bajo, no hay fuerzas electrostáticas que prevengan la floculación de las mismas. Se considera que las NPs son estables cuando el valor del PZ está por debajo de -30 mV o por encima de 30 mV (manual del Zetasizer Nanoseries).

4.3.6 Eficiencia de encapsulación de las EgVALs

Se evaluó la eficiencia de encapsulación de las NPs mediante análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida al 15 % en condiciones desnaturizantes (Figura 24).

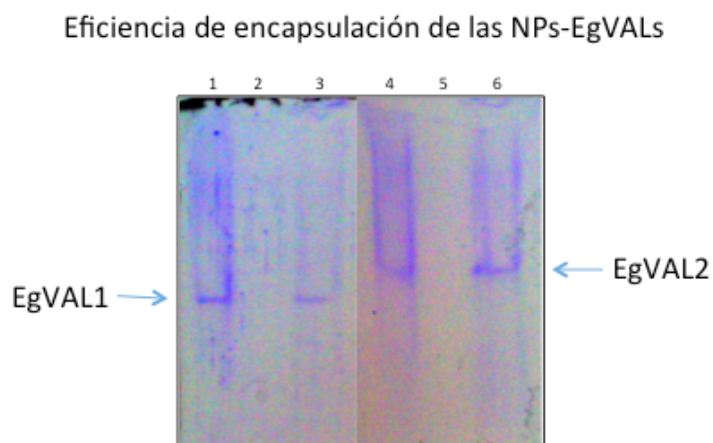


Figura 24. Eficiencia de encapsulación de las EgVALs. Electroforesis en gel de poliacrilamida 15 % en condiciones desnaturalizantes. Carril 1: NPs-EgVAL1 total; carril 2: NPs-EgVAL1 sobrenadante; carril 3: NPs-EgVAL1 pellet; carril 4: NPs-EgVAL2 total; carril 5: NPs-EgVAL2 sobrenadante, carril 6: NPs-EgVAL2 pellet. Las flechas indican a EgVAL1 y EgVAL2.

Mediante éste análisis se determinó que las proteínas estaban presentes en las fracciones totales (NPs totales) y en las fracciones donde solo se encontraban las NPs sin la fase acuosa (NPs pellet). Por otro lado, no se visualiza la presencia de las proteínas sin encapsular (NPs sobrenadante). Este resultado indica que la mayor parte de las proteínas fue encapsulada. No podemos afirmar que toda la proteína fue encapsulada debido a la sensibilidad del método.

Si bien el cálculo de eficiencia no es exacto, con estos resultados podemos decir que la eficiencia de encapsulación es muy alta ya que no se ve proteína sin encapsular en ninguna de las dos formulaciones de NPs.

Hasta aquí podemos concluir que el método de doble emulsión con evaporación del solvente es un método adecuado para encapsular a las proteínas EgVALs en nanopartículas de PLA. El tamaño, el PI, el PZ y el cálculo de eficiencia de encapsulación indican que hemos obtenido las partículas deseadas para continuar con los ensayos de recubrimiento con Chitosán y con los estudios de estabilidad de las NPs.

4.3.7 Recubrimiento de las nanopartículas con Chitosán.

Debido a sus propiedades hidrofílicas, el Chitosán (CH) ha sido elegido para recubrir nanopartículas. Es un polisacárido catiónico, ampliamente utilizado como un potenciador seguro y eficiente de la absorción intestinal de macromoléculas terapéuticas, debido a su capacidad mucoadhesiva (Mei-Chin *et al* 2013). Por este motivo, se realizó el recubrimiento con CH de las NPs-EgVALs.

El tamaño de las NPs-EgVAL1 recubiertas con CH (NPs-EgVAL1-CH) fue de 258,5 nm y el PI de 0,3, mientras que el tamaño de las NPs-EgVAL2-CH fue de 175 nm y el PI de 0,3. El valor de potencial zeta para las NP-EgVAL1-CH resultó ser 34,6 mV y para las NP-EgVAL2-CH 33,9 mV.

Es de notar que el tamaño de las NPs se modificó debido al recubrimiento con CH. Sin embargo, este tamaño sigue siendo óptimo para que puedan ser captadas por las células M del intestino. Por otro lado, se modificó el valor del potencial zeta, pasando de tener un valor negativo, casi cercano a cero, a tener un valor positivo dado por la carga de la cubierta de CH. Estos valores indican que el recubrimiento de las NPs-EgVALs fue exitoso y que además, la cubierta de CH las estabiliza.

En el caso de las NPs-EgVALs, el PI se modificó debido al agregado de chitosan, llegando al límite de valor aceptado para considerar la muestra como monodispersa.

En conclusión, no solo se logró el recubrimiento de las NPs con CH, que permite una mejor adherencia a la mucosa intestinal, si no que se aumentó la estabilidad de las NPs.

4.3.8 Estudio de la estabilidad de las NPs en jugo gástrico e intestinal artificial:

Para evaluar si las NPs podían proteger a las proteínas hasta llegar a las células intestinales, se incubaron en fluidos biológicos sintéticos para imitar el pasaje de las mismas por el sistema gastrointestinal. Las muestras sometidas a estos fluidos fueron analizadas mediante la técnica de Western blot, utilizando los anticuerpos producidos en ratón contra EgVAL1 y contra EgVAL2 (Figura 25). Brevemente, luego de la incubación con los fluidos biológicos, las NPs fueron disueltas con el solvente orgánico para liberar a las proteínas encapsuladas. Se centrifugó la muestra y la fracción en donde se encuentran las proteínas, fue analizada.



Figura 25. Estabilidad de las NPs tratadas con FASSGF (“Fasted State Simulated Gastric Fluids”) y FASSIF (“Fasted State Simulated Intestinal Fluids”). Western Blot sobre membrana de nitrocelulosa (Amersham). Carril 2: NPs-EgVAL1-CH; Carril 3: NPs-EgVAL2-CH.

A partir de los resultados obtenidos, vemos que las NPs recubiertas con quitosán protegieron a los antígenos durante la incubación con los fluidos gastrointestinales sintéticos. Es importante destacar que mediante la formulación final de las NPs-EgVALs se logra el objetivo principal de la encapsulación, proteger a los antígenos.

Este resultado es promisorio debido a que en un modelo *in vivo*, los antígenos encapsulados en NPs recubiertas con Chitosán serían protegidos hasta la llegada al intestino en donde serán internalizados por las células M gracias a su tamaño y a las propiedades mucoadhesivas del quitosán.

4.3.9 Estudio de estabilidad de las NPs durante el almacenamiento

Las NPs-EgVALs fueron formuladas en setiembre de 2014 en el Laboratoire de parasitologie et mycologie medicale de la Université Claude Bernard Lyon 1, en Lyon, Francia. Hasta julio de 2015, las mismas fueron almacenadas a 4°C en solución. Para evaluar su estabilidad durante este tiempo, se volvió a medir el tamaño y PI en el laboratorio de biomateriales de la Facultad de Ciencias, utilizando el equipo Zeta Plus (BrookHaven). La tabla 3 muestra los resultados obtenidos.

	Tamaño (nm)	Índice de polidispersión
NPs-EgVAL1	182,3	0,034
NPs-EgVAL2	146,84	0,042
NPs-EgVAL1-CH	493,18	0,573
NPs-EgVAL2-CH	368,02	0,597

Tabla 3. Medida del tamaño y del índice de polidispersión de las NPs-EgVALs y NPs-EgVALs-CH

A partir de estos resultados podemos concluir que las NPs-EgVALs resultaron estables durante el almacenamiento en las condiciones nombradas anteriormente, a pesar de que el valor del PZ indicaba que las mismas no lo eran. Estos datos resultan alentadores para el almacenamiento de las nanovacunas que se pretenden desarrollar a partir de estos estudios.

Por otro lado, no sucede lo mismo con las NPs-EgVALs-CH. Durante su almacenamiento, el tamaño de las NPs y más importante aún, el PI, aumentaron significativamente hasta valores que no son los recomendados para el uso de las mismas como nanovacunas orales. El tamaño de las NPs influye en la internalización de las mismas por parte de las células del intestino.

El aumento de tamaño y del PI puede deberse a que la cubierta de chitosan en solución no se mantuvo estable, provocando la precipitación de la misma. Este resultado no se condice con el valor del PZ que se había medido para estas NPs, el cual indicaba que la adición de chitosan las estabilizaba.

Se necesitarán más estudios de estabilidad para poner a punto el almacenamiento de las formulaciones final de NPs, si las mismas son utilizadas como nanovacunas.

5. DISCUSIÓN

Este trabajo se llevó a cabo en el marco del proyecto PARAVAC financiado por la Unión Europea. PARAVAC es un consorcio mundial formado por universidades y otras organizaciones, con el fin de producir vacunas contra distintos parásitos que causan gran impacto sobre la salud y el bienestar de los seres humanos y el ganado, además de grandes pérdidas económicas (<http://paravac.eu/>). Uno de los objetivos como participantes de este proyecto fue caracterizar, expresar y encapsular proteínas de *E. granulosus* para su posterior uso en el desarrollo de una nanovacuna. Hemos tomado para esta tesis, dos de las proteínas incluídas en el proyecto para profundizar en su caracterización. Se trata de dos proteínas identificadas en *Echinococcus granulosus* como potenciales candidatos vacunales, de las que muy poco sabemos y nombramos EgVAL1 y EgVAL2.

