



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



Univesidad de la República
Facultad de Ciencias - PEDECIBA Área Biología
Cátedra de Inmunología

GLICOPROTEÍNAS DE *ECHINOCOCCUS*
***GRANULOSUS*: IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS**
FUNCIONAL

Trabajo de Tesis para acceder al Título de Magister en
Ciencias Biológicas, orientación Biología Celular y Molecular
Lic. Marco Navatta

Orientadora: Dra. Sylvia Dematteis

Montevideo, 2017

Quiero dedicar este trabajo a mis padres, ellos son el pilar más importante en el cual sostengo el camino que estoy forjando y es gracias a ellos que hoy estoy donde estoy.

AGRADECIMIENTOS

Finalizar este trabajo significa un logro muy importante en lo personal y académico, habiéndome permitido no sólo formarme y crecer como profesional, sino también, llenándome de lindos recuerdos. Sin duda lo que me brindó ésta etapa, escapa a lo que pueda expresar aquí. Lo fundamental es que ésta etapa no podría haberla culminado de no ser por todo el apoyo y comprensión de mucha gente, que directa o indirectamente me fue guiando y acompañando en este camino.

En primer lugar, agradecer a Sylvia Dematteis, por brindarme la oportunidad de realizar la Maestría con ella, de formar parte del equipo de trabajo. Por confiar en mí, apoyarme y soportarme en cada paso de este camino, siempre brindándome valiosos consejos que siguen y seguirán vigentes. Muchas gracias por escucharme, por ser comprensiva, firme y a la vez cálida.

Quiero agradecer a todos en la “Casita de Adelante”, a los que están y estuvieron. Especialmente quiero agradecer a Gustavo Mourglia, por su enorme apoyo y colaboración siempre que lo necesité. Gracias por estar presente en cada paso durante mi estadía en “Inmuno”. Y muchas gracias por confiar en mí e introducirme en la inmunología, junto con Paula Arbildi en el práctico y Sylvia Dematteis en el trabajo experimental. A Verónica Fernández quiero agradecerle su apoyo en mi trabajo, su gran compañerismo y su paciencia. A Ana Hernández también por su comprensión, apoyo y compañerismo. Quiero agradecer a Agustina Irazusta por soportarme durante su trabajo conmigo, y a Claudio Rodríguez y Sebastián Miles por su apoyo aportando ideas cuando las técnicas no funcionaban de la forma esperada. A Cecilia Sónora, Paula Arbildi, Verónica López, Emilia Villamil muchas gracias por el apoyo.

También quiero agradecer a todos los integrantes de la Cátedra de Inmunología, por interesarse en mi trabajo, por su apoyo y su compañerismo. Especialmente a Martín Rossotti, Macarena Pérez, Cecilia Casaravilla, Noelia Silva, Diego Pérez, Ana Ferreira y Maite Folle por darme una mano en mi trabajo, siempre que lo necesité.

Agradezco al Dr. Alejandro Chabalgoity y a su equipo por permitirme realizar parte de mi trabajo en su laboratorio.

Gracias a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) y al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), por su apoyo económico.

Quisiera agradecer a los miembros del tribunal Dr. Carlos Carmona, Dra. María Moreno y Dra. Analía Rial por aceptar formar parte del mismo.

Finalmente, agradezco a todos mis amigos y familia por estar incondicionalmente y acompañarme siempre, y muy especialmente a mis padres, porque sin su apoyo nada de esto habría sido posible.

INDICE

Resumen	1
Introducción general	4
1.- Infecciones por parásitos helmintos	4
2.- <i>Echinococcus granulosus</i>	4
2.1.- Ciclo de vida de <i>E. granulosus</i>	7
2.2.- Echinococcosis Quística (EQ)	8
3.- Respuesta inmune frente a la infección secundaria por <i>E. granulosus</i>	9
3.1.- Respuesta inmune durante la etapa temprana de la infección secundaria experimental	10
3.2.- Respuesta inmune durante la etapa crónica de la infección secundaria experimental	12
4.- Antígenos parasitarios con potencial capacidad inmuno-moduladora	13
4.1.- Antígenos proteicos	13
4.2.- Glicoconjugados parasitarios	16
4.3.- Glicoconjugados de <i>E. granulosus</i>	19
Objetivo general	20
Capítulo 1 : Inmunogenicidad de una fracción de antígenos somáticos de protoscolecis de <i>E. granulosus</i> e identificación de sus componentes.	
Introducción	22
Objetivos específicos	22
Materiales y Métodos	23
1.- Animales	23
2.- Parásitos	23
3.- Antígenos parasitarios	23
3.1.- Antígenos somáticos de protoscolecis (PSA)	23
3.2.- Preparación de una fracción de PSA enriquecida en carbohidratos	24