Ubicar una proteína dentro de una superfamilia de proteínas es un buen comienzo para iniciar su caracterización. La clasificación de nuevas proteínas dentro de una familia permite inferir posibles funciones y hace más fácil la comunicación científica. Se han desarrollado bases de datos donde se clasifican las proteínas ya sea en base a su estructura, como a su secuencia. Dentro de una familia de proteínas, la mayoría de sus miembros tienen similitudes estructurales entre ellos y en algunos casos comparten un origen evolutivo común. Para clasificar las proteínas de nuestro interés, nos hemos basado en su secuencia ya que las bases estructurales emplean datos de estructuras resueltas ya sea por cristalografía o resonancia magnética nuclear. Hemos realizado análisis de homología de secuencia que nos permitió clasificarlas dentro de la superfamilia CAP, también conocida como SCP/TAPs (Gibbs *et al.*, 2008). Esta superfamilia de proteínas incluye varias familias con funciones muy variadas o no totalmente conocidas, que tienen en común una serie de motivos lineales llamados motivos CAP1-4.

En 2008, Gibbs y colaboradores revisaron las secuencias de las proteínas CAP de mamíferos y añadieron dos motivos a los definidos anteriormente en la base de datos PROSITE (<http://www.expasy.ch/prosite/>). Estos motivos están presentes en las EgVALs pero con diferente grado de conservación. Los motivos CAP 1, 2 y 4 están presentes en la secuencia de la proteína EgVAL1, mientras que en la secuencia de EgVAL2 solo están presentes el CAP 1 y 4. Los motivos CAP3 en EgVAL1 y CAP 2 y 3 en EgVAL2 no están completamente conservados. Por otro lado, la región bisagra (extensión corta que contiene 4 cisteínas) y el

dipéptido PY (cercano al CAP 2), elementos también conservados de la superfamilia CAP, están presentes en ambas proteínas. Consideramos que el hecho de que algunos motivos CAP no se encuentren totalmente conservados, no significa que las EgVALs no pertenezcan a esta superfamilia. El análisis reportado por Gibbs y colaboradores fue realizado considerando proteínas de mamíferos, por lo que no es de extrañar que las secuencias de las proteínas de invertebrados presenten diferencias con las primeras. El hecho de no presentar todos los motivos CAPs totalmente conservados también se vio en la proteína SmVAL4 del trematodo *Schistosoma mansoni*, que tiene 9 de los 12 residuos conservados en el CAP2 y dos de los tres residuos conservados en el motivo CAP3 (Kelleher *et al.*, 2014). Por otro lado, el análisis de las secuencias de proteínas CAPs de cestodos, indicó que los motivos CAPs están presentes con un alto grado de conservación, aunque presentan diferencias con respecto a los reportados por el sitio PROSITE y por Gibbs y colaboradores (2008). Sin embargo, al igual que ocurre con las proteínas EgVALs, no podemos decir que estas proteínas no pertenecen a la superfamilia CAP. Actualmente una gran cantidad de secuencias de invertebrados están ahora disponibles a partir de los Proyectos Genoma, lo que hace necesaria una revisión de las secuencias consenso que definen a los motivos CAP que fueron descritos con anterioridad.

Se emplearon las secuencias de estas proteínas para compararlas y clasificarlas dentro de una familia de proteínas CAPs. La reconstrucción filogenética realizada indica que las proteínas EgVAL1 y EgVAL2 están más relacionadas con las subfamilias R3HDML, PI15 y CRISPLD1-2 que con las restantes familias. Los miembros de estas subfamilias tienen los cuatro dominios CAP, el dipéptido PY, la región bisagra (Cx2Cx7Cx4C) y los motivos específicos LCCL presentes en la familia CRISPLD1-2, RxxxH en la familia R3H y un corto tramo de 12 residuos a continuación de la región de bisagra en el caso de la familia PI15. Ninguno de los motivos específicos de los miembros de estas familias coincide completamente con nuestras proteínas.

Al momento, existe poca información disponible acerca de la estructura 3D de los miembros de las distintas subfamilias pertenecientes a la superfamilia CAP. La mayoría de las estructuras resueltas son de venenos y toxinas de plantas. Los venenos pertenecen a la familia de proteínas CRISPs mientras que las toxinas de plantas pertenecen a la familia PR-1. El modelado por homología de EgVAL1 y EgVAL2, muestra la estructura típica de la superfamilia. Al presente se han reportado trece estructuras de miembros de esta superfamilia, todas ellas presentan un dominio conservado que consiste en un sándwich α - β - α y algunas

además, presentan un dominio adicional en el extremo C-terminal. Este dominio adicional, está compuesto por dos subdominios (subdominios N-terminal y C-terminal), con cinco puentes disulfuro bien conservados y esta presente en miembros de la subfamilia CRISP de mamíferos y de venenos de serpientes (Shikamoto *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2008). Se cree que podría participar en el bloqueo de los canales iónicos ya que poseen una estructura similar a toxinas de anémonas de mar Shk y BgK (Tudor *et al.*, 1996; y Dauplais *et al.*, 1997). Estas toxinas se caracterizan por tener un plegamiento muy conservado formado por tres cortas hélices alfa estabilizadas por tres puentes disulfuro. Las estructuras que se conocen, tanto de helmintos como de las proteínas relacionadas con patógenos, presentan el dominio sandwich α - β - α y solo las CAPs de nematodos y EgVAL1 y 2 tienen el subdominio N-terminal. Al momento no se ha reportado ninguna función para este subdominio. El modelo de las proteínas EgVALs obtenido luego de una dinámica de cinco picosegundos posee una extensión más allá del subdominio N-terminal con un plegamiento muy similar al de los inhibidores de canales iónicos. En nuestro modelo no aparecen los puentes disulfuros característicos pero no por ello descartamos que pueda cumplir una función de este tipo. Esta extensión no está presente en el modelo de EgVAL1 por lo que descartamos esta función.

En la proteína P14a, toxina en la planta del tomate, fueron identificados por primera vez residuos accesibles al solvente (His48 y His93) que podrían ser parte importante de un sitio activo (Fernández *et al.*, 1997). A partir de este hallazgo, se sugirió que estos residuos, junto con dos glutaminas, todos próximos espacialmente, sin un rol estructural y situados en una hendidura de la proteína, podrían tener actividad enzimática (Szyperski *et al.*, 1998). Posteriormente, se encontró que estos residuos están conservados en los miembros de la superfamilia CAP y podrían estar involucrados en la unión de iones metálicos (Shikamoto *et al.*, 2005, Suzuki *et al.*, 2008). Además, pueden adoptar una conformación similar a la de las Zinc proteasas, aunque esta actividad sólo se pudo demostrar para la proteína CRISP Tex 31, presente en el molusco *Conus textile* (Milne *et al.*, 2003). El modelado por homología de las EgVALs mostró que EgVAL1 tienen los residuos His93 y Glu74 y EgVAL2 His53, Gln67, Glu89 y His106 que ocupan en un lugar similar en su estructura 3D al lugar que ocupan los residuos posiblemente involucrados en esta actividad enzimática en las estructuras resueltas.

Por otro lado, las proteínas de la familia PR-1 son altamente resistentes a la digestión por enzimas proteolíticas (Fernández *et al.*, 1997). Este hecho sugiere que algunos miembros de la superfamilia CAP, como por ejemplo, PI15, PI16, R3HDML, y las proteínas relacionadas con

la patogénesis de las plantas, podrían tener una función de inhibición de peptidasas (Yamakawa *et al.*, 1998). Por tal motivo, no se descarta la posibilidad de que la capacidad de unión de metal podría ser parte de una actividad inhibidora. La reconstrucción filogenética muestra que las EgVALs están relacionados con PI15 y R3HDML y en consecuencia, podrían tener esta actividad.

El paso limitante en la realización de este trabajo ha sido la expresión y purificación de las proteínas EgVAL1 y EgVAL2. Como se detalla en los antecedentes, el uso de los sistemas de expresión *P. pastoris* y *C. elegans* no fueron exitosos. Por otro lado, los resultados publicados en la tesis de maestría de la MSc. Alicia Costábile sugieren el uso de *E. coli* como sistema de expresión para proteínas de la superfamilia CAP de *Mesocostoides corti*, modelo cestodo utilizado debido a la cercanía filogenética con parásitos de importancia en la salud pública, como lo es *E. granulosus*. En su trabajo, Costábile ensayó el uso de 3 cepas de *E. coli* (BL21(DE3) CodonPlus, BL21(DE3) pLysS y SHuffle) para expresar la proteína McCRISP2, obteniéndola pura aunque en muy baja cantidad (Costábile 2014, tesis de Maestría).

Otros autores han expresado proteínas de la familia CAP de helmintos en cepas de *E. coli*: la región codificante de OvASP1 ligada en el vector pET28, fue expresada en la cepa BL21 (MacDonalds *et al.*, 2004) y las regiones codificantes de ASPs de *A. duodenale*, *A. caninum* y *N. americanus* ligadas en el vector pProEx-HT, fueron expresadas en la cepa DH5α (Sen *et al.*, 2000). Todas estas proteínas se obtuvieron en cuerpos de inclusión (agregados insolubles de proteína mal plegada). Este hecho también se observó en la producción de ASPs de *H. contortus* y de *A. caninum* (Hotez *et al.*, 2003).

Entre las ventajas que este microorganismo brinda como sistema de expresión se destacan: mayor velocidad específica de crecimiento que las levaduras y células de mamíferos, fácil manipulación genética, bajo costo asociado a medios de cultivo o equipamiento, existencia de gran variedad de vectores de expresión estables, y además es un microorganismo aprobado para su utilización como hospedero en la producción de biofármacos (García *et al.*, 2013).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se eligió como sistema de expresión dos cepas de *E. coli* y se ensayaron distintos parámetros para lograr la producción de EgVALs solubles y con buen rendimiento.