3.2.1.- Obtención del AcMo E492/G1	24
3.2.2.- Detección de IgG3 específicas contra PSA por ELISA	25
3.2.3.- Preparación de la columna para cromatografía de afinidad	25
3.2.4.- Purificación de la fracción E4 ⁺	26
4.- Acoplamiento del AcMo E492/G1 a Biotina	26
5.- Obtención de células peritoneales	27
6.- Estudio de la unión de la fracción E4 ⁺ a células peritoneales de ratones	
Balb/c normales	27
7.- Inmunización de ratones Balb/c con la fracción E4 ⁺	28
8.- qRT-PCR para factores de transcripción y citoquinas	28
8.1.- Extracción de ARN	28
8.2.- Tratamiento con DNAsa	29
8.3.- RT	29
8.4.- Primers	29
8.5.- PCR	30
9.- Determinación de anticuerpos totales por ELISA	31
10.- Determinación por ELISA de la potencial unión de diferentes lectinas a	
componentes de PSA y de la fracción E4 ⁺	31
11.- Determinación de la especificidad de la unión de lectinas a componentes	
de PSA y de la fracción E4 ⁺ por ELISA de inhibición	32
12.- Electroforesis y Electro-transferencia	32
13.- Resolución por SDS-PAGE e identificación por espectrometría de masas	33
14.- Tinción con nitrato de plata	33
15.- Tratamiento de E4 ⁺ con endoglicosidasa PGNasa F	34
16.- Electroforesis bidimensional	34
17.- Electro-transferencia e immunoblotting	35
18.- Selección de spots e identificación por espectrometría de masas	35
19.- Análisis estadísticos	36
Resultados	37
1.- Preparación de E4 ⁺ y controles de calidad	37
2.- E4 ⁺ es una fracción molecularmente heterogénea	40
3.- Análisis de los efectos <i>in vivo</i> de la fracción E4 ⁺	40
3.1.- Los componentes de E4 ⁺ inducen <i>in vivo</i> un aumento en los	
niveles de expresión de IL-10 e IL-6 pero no de IFN γ	40
3.2.- E4 ⁺ induce una rápida reducción en los niveles de expresión	

de Pax-5	43
3.3.- E4 ⁺ es capaz de inducir <i>in vivo</i> un aumento significativo de Ac IgM totales a nivel local	43
4.- E4 ⁺ es capaz de interactuar con las lectinas ConA y WGA	45
5.- La lectina ConA se une a por lo menos tres componentes de E4 ⁺	46
6.- Identificación de los componentes de E4 ⁺ por MALDI/TOF/TOF	48
7.- Resolución de E4 ⁺ por electroforesis en dos dimensiones	49
8.- La proteína EgAxB18 contiene potenciales sitios de glicosilación	53
Discusión	55

Capítulo 2: Anexina B18 de *E. granulosus*: potenciales funciones biológicas

Introducción	65
Objetivos específicos	66
Materiales y Métodos	67
1.- Preparación de la Anexina B18 de <i>E. granulosus</i> recombinante	67
1.1.- Preparación del vector de expresión	67
1.2.- Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α competentes y electroporación	67
1.3.- Extracción de ADN plasmídico	67
1.4.- Electroforesis en geles de agarosa	68
1.5.- Transformación de <i>E. coli</i> BL21 [DE3]	68
1.6.- Expresión de la rEgAxB18	69
1.7.- Extracción y purificación de la rEgAxB18	69
1.8.- Control de la proteína recombinante rEgAxB18	70
2.- Inmunogenicidad de rEgAxB18	70
2.1.- Inmunización de ratones	70
2.2.- Inmunización de un conejo	70
2.3.- Determinación de anticuerpos específicos contra rEgAxB18 en suero de ratón o de conejo por ELISA	70
3.- Obtención de γ globulinas de conejo por precipitación con sulfato de amonio	71