Las cepas de *E. coli* elegidas para la expresión de las EgVALs fueron BL21(DE3) pLysS y M15 pRep4, considerando que la baja expresión de las EgVALs podría deberse a que las proteínas resultan tóxicas para *E. coli*. Estas dos cepas están optimizadas para la expresión de proteínas que puedan resultar tóxicas. En estos casos, la expresión del gen tóxico en condiciones no inducidas trae como consecuencia la selección de las células que expresan los niveles más bajos del gen tóxico. En consecuencia, estas células son incapaces de expresar altos niveles del gen de interés, aún luego de la inducción con IPTG. Mediante distintos mecanismos, ambas cepas inhiben la expresión basal de la proteína, hasta la adición del inductor IPTG al medio de cultivo. Como dijimos anteriormente, si bien Costáble (2003) utilizó la cepa BL21(DE3) pLysS para intentar la expresión de proteínas CAPs de *M. Corti*, en este trabajo continuamos trabajando con esta cepa cambiando las condiciones de expresión. A pesar de lo antedicho, los niveles de expresión continuaron siendo bajos, especialmente en el caso de la proteína EgVAL1 que se obtuvo insoluble y su expresión fue casi nula.

En base a estos resultados, focalizamos nuestros esfuerzos en mejorar las características del gen de EgVAL1 para su expresión en *E. coli*. Entre las características del gen heterólogo que pueden influir en los niveles de expresión están el uso de determinados codones específicos en el gen que son poco usados en *E. coli* y la presencia de estructuras secundarias en el ARNm, que pueden afectar el inicio de la transcripción y la traducción (García *et al.*, 2013). Por estas razones, se optimizó la secuencia de EgVAL1 mediante el servicio de GeneScript, esperando obtener un aumento significativo en los niveles de expresión de la proteína, tal como se ha reportado para otras secuencias optimizadas (Burgess-Brown, 2008). Sin embargo, el resultado no fue el esperado y por tanto, no consideramos necesario optimizar la secuencia de EgVAL2.

Por otro lado, siguiendo las recomendaciones de GE Healthcare (GE Healthcare Life Sciences, Recombinant Proteins Purification) para mejorar la solubilidad de las proteínas, se realizó la inducción de la expresión a una temperatura menor que en los primeros ensayos (30°C) y se evaluaron dos períodos de inducción con IPTG (2 y 4 hs). Se obtuvo mayor cantidad de proteína cuando la temperatura y el tiempo de inducción fueron de 30°C y de 4 hs.

Sin embargo, ninguno de estos abordajes resultó en la obtención de la proteína soluble ni en el aumento significativo de la producción, logrando obtener 1 mg de proteína por litro de cultivo. Debido a ellos recurrimos al agregado de urea para solubilizar a las EgVALs. El

agregado de este reactivo fue resistido ya que genera algunas complicaciones durante la purificación pero no afectó el proceso de encapsulación.

Al momento de realizar los ensayos de expresión, no se contaba con el equipamiento necesario para realizarlos a temperaturas más bajas. En la actualidad, la sección bioquímica cuenta con un nuevo agitador donde es posible cultivar las bacterias a temperaturas menores a 30°C, lo cual podría mejorar su solubilidad.

Es probable que la presencia de puentes disulfuros y glicosilaciones de las EgVALs, perjudiquen su producción de forma soluble en este sistema de expresión. El uso de la cepa de *E. coli* (DE3) Origami, podría ser una estrategia exitosa para la obtención de las proteínas EgVALs de forma soluble. Esta cepa está optimizada para la expresión de proteínas que forman puentes disulfuros debido a la mutación de los genes *tiorredoxin reductasa* y *glutathione reductase*.

Nisbet y colaboradores (2013), han reportado la expresión en *E. coli* de forma soluble de la proteína Tci-ASP-1, usando la cepa BL21 CodonPlus-RIL y el vector pET-SUMO. Esta cepa, está optimizada para la expresión de proteínas con codones raros. En nuestros ensayos observamos que la optimización para el uso de codones de EgVAL1 no influyó significativamente en los niveles de expresión, lo que nos estaría indicando que la baja expresión no se debería al uso de codones. Como perspectiva, se podría intentar la expresión de EgVAL2, para la cual no fue optimizada su secuencia, según las condiciones de Nisbet y colaboradores empleando el vector y la cepa utilizada por estos autores.

A pesar de los resultados obtenidos mediante los diferentes protocolos de expresión, la cantidad de proteína obtenida fue suficiente para la producción de anticuerpos y para la realización de los ensayos de encapsulación.

Si bien se realizaron varios esfuerzos, no fue posible obtener ninguna de las proteínas en forma soluble. Sin embargo, la urea empleada para solubilizarlas no interfirió con los ensayos de encapsulación ni consideramos sea un problema para la salud del animal que recibirá las proteínas encapsuladas ya que fue posible la generación de anticuerpos específicos en ratones sin que la salud de éstos se viera afectada.

Por último, si bien las proteínas no se encuentran en su conformación nativa, esto no es un impedimento para la generación de una respuesta inmune y en consecuencia para emplearlas

como vacuna. Existen dos tipos de epítopes presentes en las proteínas: continuos y discontinuos. El epítipo continuo (también llamado lineal) es un fragmento consecutivo de la secuencia de la proteína y el epítipo discontinuo se compone de varios fragmentos dispersos a lo largo de la secuencia, que forman la interfaz de unión al antígeno. El límite entre los epítopes continuos y discontinuos es vago, un fragmento en un epítipo discontinuo puede ser considerado como un epítipo continuo. Existen varios métodos de predicción de epítopes que se basan en las propiedades de los aminoácidos incluyendo la hidrofiliidad, la accesibilidad de disolvente, la estructura secundaria, la flexibilidad, y la antigenicidad. Una de las herramientas bioinformáticas que predice la existencia de epítopes continuos en una secuencia de aminoácidos es SVMTriP (<http://sysbio.unl.edu/SVMTriP/index.php>). Mediante esta herramienta, se evidenció la presencia de cinco epítopes continuos para EgVAL1 y tres para EgVAL2. Este resultado resulta prometedor a la hora de generar una respuesta inmune mediante las proteínas EgVALs obtenidas de forma insoluble.

En el caso de que en futuros ensayos no se lograra obtener altos niveles de expresión de las EgVALs, se podría intentar el desarrollo de la nanovacuna utilizando los epítopes putativos de las EgVALs, sintetizando y expresando los péptidos que actuarían como tales. Varios autores han utilizado diversos péptidos sintéticos, logrando obtener la respuesta inmune deseada (Abd Alla *et al.*, 2007; Anderson *et al.*, 1995; Emini *et al.*, 1985).

En 1996 se dió a conocer el desarrollo de la vacuna recombinante EG95 contra *E. granulosus* (Lightowlers *et al.*, 1996), basada en la inmunidad desarrollada por la oncósfera en su hospedero intermediario. Si bien los animales vacunados mostraron una protección del 96-98 %, un primer estudio de impacto en granjas de Rio Negro, Argentina, detectaron dificultades operativas en el terreno para la aplicación de la vacuna (Larrieu, 2013).

La razón para intentar el desarrollo de una vacuna contra *E. granulosus* en su hospedero definitivo es solucionar muchas de las dificultades que conlleva la vacunación del hospedero intermediario. La generación de una vacuna para perros tiene las siguientes ventajas: el número de perros a vacunar es significativamente menor en comparación con la cantidad de ovinos y bovinos (es más económico en una campaña de control masiva), se puede dosificar perros callejeros o salvajes sin tener que capturarlos y se activa directamente la inmunidad de mucosas, lo que genera una mayor protección. Por último, una vacuna para perros podría ser de gran beneficio en la reducción del período efectivo necesarios para detener la transmisión a humanos de *E. granulosus*, que en la actualidad es más de diez años (Zhang *et al.*, 2008).

Como vimos anteriormente, Al-Alkhalidi y Barriga (1986b) demostraron que frente a una infección por *E. granulosus* en perros, se genera una respuesta alérgica mediada por IgE. La molécula que se seleccione como candidato vacunal para este hospedero debe ser capaz de provocar una respuesta de hipersensibilidad de tipo I, y por lo tanto un aumento de la producción de IgE, que genere la expulsión de los parásitos del intestino del perro. Las moléculas alergénicas son buenos candidatos para producir este tipo de respuesta inmune y esta clase de moléculas están incluidas en la superfamilia de proteínas CAP. Ejemplo de ello son las toxinas de venenos de serpientes, avispa y aún de plantas como por ejemplo Trifilin, Pseudotoxina y PI14 (Fernandez *et al.*, 1997, Henriquesen *et al.*, 2001, Shikamoto *et al.*, 2005). Se ha demostrado que las proteínas VAL de *Schistosoma mansoni* tienen propiedades alergénicas en un modelo murino de la inflamación de las vías respiratorias (Farias *et al.*, 2012). Más prometedor aún es el hecho que se han obtenido resultados promisorios utilizando proteínas de nematodos miembros de esta superfamilia como candidatos vacunales (Kooyman *et al.*, 2000; Macdonald *et al.*, 2004; Bethony *et al.*, 2005; Meyvis *et al.*, 2007; He *et al.*, 2009; Diemert *et al.*, 2012; Vlamnick *et al.*, 2015).

En este trabajo, hemos elegido a las proteínas de *E. granulosus* a las que hemos llamado EgVALs para su encapsulación en nanopartículas poliméricas para su posterior estudio como candidatos vacunales para el hospedero definitivo del parásito.

Varias son las nanovacunas experimentales descritas como por ejemplo contra malaria, leishmaniasis, hepatitis, influenza, *Streptococcus equis*, *Neospora caninum*, *Schistosoma mansoni*, *Plasmodium falciparum*, *Clamidia trachomatis*, y contra tuberculosis. (Florindo *et al.*, 2009; Ansari *et al.*, 2011; Gupta *et al.*, 2011; Mangal *et al.*, 2011; Pusic *et al.*, 2011; Jimenez-Ruiz *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2012; Taha *et al.*, 2012; Tyagi *et al.*, 2012).

La vía oral es la ruta de administración de drogas más conveniente y ampliamente utilizada. Para que las vacunas orales sean efectivas, deben ser eficientemente internalizadas por la mucosa e inducir una respuesta antígeno-específica, así como generar respuesta de células B de memoria y células T. Los anticuerpos IgA son los anticuerpos predominantes en las secreciones intestinales; pueden unirse a los patógenos y neutralizarlos previniendo su contacto con la barrera de células epiteliales intestinales. Además de ayudar en la "captura" de antígenos en la mucosa intestinal, la IgA también es importante para la expulsión de los antígenos del medio interno en el lumen intestinal a través de transcitosis, así como el

transporte de antígenos del lumen a los tejidos linfoides subyacentes para la iniciación de respuesta inmune (Howe *et al.*, 2015).

Idealmente, el uso de las EgVALs como antígenos vacunales administrados por vía oral deberían generar anticuerpos IgA, los cuales predominan en la respuesta inmune de mucosas y anticuerpos IgE en respuesta a la reacción alérgica que ellas generarían.

Las drogas administradas oralmente deben sobrevivir en las condiciones ambientales del tracto gastrointestinal para poder ser absorbidas y generar este tipo de respuestas. Para lograr este objetivo, se han desarrollado varios sistemas que actúan como transportadores para llevar la droga a su sitio de acción. La nanotecnología permite el diseño de sistemas de entrega de drogas, capaces de llevarlas de forma protegida, hasta zonas específicas del tracto gastrointestinal (Park *et al.*, 2011). Esa tecnología nos pareció adecuada para encapsular en nanopartículas poliméricas a EgVAL1 y EgVAL2 generando nanopartículas que puedan ser transportadas a través del tracto gastrointestinal y absorbidas por las células intestinales.

Varios polímeros biodegradables tales como ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA), el ácido poliláctico (PLA), la policaprolactona (PCL), el Chitosán, la gelatina, y los poli-alquil-cianoacrilatos se han utilizado ampliamente para la formulación de nanopartículas poliméricas. Entre ellos, el PLA ha sido ampliamente utilizado debido a sus características de biocompatible, biodegradable y en particular porque ha sido aprobado por la “Food and Drug Administration” (FDA) para su uso clínico (Pandey *et al.*, 2015). Dadas estas características, en este trabajo hemos elegido al PLA como polímero para la formulación de las nanopartículas con EgVALs.

Debido a que el polímero PLA tienen un alto costo y a que los niveles de expresión de las EgVALs son muy bajos y en consecuencia la cantidad de proteína purificada, para evaluar diferentes parámetros de encapsulación, se empleó el polímero PCL (más económico) y la proteína sero albúmina bovian (BSA), para la puesta a punto del sistema. Los parámetros más importantes a tener en cuenta para el diseño de una nanovacuna oral son el tamaño, las características superficiales, el potencial zeta y la forma de las nanopartículas (des Rieux *et al.*, 2006).

Las células M de las Placas de Peyer son la vía más común para la internalización de las nanopartículas en las inmunizaciones orales. Las nanopartículas se unen a la superficie de las

células M, donde son endocitadas y translocadas a las placas de Peyer subepiteliales (Awad *et al.*, 2012). Debido a la capacidad de las células M para la internalización de las nanopartículas, varios grupos de investigación han trabajado para mejorar la entrega de las nanopartículas a las células M y de esta manera compensar su bajo número con respecto a los enterocitos en el tejido intestinal (des Rieux *et al.*, 2006).

En este sentido, es importante el tamaño de las mismas, que además juega un rol importante en la magnitud y calidad de la respuesta inmune que generan. Las nanopartículas con un tamaño menor a 1 μm son internalizadas por las células M y entregadas al medio basal, mientras que las partículas con tamaño mayor a 5 μm son captadas por las células M pero permanecen atrapadas en las placas de Peyer. Si bien existe controversia con respecto al tamaño ideal, el tamaño óptimo de una nanopartícula para ser captadas por las células M mediante transitosi es por debajo de 1 μm (revisado por des Rieux *et al.*, 2006).

Mediante el método de doble emulsión con evaporación del solvente, variando la concentración del polímero, logramos obtener nanopartículas con tamaños menores a 1 μm . Sin embargo, en los ensayos donde se empleó mayor cantidad de PCL, también se obtuvieron partículas de mayor tamaño, incluso mayores a 1 μm . El exceso de polímero puede llevar a la formación de aglomeraciones entre las partículas formadas, aumentando el índice de polidispersión de la muestra (Wang *et al.*, 2015). Por lo tanto, el uso de 50 mg de polímero en la formulación final fue el adecuado, obteniendo partículas del tamaño deseado en el rango de los 200 nm y evitando la formación de aglomeraciones.

La internalización de las nanopartículas por parte de las placas de Peyer es un factor importante pero no es el único que determina la eficacia de una inmunización oral. La capacidad de las nanopartículas para encapsular los antígenos y la manera en que estos se liberan en el sitio blanco también son muy importantes. Las nanopartículas de aproximadamente 200 nm tienen una ventaja con respecto a partículas de tamaños menores que también son eficientemente internalizadas y es que la capacidad de carga de antígenos es mayor. A su vez, son transportadas a las placas de Peyer de forma más eficiente que las nanopartículas de tamaños mayores (Awaad *et al.*, 2012).

Una vez puestos a punto los parámetros de encapsulación de BSA en nanopartículas de PCL, utilizamos estos parámetros para encapsular EgVALs en nanopartículas de PLA. El tamaño de las partículas obtenido fue el deseado. Estos resultados tienen gran importancia en el

desarrollo de una vacuna oral exitosa usando nanopartículas poliméricas como sistema de entrega de antígenos ya que la vacunación requiere una alta absorción por parte de las Placas de Peyer y la entrega de altos niveles de antígenos a las células. Nuestro resultado es prometedor ya que aumenta las posibilidades de que las nanopartículas formuladas sean captadas por las células M del intestino de los perros.

El tamaño de las nanopartículas fue medido mediante dispersión de luz dinámica. Para validar estas medidas, sería necesario visualizar a las nanopartículas mediante microscopía electrónica. Bilati y colaboradores (2005) y Gaumet y colaboradores (2010), entre otros autores, obtuvieron la medida del tamaño de las nanopartículas mediante microscopía electrónica de barrido. La visualización de las nanopartículas por micsocopía, no solo nos confirma el tamaño de las mismas, obtenido por dispersión de luz dinámica, si no que también permite evaluar la superficie y la forma de las mismas. En este trabajo no se realizaron estudios de microcopía electrónica para evaluar a las nanopartículas, quedando pendiente para futuros ensayo.

En cuanto a los valores de la eficiencia de encapsulación, si bien no fueron calculados con exactitud, los resultados indican que la mayoría de la proteína fue encapsulada en las nanopartículas ya que, mediante la técnica de SDS-PAGE, no se detectó la presencia de la misma en la fase acuosa que las contiene. Según datos revisados por Moras-Huertas y colaboradores (2010), el porcentaje de eficiencia de encapsulación más alto reportado (94-99%) corresponde a la encapsulación de un antiestrógeno en nanopartículas de PLA, PLC y PLGA, preparadas por el proceso de nanoprecipitación. Según nuestros resultados y mediante los parámetros fijados, no nos fue posible encapsular BSA en nanopartículas del tamaño deseado mediante este proceso de formulación ya que requiere de la dilución de la proteína en un solvente orgánico, lo cual la altera estructuralmente, generando precipitados que interfieren con su encapsulación. Si bien no se realizaron los ensayos de nanoprecipitación con las EgVALs, sabemos que las proteínas se verían afectadas por la disolución de las mismas en solventes orgánicos por lo cual este método fue descartado. Mediante el proceso de doble emulsión, varios autores lograron obtener eficiencias de encapsulación que van de 65 a 75%. Estos niveles de encapsulación menores a los obtenidos por el método de nanoprecipitación pueden estar influenciados por el polímero y el surfactante usado (revisado por Moras-Huertas *et al.*, 2010). Tomando en cuenta los resultados de los estudios de encapsulación mediante SDS-PAGE, podemos concluir que la eficiencia de encapsulación de nuestras

proteínas fue alta, lo que se corresponde con los datos reportados por Mora-Huertas y colaboradores.

Gupta y colaboradores (2011), calcularon la eficiencia exacta de encapsulación de una hemaglutinina del virus de la influenza en nanopartículas de PCL recubiertas con Chitosán mediante el ensayo BCA: separaron a las nanopartículas de la solución acuosa mediante centrifugación y cuantificaron la cantidad de proteína presente en la solución acuosa con el ensayo mencionado. La proteína que no se encontraba en esa fracción estaba encapsulada en las nanopartículas. Otros autores han reportado el cálculo de eficiencia de encapsulación mediante este método colorimétrico, para la cuantificación de las proteínas encapsuladas (Conway *et al.*, 2001; Mangal *et al.*, 2011; Lancheros *et al.*, 2014). Esta metodología es económica y fácil de realizar en el laboratorio, por lo que será tomada en cuenta para futuros ensayos.

El Chitosán es un polisacárido catiónico obtenido a partir de la desacetilación de la quitina, que posee propiedades mucoadhesivas e inmunoestimulantes, lo que lo hace particularmente útil para el desarrollo de nanovacunas mucosas, aumentando la interacción e internalización de las nanopartículas en la mucosa. Se cree que el mecanismo de acción es una combinación entre sus propiedades bioadhesivas y la ampliación transitoria de las uniones estrechas entre las células epiteliales. Además, es biocompatible con los tejidos vivos, en donde se descompone lentamente a productos inocuos (aminoazúcares), que son completamente absorbidos, sin generar reacciones alérgicas o rechazos (Agnihotri *et al.*, 2004). Por estas razones, en este trabajo se realizó el recubrimiento con Chitosán de las nanopartículas de PLA obtenidas.

Los grupos carboxílicos terminales del PLA les confiere carga negativa a las nanopartículas, como vimos según los resultados de la medida del potencial zeta de las mismas. Al recubrir a las nanopartículas con Chitosán, no solo se neutralizan los grupos carboxilos del PLA, si no que también se adicionan cargas positivas. Este cambio de valor del potencial zeta, que pasó de un valor negativo a un valor positivo, confirma que las nanopartículas fueron recubiertas. Este hecho es beneficioso para su interacción con la mucosa intestinal. El moco presente en la mucosa contiene mucinas que a su vez contienen una proporción significativa de ácido siálico. A pH fisiológico, el ácido siálico tiene una carga neta negativa. En consecuencia, ocurre una fuerte interacción electrostática entre el Chitosán y las mucinas, lo que reduce la tasa de eliminación de las nanopartículas, aumentando el tiempo de residencia

de las mismas en el intestino (Gupta *et al.*, 2011). Por otro lado, el tamaño de las nanopartículas se ve poco afectado al ser recubiertas con Chitosán, manteniéndose en el rango adecuado para ser internalizadas por las células M. Por último, el recubrimiento de las partículas con el Chitosán aumentó el valor absoluto del potencial zeta, lo que se traduce en un aumento de la estabilidad de las nanopartículas (manual de Zetasizer Nano series).

En soluciones acuosas neutras o a pH básicos, el Chitosán es un polisacárido catiónico con grupos aminos libre, lo que lo hace insoluble en agua. Por otro lado, en soluciones acuosas a pH ácidos, los grupos aminos se protonan, volviendo al Chitosán soluble (Agnihotri *et al.*, 2004). Por este motivo, la recubierta de Chitosán de las nanopartículas de PLA formuladas podría perderse durante el pasaje de las mismas por el estómago de los perros. Para solucionar este inconveniente, proponemos incluir a las nanopartículas en cápsulas gastrorresistentes. De esta manera, las partículas recubiertas con Chitosán lograrían pasar por el estómago y llegar al intestino sin verse alteradas. Además, utilizando cápsulas gastrointestinales, se evitaría la dilución de las nanopartículas en los jugos gástricos, concentrando al antígeno hasta llegar a la mucosa intestinal.

La falta de respuesta sistémica a los antígenos administrados de forma oral puede producir tolerancia. Los antígenos administrados oralmente sin la presencia de un adyuvante, inducen la tolerancia sistémica debido a la eliminación de células T, la anergia de células T o la inducción de células T supresoras, dependiendo de la concentración del antígeno. Esta estrategia ha sido ensayada para el tratamiento de alergias alimentarias o respuestas a bacterias de la flora normal (Foster y Hirst, 2005). Por lo tanto, la cantidad de antígeno encapsulado en las nanopartículas y la elección de un adyuvante son características a tener en cuenta a la hora de desarrollar una nanovacuna oral. El uso de Chitosán como adyuvante y la inclusión de las nanopartículas en cápsulas gastrorresistentes parece una estrategia exitosa para evitar la tolerancia.

Para lograr una aproximación al recorrido que realizarían las nanopartículas en el sistema gastrointestinal del perro, se realizaron ensayos con fluido gástrico e intestinal artificiales preparados según Galia y colaboradores (1998) y Vertzoni y colaboradores (2005). Esta aproximación ha sido utilizada por diferentes autores, para evaluar que pasaría en un ambiente *in vivo* (Roger *et al.*, 2009, Sakai-Kato *et al.*, 2014).

Luego de someter a las nanopartículas al ambiente gastrointestinal artificial, se evaluó la integridad y la inmunogenicidad de la proteína encapsulada mediante las técnicas de SDS-PAGE y Western Blot. Las proteínas encapsuladas en nanopartículas recubiertas con Chitosán no se vieron alteradas luego del pasaje a través de los fluidos gástricosintestinales sintéticos, manteniendo tanto su integridad como su inmunogenicidad.

Como se dijo anteriormente, el Chitosán es soluble a pHs ácidos. En este ensayo no se evaluó la pérdida de la cubierta de Chitosán al pasar por el fluido gástrico que tiene pH 1,6. La medida del potencial zeta hubiera revelado la pérdida o no de la cubierta. Este detalle será tenido en cuenta para la realización de futuros ensayos. A pesar de esto, nuestros resultados indican que la formulación de las nanopartículas con EgVALs encapsuladas fue exitosa, logrando protegerlas de las condiciones adversas del ambiente gastrointestinal.

Los ensayos realizados resultan una buena aproximación para demostrar que el sistema de entrega de antígenos encapsulados en partículas poliméricas aquí presentado, es una buena estrategia para el desarrollo de una nanovacuna oral contra *E. granulosus*, que logra proteger a los antígenos hasta su llegada al intestino para su posterior internalización por parte de las células M. El polímero elegido logró mantener a los antígenos encapsulados sin verse alterado por los cambios de pH. Si bien las nanopartículas generadas en este trabajo no fueron evaluadas aún en sistemas *in vivo*, los resultados de estos ensayos resultan prometedores. En una próxima etapa, se debería evaluar este sistema de entrega de antígenos en un sistema *in vivo* como puede ser cultivo celular o en un modelo mamífero como por ejemplo en ratones, previo a la inmunización de perros.

Por último, las nanopartículas de PLA resultaron ser estables a lo largo del tiempo durante el almacenamiento a 4°C en solución. Sin embargo, no ocurrió lo mismo con las nanopartículas de PLA recubiertas con Chitosán, observándose un aumento de tamaño y del índice de polidispersión de las mismas luego de las condiciones de almacenamiento anteriormente mencionadas. Es necesario solucionar este inconveniente previo a la utilización de estas nanopartículas en estudios *in vivo*. Una solución a este problema sería liofilizar a las nanopartículas inmediatamente después de la formulación, evitando de esta manera la precipitación del Chitosán. Además se prevé que las nanopartículas serán administradas a los perros en polvo, encapsuladas en cápsulas gastroresistentes por lo que de todas formas, es necesario liofilizarlas.

Previo a la realización de ensayos en sistemas *in vivo*, sería importante resolver este inconveniente. El Chitosán, además de ser mucoadhesivo, es un potenciador de la respuesta inmune. Como vimos anteriormente, la elección de un adyuvante para el desarrollo de vacunas orales es muy importante, principalmente para evitar la inducción de tolerancia por parte de los antígenos. Si la cubierta de Chitosán no resulta estable a lo largo del tiempo será necesario ensayar el uso de otros adyuvantes de mucosas. Existen tres productos bacterianos con gran potencial para ser usados como adyuvantes en el desarrollo de vacunas mucosas: las enterotoxinas ADP – ribosiladas, los oligodesoxinucleótidos con dinucleótidos CpG no metilados y el monofosforil lípido A (Freitag y Clements, 2005).

En resumen, este estudio proporciona información detallada sobre la organización estructural de las proteínas EgVAL1 y EgVAL2 y su relación filogenética con otros miembros de esta superfamilia de proteínas. Las diferencias discretas entre las EgVALs podrían estar indicando que realizan diferentes funciones. Previo a nuestro trabajo, otros investigadores intentaron producir proteína suficiente, lo que no fue logrado utilizando distintos sistemas de expresión. Aquí, se logró producir cantidad suficiente de proteína para obtener anticuerpos y formular las nanopartículas. Mediante la encapsulación de las EgVALs en nanopartículas poliméricas recubiertas con Chitosán se logró obtener partículas del tamaño deseado. Además, la encapsulación permitió preservar el antígeno cuando este fue sometido a las condiciones gastrointestinales.

Futuros ensayos serán necesarios para evaluar la eficacia de estos antígenos en la generación de una vacuna.

6. BIBLIOGRAFÍA

Abd Alla MD, White GL, Rogers TB, Cary ME, Carey DW, Ravdin JI. Adherence-inhibitory intestinal immunoglobulin a antibody response in baboons elicited by use of a synthetic intranasal lectin-based amebiasis subunit vaccine. *Infect Immun*. 2007 Aug;75(8):3812-22.

Afifi MA, Jiman-Fatani AA, El Saadand S, Foad MA. Parasites-Allergy paradox: Disease mediators or therapeutic modulators. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*. 2015; 3(2); 53-61.

Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J Control Release*. 2004 Nov 5;100(1):5-28.

Alkhalidi NW, and Barriga OO. Cell mediated immunity in the prepatent primary infection of dogs with *Echinococcus granulosus*. *Veterinary Immunology and Immunophatology*, 1986a; 11; 73-82.

Alkhalidi NW, and Barriga OO. Humoral immunity in the prepatent primary infection of dogs with *Echinococcus granulosus*. *Immunology and Immunophatology*, 1986b; 11; 375-389

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990 Oct 5;215(3):403-10.

Aminzhanov M. Immunoprophylaxis of hydatidosis in animals. *Tr. Uzbek. Nauchno-Issled. Inst. Vet*. 1980; 30:15-18.

Anderson S, Momoeda M, Kawase M, Kajigaya S, Young NS. Peptides derived from the unique region of B19 parvovirus minor capsid protein elicit neutralizing antibodies in rabbits. *Virology*. 1995 Jan 10;206(1):626-32.

Ansari MA, Zubair S, Mahmood A, Gupta P, Khan AA, Gupta UD, Arora A, Owais M. RD antigen based nanovaccine imparts long term protection by inducing memory response against experimental murine tuberculosis. *PLoS One*. 2011;6(8):e22889. doi: 10.1371/journal.pone.0022889.

Asojo OA, Goud G, Dhar K, Loukas A, Zhan B, Deumic V, Liu S, Borgstahl GE, Hotez PJ. X-ray structure of Na-ASP-2, a pathogenesis-related-1 protein from the nematode parasite,

Necator americanus, and a vaccine antigen for human hookworm infection. *J Mol Biol.* 2005 Feb 25;346(3):801-14.

Asojo OA. Structure of a two-CAP-domain protein from the human hookworm parasite *Necator americanus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2011 May;67(Pt 5):455-62.

Awaad A, Nakamura M, Ishimura K. Imaging of size-dependent uptake and identification of novel pathways in mouse Peyer's patches using fluorescent organosilica particles. *Nanomedicine.* 2012 Jul;8(5):627-36.

Bethony J, Loukas A, Smout M, Brooker S, Mendez S, Plieskatt J, Goud G, Bottazzi ME, Zhan B, Wang Y, Williamson A, Lustigman S, Correa-Oliveira R, Xiao S, Hotez PJ. Antibodies against a secreted protein from hookworm larvae reduce the intensity of hookworm infection in humans and vaccinated laboratory animals. *FASEB J.* 2005 Oct;19(12):1743-5.

Bilati U, Allémann E, Doelker E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *Eur J Pharm Sci.* 2005a Jan;24(1):67-75.

Bilati U, Allémann E, Doelker E. Nanoprecipitation versus emulsion-based techniques for the encapsulation of proteins into biodegradable nanoparticles and process-related stability issues. *AAPS PharmSciTech.* 2005b Dec 1;6(4).

Britos L, Lalanne AI, Castillo E, Cota G, Señorale M, Marín M. *Mesocostoides corti* (syn. *vogae*, cestoda): characterization of genes encoding cysteine-rich secreted proteins (CRISP). *Exp Parasitol.* 2007 Jun;116(2):95-102.

Brunetti E, Kern P, Vuitton DA; Writing Panel for the WHO-IWGE. Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Trop.* 2010 Apr;114(1):1-16.

Burgess-Brown NA, Sharma S, Sobott F, Loenarz C, Oppermann U, Gileadi O. Codon optimization can improve expression of human genes in *Escherichia coli*: A multi-gene study. *Protein Expr Purif.* 2008 May;59(1):94-102.

Cabrera PA, Irabedra P, Orlando D, Rista L, Harán G, Viñals G, Blanco MT, Alvarez M, Elola S, Morosoli D, Moraña A, Bondad M, Sambrán Y, Heinzen T, Chans L, Piñeyro L, Pérez D, Pereyra I. National prevalence of larval echinococcosis in sheep in slaughtering plants *Ovis aries* as an indicator in control programmes in Uruguay. *Acta Trop.* 2003 Feb;85(2):281-5.

Cantacessi C, Campbell BE, Visser A, Geldhof P, Nolan MJ, Nisbet AJ, Matthews JB, Loukas A, Hofmann A, Otranto D, Sternberg PW, Gasser RB. A portrait of the "SCP/TAPS" proteins of eukaryotes--developing a framework for fundamental research and biotechnological outcomes. *Biotechnol Adv.* 2009 Jul-Aug;27(4):376-88.

Cantacessi C, Gasser RB. SCP/TAPS proteins in helminths: where to from now? *Mol Cell Probes.* 2012 Feb;26(1):54-9.

Chabalgoity JA, Harrison JA, Esteves A, Demarco de Hormaeche R, Ehrlich R, Khan CM, Hormaeche CE. Expression and immunogenicity of an *Echinococcus granulosus* fatty acid-binding protein in live attenuated *Salmonella* vaccine strains. *Infect Immun.* 1997 Jun;65(6):2402-12.

Chabalgoity JA, Moreno M, Carol H, Dougan G, Hormaeche CE. *Salmonella typhimurium* as a basis for a live oral *Echinococcus granulosus* vaccine. *Vaccine.* 2000 Oct 15;19(4-5):460-9.

Chalmers IW, Hoffmann KF. Platyhelminth Venom Allergen-Like (VAL) proteins: revealing structural diversity, class-specific features and biological associations across the phylum. *Parasitology.* 2012 Sep;139(10):1231-45.

Chalmers IW, McArdle AJ, Coulson RM, Wagner MA, Schmid R, Hirai H, Hoffmann KF. Developmentally regulated expression, alternative splicing and distinct sub-groupings in members of the *Schistosoma mansoni* venom allergen-like (SmVAL) gene family. *BMC Genomics.* 2008 Feb 23;9:89.

Chen MC, Mi FL, Liao ZX, Hsiao CW, Sonaje K, Chung MF, Hsu LW, Sung HW. Recent advances in chitosan-based nanoparticles for oral delivery of macromolecules. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013 Jun 15;65(6):865-79.

Conway MA, Madrigal-Estebas L, McClean S, Brayden DJ, Mills KH. Protection against *Bordetella pertussis* infection following parenteral or oral immunization with antigens entrapped in biodegradable particles: effect of formulation and route of immunization on induction of Th1 and Th2 cells. *Vaccine*. 2001 Feb 28;19(15-16):1940-50.

Costábile A. Superfamilia SCP/TAPS de *Mesocestoides corti*. Contribución a la dilucidación del rol de estas proteínas durante el desarrollo estrobilar. Tesis de maestría, PEDECIBA Biología 2013.

Curwen RS, Ashton PD, Sundaralingam S, Wilson RA. Identification of novel proteases and immunomodulators in the secretions of schistosome cercariae that facilitate host entry. *Mol Cell Proteomics*. 2006 May;5(5):835-44.

Dauplais M, Lecoq A, Song J, Cotton J, Jamin N, Gilquin B, Roumestand C, Vita C, de Medeiros CL, Rowan EG, Harvey AL, Ménéz A. On the convergent evolution of animal toxins. Conservation of a diad of functional residues in potassium channel-blocking toxins with unrelated structures. *J Biol Chem*. 1997 Feb 14;272(7):4302-9.

des Rieux A, Fievez V, Garinot M, Schneider YJ, Pr  at V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *J Control Release*. 2006 Nov;116(1):1-27.

Diemert DJ, Pinto AG, Freire J, Jariwala A, Santiago H, Hamilton RG, Periago MV, Loukas A, Tribolet L, Mulvenna J, Correa-Oliveira R, Hotez PJ, Bethony JM. Generalized urticaria induced by the Na-ASP-2 hookworm vaccine: implications for the development of vaccines against helminths. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Jul;130(1):169-76.

Echeverría S. Expresión de proteínas tipo CRISP de *Echinococcus granulosus* para su utilización como antígeno para una vacuna. Tesis de graduación, Licenciatura en bioquímica 2011.

Eckert J, Gemmell MA, Meslin FX, Pawlowski ZS, editors. WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. Paris' World Organisation for Animal Health; 2001. p. 100– 42.

Elola, S. (2009). Nuevas estrategias de la vigilancia de la Equinococcosis quística.

XXII Congreso de Hidatología, Colonia, Uruguay.

Emini EA, Hughes JV, Perlow DS, Boger J. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J Virol*. 1985 Sep;55(3):836-9.

Farias LP, Rodrigues D, Cunna V, Rofatto HK, Faquim-Mauro EL, Leite LC. *Schistosoma mansoni* venom allergen like proteins present differential allergic responses in a murine model of airway inflammation. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(2).

Fattal E, Pecquet S, Couvreur P, Andremont A. Biodegradable microparticles for the mucosal delivery of antibacterial and dietary antigens. *Int J Pharm*. 2002 Aug 21;242(1-2):15-24.

Fernández C, Szyperski T, Bruyère T, Ramage P, Mössinger E, Wüthrich K. NMR solution structure of the pathogenesis-related protein P14a. *J Mol Biol*. 1997 Feb 28;266(3):576-93.

Ferreira C. Informe del proyecto subregional cono sur de control y vigilancia de la hidatidosis: Argentina, Brasil, Chile y Uruguay, Tercera Reunión. Porto Alegre, Brasil 23 al 26 de mayo de 2006.

Florindo HF, Pandit S, Lacerda L, Gonçalves LM, Alpar HO, Almeida AJ. The enhancement of the immune response against *S. equi* antigens through the intranasal administration of poly-epsilon-caprolactone-based nanoparticles. *Biomaterials*. 2009 Feb;30(5):879-91.

Forsek, Z. and Rukavina, J. *Veterinaria* (Sarajevo), 1959;8, 479-482.

Foster N, Hirst BH. Exploiting receptor biology for oral vaccination with biodegradable particulates. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005 Jan 10;57(3):431-50.

Freytag LC, Clements JD. Mucosal adjuvants. *Vaccine*. 2005 Mar 7;23(15):1804-13.

Fu Y, Martinez C, Chalar C, Craig PS, Ehrlich R, Petavy AF, Bosquet G. A new potent antigen from *Echinococcus granulosus* associated with muscles and tegument. *Mol Biochem Parasitol*. 1999 Jul 30;102(1):43-52.

Galia E, Nicolaides E, Hörter D, Löbenberg R, Reppas C, Dressman JB. Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of class I and II drugs. *Pharm Res*. 1998 May;15(5):698-705.

García J, Santana Z, Zumalacarregui L, Quintana M, Gonzalez D, Furrazola G, Cruz O. Estrategias de obtención de proteínas recombinantes de *Escherichia coli*. *VacciMonitor* 2013; 22(2): 30-39.

Gaumet M, Gurny R, Delie F. Interaction of biodegradable nanoparticles with intestinal cells: the effect of surface hydrophilicity. *Int J Pharm*. 2010 May 5;390(1):45-52.

GE Healthcare Life Science. Recombinant protein purification. Principles and methods. 18-1142-75.

Geldhof P, De Maere V, Vercruysse J, Claerebout E. Recombinant expression systems: the obstacle to helminth vaccines? *Trends Parasitol*. 2007 Nov;23(11):527-32.

Gemmel MA, Roberts MG, Beard TC, Campano Diaz S, Lawson JR, Nonnemaker JM. Control of Echinococcosis. In: Eckert J, Gemmel MA, Meslin FX, Pawlowski ZT. Manual on Echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. France: WHO/OIE; 2001. 195–203.

Gemmell MA, Lawson JR, Roberts MG, Kerin BR, Mason CJ. Population dynamics in echinococcosis and cysticercosis: comparison of the response of *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena* and *T. ovis* to control. *Parasitology*. 1986 Oct;93 (Pt 2):357-69.

Gemmell MA, Lawson JR, Roberts MG. Population dynamics in echinococcosis and cysticercosis: biological parameters of *Echinococcus granulosus* in dogs and sheep. 1986; 92 (3):599-620.

Gemmell, M.A. Natural and acquired immunity factors interfering with development during the rapid growth phase of *Echinococcus granulosus* in dogs. *Immunology*, 1962; 5:496–503.

Gibbs GM, Roelants K, O'Bryan MK. The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins--roles in reproduction, cancer, and immune defense. *Endocr Rev*. 2008 Dec;29(7):865-97.

Goud GN, Bottazzi ME, Zhan B, Mendez S, Deumic V, Plieskatt J, Liu S, Wang Y, Bueno L, Fujiwara R, Samuel A, Ahn SY, Solanki M, Asojo OA, Wang J, Bethony JM, Loukas A, Roy M, Hotez PJ. Expression of the *Necator americanus* hookworm larval antigen Na-ASP-2 in

Pichia pastoris and purification of the recombinant protein for use in human clinical trials. *Vaccine*. 2005 Sep 15;23(39):4754-64.

Gupta NK, Tomar P, Sharma V, Dixit VK. Development and characterization of chitosan coated poly-(ϵ -caprolactone) nanoparticulate system for effective immunization against influenza. *Vaccine*. 2011 Nov 8;29(48):9026-37.

Hall BG. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Mol Biol Evol*. 2013 May;30(5):1229-35.

He Y, Barker SJ, MacDonald AJ, Yu Y, Cao L, Li J, Parhar R, Heck S, Hartmann S, Golenbock DT, Jiang S, Libri NA, Semper AE, Rosenberg WM, Lustigman S. Recombinant Ov-ASP-1, a Th1-biased protein adjuvant derived from the helminth *Onchocerca volvulus*, can directly bind and activate antigen-presenting cells. *J Immunol*. 2009 Apr 1;182(7):4005-16.

Heath DD, Jensen O, Lightowlers MW. Progress in control of hydatidosis using vaccination--a review of formulation and delivery of the vaccine and recommendations for practical use in control programmes. *Acta Trop*. 2003 Feb;85(2):133-43.

Henriksen A, King TP, Mirza O, Monsalve RI, Meno K, Ipsen H, Larsen JN, Gajhede M, Spangfort MD. Major venom allergen of yellow jackets, Ves v 5: structural characterization of a pathogenesis-related protein superfamily. *Proteins*. 2001 Dec 1;45(4):438-48.

Herd R, Chappel R, Biddell D. Immunization of dogs against *Echinococcus granulosus* using worm secretory antigens. *International Journal for Parasitology* 1975; 5:395-9.

Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med*. 2005 Apr;11(4 Suppl):S45-53.

Hotez PJ, Zhan B, Bethony JM, Loukas A, Williamson A, Goud GN, Hawdon JM, Dobardzic A, Dobardzic R, Ghosh K, Bottazzi ME, Mendez S, Zook B, Wang Y, Liu S, Essiet-Gibson I, Chung-Debose S, Xiao S, Knox D, Meagher M, Inan M, Correa-Oliveira R, Vilk P, Shepherd HR, Brandt W, Russell PK. Progress in the development of a recombinant vaccine for human hookworm disease: the Human Hookworm Vaccine Initiative. *Int J Parasitol*. 2003 Sep 30;33(11):1245-58.

Howe SE, Konjufca VH. Per-oral immunization with antigen-conjugated nanoparticles followed by sub-cutaneous boosting immunization induces long-lasting mucosal and systemic antibody responses in mice. *PLoS One*. 2015 Feb 24;10(2):e0118067.

Hüttner M, Nakao M, Wassermann T, Siefert L, Boomker JD, Dinkel A, Sako Y, Mackenstedt U, Romig T, Ito A. Genetic characterization and phylogenetic position of *Echinococcus felidis* (Cestoda: Taeniidae) from the African lion. *Int J Parasitol*. 2008 Jun;38(7):861-8.

Irabedra P, Salvatella R. [The Southern Cone Sub-Regional Project on Cystic Echinococcosis Control and Surveillance]. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2010 Oct-Dec;27(4):598-603.

Jiménez-Ruiz E, Alvarez-García G, Aguado-Martínez A, Salman H, Irache JM, Marugán-Hernández V, Ortega-Mora LM. Low efficacy of NcGRA7, NcSAG4, NcBSR4 and NcSRS9 formulated in poly-ε-caprolactone against *Neospora caninum* infection in mice. *Vaccine*. 2012 Jul 13;30(33):4983-92.

Kelleher A, Darwiche R, Rezende WC, Farias LP, Leite LC, Schneiter R, Asojo OA. *Schistosoma mansoni* venom allergen-like protein 4 (SmVAL4) is a novel lipid-binding SCP/TAPS protein that lacks the prototypical CAP motifs. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2014 Aug;70(Pt 8):2186-96.

Kooyman FN, Schallig HD, Van Leeuwen MA, MacKellar A, Huntley JF, Cornelissen AW, Vervelde L. Protection in lambs vaccinated with *Haemonchus contortus* antigens is age related, and correlates with IgE rather than IgG1 antibody. *Parasite Immunol*. 2000 Jan;22(1):13-20.

Koshikawa N, Nakamura T, Tsuchiya N, Isaji M, Yasumitsu H, Umeda M, Miyazaki K. Purification and identification of a novel and four known serine proteinase inhibitors secreted by human glioblastoma cells. *J Biochem*. 1996 Feb;119(2):334-9.

Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. *Comput Appl Biosci*. 1994 Apr;10(2):189-91.

Lancheros R, Beleño JA, Guerrero CA, Godoy-Silva RD. Producción de nanopartículas de PLGA por el método de emulsión y evaporación para encapsular N-Acetilcisteína (NAC). *Universitas Scientiarum*, [S.l.], v. 19, n. 2, p. 161-168, may. 2014.

Larrieu E, Belloto A, Arambulo III P Tamayo, H. Echinococcosis quística: epidemiología y control en América del Sur. *Parasitol Latinoam*. 2004 59: 82-89.

Larrieu E, Herrero E, Mujica G, Labanchi JL, Araya D, Grizmado C, Calabro A, Talmon G, Ruesta G, Perez A, Gatti A, Santillán G, Cabrera M, Arezzo M, Seleiman M, Cavagión L, Cachau MG, Alvarez Rojas CA, Gino L, Gauci CG, Heath DD, Lamberti R, Lightowlers MW. Pilot field trial of the EG95 vaccine against ovine cystic echinococcosis in Rio Negro, Argentina: early impact and preliminary data. *Acta Trop*. 2013 Aug;127(2):143-51.

Larrieu E, Zanini F. Critical analysis of cystic echinococcosis control programs and praziquantel use in South America, 1974-2010. *Rev Panam Salud Pública*. 2012 Jan;31(1):81-7.

Laskowski RA, Luscombe NM, Swindells MB, Thornton JM. Protein clefts in molecular recognition and function. *Protein Sci*. 1996 Dec;5(12):2438-52.

Lightowlers MW. Vaccination against animal parasites. *Vet Parasitol*. 1994 Aug;54(1-3):177-204.

Lightowlers MW. Vaccination against cestode parasites. *Int J Parasitol*. 1996 Aug-Sep;26(8-9):819-24.

MacDonald AJ, Tawe W, Leon O, Cao L, Liu J, Oksov Y, Abraham D, Lustigman S. Ov-ASP-1, the *Onchocerca volvulus* homologue of the activation associated secreted protein family is immunostimulatory and can induce protective anti-larval immunity. *Parasite Immunol*. 2004 Jan;26(1):53-62.

Magambo J, Njoroge E, Zeyhle E. Epidemiology and control of echinococcosis in sub-Saharan Africa. *Parasitol Int*. 2006;55 Suppl:S193-5.

Mangal S, Pawar D, Garg NK, Jain AK, Vyas SP, Rao DS, Jaganathan KS. Pharmaceutical and immunological evaluation of mucoadhesive nanoparticles based delivery system(s) administered intranasally. *Vaccine*. 2011 Jul 12;29(31):4953-62.

- Matov K, and Vasilev, I.D. Active immunization of dogs against *Echinococcus granulosus*. Bull. Cent. Inst. Helminthol., 1955; 1:111-125.
- Matsuo K, Koizumi H, Akashi M, Nakagawa S, Fujita T, Yamamoto A, Okada N. Intranasal immunization with poly(γ -glutamic acid) nanoparticles entrapping antigenic proteins can induce potent tumor immunity. J Control Release. 2011 Jun 10;152(2):310-6.
- Meyvis Y, Geldhof P, Gevaert K, Timmerman E, Vercruysse J, Claerebout E. Vaccination against *Ostertagia ostertagi* with subfractions of the protective ES-thiol fraction. Vet Parasitol. 2007 Nov 10;149(3-4):239-45.
- Milne TJ, Abbenante G, Tyndall JD, Halliday J, Lewis RJ. Isolation and characterization of a cone snail protease with homology to CRISP proteins of the pathogenesis-related protein superfamily. J Biol Chem. 2003 Aug 15;278(33):31105-10.
- Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. Int J Pharm. 2010 Jan 29;385(1-2):113-42.
- Moro P, Schantz PM. Cystic echinococcosis in the Americas. Parasitol Int. 2006;55 Suppl:S181-6.
- Movsesijan M, Mladenovic Z. Active immunisation of dogs against *Echinococcus granulosus*. Vet Glasnik 1970; 24:189-93.
- Muñoz P. Diagnóstico y tratamiento de la hidatidosis. Comentario editorial. Rev Chil Infect 2007; 24 (2): 153-154
- Nakao M, Lavikainen A, Yanagida T, Ito A. Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). Int J Parasitol. 2013 Nov;43(12-13):1017-29.
- Nakao M, McManus DP, Schantz PM, Craig PS, Ito A. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. Parasitology. 2007 May;134(Pt 5):713-22.
- Nisbet AJ, McNeilly TN, Wildblood LA, Morrison AA, Bartley DJ, Bartley Y, Longhi C, McKendrick IJ, Palarea-Albaladejo J, Matthews JB. Successful immunization against a

parasitic nematode by vaccination with recombinant proteins. *Vaccine*. 2013 Aug 20;31(37):4017-23.

Oliveira CR, Rezende CM, Silva MR, Borges OM, Pêgo AP, Goes AM. Oral vaccination based on DNA-chitosan nanoparticles against *Schistosoma mansoni* infection. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:938457.

Osman A, Wang CK, Winter A, Loukas A, Tribolet L, Gasser RB, Hofmann A. Hookworm SCP/TAPS protein structure--A key to understanding host-parasite interactions and developing new interventions. *Biotechnol Adv*. 2012 May-Jun;30(3):652-7.

Otero-Abad B, Torgerson PR. A systematic review of the epidemiology of echinococcosis in domestic and wild animals. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013 Jun 6;7(6):e2249.

P. Economides, E.J. Larrieu and D. Orlando Evolution of programmes for control of *Echinococcus granulosus*(examples). WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern. Paris' World Organisation for Animal Health; 2001. p. 224–29.

Pandey SK, Patel DK, Thakur R, Mishra DP, Maiti P, Haldar C. Anti-cancer evaluation of quercetin embedded PLA nanoparticles synthesized by emulsified nanoprecipitation. *Int J Biol Macromol*. 2015 Apr;75:521-9.

Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003 Feb 24;55(3):329-47.

Park K, Chan Kwom I, Park K. Oral protein delivery: Current status and future prospect. *Reactive and Funtional Poymers*. 2011 71: 280-287.

Petavy AF, Hormaeche C, Lahmar S, Ouhelli H, Chabalgoity A, Marchal T, Azzouz S, Schreiber F, Alvite G, Sarciron ME, Maskell D, Esteves A, Bosquet G. An oral recombinant vaccine in dogs against *Echinococcus granulosus*, the causative agent of human hydatid disease: a pilot study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008 Jan 16;2(1)

Presnyak V, Alhusaini N, Chen YH, Martin S, Morris N, Kline N, Olson S, Weinberg D, Baker KE, Graveley BR, Collier J. Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. *Cell*. 2015 Mar 12;160(6):1111-24.

- Pusic K, Xu H, Stridiron A, Aguilar Z, Wang A, Hui G. Blood stage merozoite surface protein conjugated to nanoparticles induce potent parasite inhibitory antibodies. *Vaccine*. 2011 Nov 8;29(48):8898-908.
- Ramazzotti M, Brilli M, Fani R, Manao G, Degl'innocenti D. The CAI Analyser Package: inferring gene expressivity from raw genomic data. *In Silico Biol*. 2007;7(4-5):507-26.
- Roger E, Lagarce F, Benoit JP. The gastrointestinal stability of lipid nanocapsules. *Int J Pharm*. 2009 Sep 11;379(2):260-5.
- Romig T, Dinkel A, Mackenstedt U. The present situation of echinococcosis in Europe. *Parasitol Int*. 2006;55 Suppl:S187-91.
- Sakai-Kato K, Hidaka M, Un K, Kawanishi T, Okuda H. Physicochemical properties and in vitro intestinal permeability properties and intestinal cell toxicity of silica particles, performed in simulated gastrointestinal fluids. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Mar;1840(3):1171-80.
- Santos DM, Carneiro MW, de Moura TR, Fukutani K, Clarencio J, Soto M, Espuelas S, Brodskyn C, Barral A, Barral-Netto M, de Oliveira CI. Towards development of novel immunization strategies against leishmaniasis using PLGA nanoparticles loaded with kinetoplastid membrane protein-11. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:2115-27.
- Sen L, Ghosh K, Bin Z, Qiang S, Thompson MG, Hawdon JM, Koski RA, Shuhua X, Hotez PJ. Hookworm burden reductions in BALB/c mice vaccinated with recombinant *Ancylostoma* secreted proteins (ASPs) from *Ancylostoma duodenale*, *Ancylostoma caninum* and *Necator americanus*. *Vaccine*. 2000 Jan 6;18(11-12):1096-102.
- Sharp PM, Li WH. The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res*. 1987 Feb 11;15(3):1281-95.
- Shikamoto Y, Suto K, Yamazaki Y, Morita T, Mizuno H. Crystal structure of a CRISP family Ca^{2+} -channel blocker derived from snake venom. *J Mol Biol*. 2005 Jul 22;350(4):735-43.
- Suzuki N, Yamazaki Y, Brown RL, Fujimoto Z, Morita T, Mizuno H. Structures of pseudochetoxin and pseudodecin, two snake-venom cysteine-rich secretory proteins that target cyclic nucleotide-gated ion channels: implications for movement of the C-terminal cysteine-rich domain. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2008 Oct;64(Pt 10):1034-42.

Szyperski T, Fernández C, Mumenthaler C, Wüthrich K. Structure comparison of human glioma pathogenesis-related protein GliPR and the plant pathogenesis-related protein P14a indicates a functional link between the human immune system and a plant defense system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 3;95(5):2262-6.

Taha MA, Singh SR, Dennis VA. Biodegradable PLGA85/15 nanoparticles as a delivery vehicle for *Chlamydia trachomatis* recombinant MOMP-187 peptide. *Nanotechnology*. 2012 Aug 17;23(32):325101.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*. 1997 Dec 15;25(24):4876-82.

Thompson RC, Jenkins DJ. *Echinococcus* as a model system: biology and epidemiology. *Int J Parasitol*. 2014 Oct 15;44(12):865-77.

Thompson RC, McManus DP. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol*. 2002 Oct;18(10):452-7.

Tudor JE, Pallaghy PK, Pennington MW, Norton RS. Solution structure of ShK toxin, a novel potassium channel inhibitor from a sea anemone. *Nat Struct Biol*. 1996 Apr;3(4):317-20.

Turner EL, Berberian DA, and Dennis EW. Successful artificial immunization of dogs against *Taenia echinococcus*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 1933; 30:618-619.

Tyagi AK, Nangpal P, Satchidanandam V. Development of vaccines against tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2011 Sep;91(5):469-78.

Vertzoni M, Dressman J, Butler J, Hempenstall J, Reppas C. Simulation of fasting gastric conditions and its importance for the in vivo dissolution of lipophilic compounds. *Eur J Pharm Biopharm*. 2005 Aug;60(3):413-7.

Vlaminck J, Borloo J, Vercruyssen J, Geldhof P, Claerebout E. Vaccination of calves against *Cooperia oncophora* with a double-domain activation-associated secreted protein reduces parasite egg output and pasture contamination. *Int J Parasitol*. 2015 Mar;45(4):209-13.

Wang J, Cieplak P, Kollman PA. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *J. Comp. Chem.* 2000 21: 1049-1047

Wang W, Chen S, Zhang L, Wu X, Wang J, Chen JF, Le Y. Poly(lactic acid)/chitosan hybrid nanoparticles for controlled release of anticancer drug. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2015 Jan;46:514-20.

WHO 2010. First WHO report on neglected tropical diseases. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases.

Xiao N, Qiu J, Nakao M, Li T, Yang W, Chen X, Schantz PM, Craig PS, Ito A. *Echinococcus shiquicus* n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China. *Int J Parasitol.* 2005 May;35(6):693-701.

Xiao S, Zhan B, Xue J, Goud GN, Loukas A, Liu Y, Williamson A, Liu S, Deumic V, Hotez P. The evaluation of recombinant hookworm antigens as vaccines in hamsters (*Mesocricetus auratus*) challenged with human hookworm, *Necator americanus*. *Exp Parasitol.* 2008 Jan;118(1):32-40.

Yamakawa H, Kamada H, Satoh M, Ohashi Y. Spermine is a salicylate-independent endogenous inducer for both tobacco acidic pathogenesis-related proteins and resistance against tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol.* 1998 Dec;118(4):1213-22.

Yun Y, Cho YW, Park K. Nanoparticles for oral delivery: targeted nanoparticles with peptidic ligands for oral protein delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013 Jun 15;65(6):822-32.

Zambaux MF, Bonneaux F, Gref R, Maincent P, Dellacherie E, Alonso MJ, Labrude P, Vigneron C. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. *J Control Release.* 1998 Jan 2;50(1-3):31-40.

Zetasizer NanoSerie User Manual. Malvern, Mano 48S, Issue 1.1 April 2013.

Zhang W, McManus DP. Vaccination of dogs against *Echinococcus granulosus*: a means to control hydatid disease? *Trends Parasitol.* 2008 Sep;24(9):419-24.

Zhang W, Zhang Z, Shi B, Li J, You H, Tulson G, Dang X, Song Y, Yimiti T, Wang J, Jones MK, McManus DP. Vaccination of dogs against *Echinococcus granulosus*, the cause of cystic hydatid disease in humans. *J Infect Dis*. 2006 Oct 1;194(7):966-74.

Zhao L, Seth A, Wibowo N, Zhao CX, Mitter N, Yu C, Middelberg AP. Nanoparticle vaccines. *Vaccine*. 2014 Jan 9;32(3):327-37.

Zheng H, Zhang W, Zhang L, Zhang Z, Li J, Lu G, Zhu Y, Wang Y, Huang Y, Liu J, Kang H, Chen J, Wang L, Chen A, Yu S, Gao Z, Jin L, Gu W, Wang Z, Zhao L, Shi B, Wen H, Lin R, Jones MK, Brejova B, Vinar T, Zhao G, McManus DP, Chen Z, Zhou Y, Wang S. The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. *Nat Genet*. 2013 Oct;45(10):1168-75.