4.- Obtención de los productos de excreción/secreción (E/S) de protoscolec es en cultivo	71
5.- Determinación de EgAxB18 en productos de E/S por SDS-PAGE e inmunoblotting	72
6.- Acoplamiento de la proteína recombinante a Isocianato de Fluoresceina	72
7.- Obtención de células peritoneales de ratones Balb/c normales	73
8.- Análisis de la unión de rEgAxB18 a células peritoneales normales por citometría de flujo	73
9.- Infección secundaria experimental de ratones Balb/c y C57Bl/6	73
10.- Detección por ELISA de anticuerpos séricos contra rEgAxB18	74
11.- Transferencia pasiva, desafío y evaluación del resultado de la infección de ratones Balb/c por <i>E. granulosus</i>	74
12.- Análisis Bio-informáticos	74
13.- Análisis estadístico	75
Resultados	76
1.- Obtención de la proteína recombinante y control por espectrometría de masas	76
2.- rEgAxB18 induce una respuesta de anticuerpos específica tanto en ratón como en conejo	78
3.- rEgAxB18 es capaz de unirse a células peritoneales de ratones Balb/c normales	78
4.- La Anexina B18 es un antígeno excretado/secretado por protoscolec es de <i>E. granulosus</i> en cultivo	81
5.- La Anexina B18 de <i>E. granulosus</i> no es secretada por las vías : clásica o no clásica	85
6.- La infección secundaria experimental induce en ratones de la cepa Balb/c, a diferencia de ratones C57Bl/6, una respuesta de anticuerpos capaz de reconocer a la Anexina B18 de <i>E. granulosus</i> recombinante	85
7.- La proteína EgAxB18 solo contiene potenciales epitopes T capaces de interaccionar con el haplotipo H2-IA d de ratones Balb/c	88
8.- Efecto de la transferencia pasiva de anticuerpos contra la rEgAxB18 sobre el resultado de la infección secundaria experimental	89
Discusión	90

Discusión final global	96
Perspectivas	98
Referencias bibliográficas	100

RESUMEN

La *echinococosis quística*, es una enfermedad crónica que afecta tanto a animales domésticos como al ser humano y es causada por el parásito helminto *Echinococcus granulosus*. Para estudiar la inter-relación de éste parásito con su hospedero, se ha empleado ampliamente el modelo murino de infección secundaria. Este modelo consiste en la inoculación de ratones con protoscolecemas vivos y se ha observado que la respuesta inmune del hospedero, tanto a nivel local como sistémica, son ineficientes en la eliminación del parásito ya que este logra establecerse y desarrollarse a quiste.

Algunos de los efectos disparados por el parásito *in vivo*, son parcialmente reproducidos *in vitro* por una fracción antigénica enriquecida en glicoconjugados (denominada E4⁺). Esta fracción es obtenida a partir de antígenos somáticos de protoscolecemas, por cromatografía de afinidad utilizando el AcMo E492/G1, que reconoce un epítopo glucídico presente en protoscolecemas de *E. granulosus*.

Dentro de las actividades biológicas reportadas sobre la fracción E4⁺, se destacan: a) la inducción *in vitro* de la secreción de niveles elevados de IL-10, por células mononucleares de sangre periférica (PBMC), de pacientes con *echinococosis quística* así como de donantes sanos; y b) la capacidad de unión a células B (CD19⁺) peritoneales normales de ratones Balb/c, y c) la inducción *in vitro* de la secreción de IL-10 y la diferenciación B hacia células productoras de anticuerpos.

En este trabajo de tesis, primero se estudió si la fracción E4⁺ podría ser capaz de inducir *in vivo*, similares efectos que aquellos observados *in vitro*. Para esto, ratones Balb/c normales fueron inoculados por vía ip con E4⁺. Los resultados mostraron que: a) en células peritoneales se produce (i) un aumento significativo en los niveles de expresión de IL-10 e IL-6, pero no de IFN γ ; (ii) una disminución rápida y significativa en el nivel de expresión del factor de transcripción Pax-5; y b) en exudado de cavidad peritoneal se detectó un aumento significativo en el título de IgM total. Estos resultados, bastante coincidentes con aquellos observados *in vitro*. Pero más importante aún, teniendo en cuenta los efectos disparados *in vivo* podría plantearse como hipótesis que los componentes E4⁺ podrían, al menos en parte, estar involucrados en mecanismos asociados con la modulación de la respuesta inmune del hospedero en favor de la sobrevivencia del parásito.

Por esta razón, en segundo término este trabajo estuvo centrado en la identificación, por lo menos parcial, del/los componente/s de E4⁺ que podrían estar relacionados a las actividades biológicas ya mencionadas. En este sentido, primero se analizó si diferentes lectinas (con y sin sus sacáridos inhibidores correspondientes), tenían la

capacidad de unión a componentes de la fracción E4⁺, y los resultados mostraron que de las lectinas seleccionadas la ConA y WGA interaccionan con componentes de E4⁺. Esto, junto con el hecho que el AcMo E492/G1 reconoce el trisacárido Gal α (1-4)Gal β (1-4)GlcNA, sugiere que por lo menos una de las estructuras glucídicas constitutivas de E4⁺ podrían ser N-glicanos.

Por otra parte, estudios por espectrometría de masas de los spots obtenidos cuando E4⁺ es resuelto por electroforesis bidimensional mostraron ser bien interesantes, ya que se identificó a la anexina B18 de *E. granulosus* (EgAxB18), como un antígeno constitutivo de la fracción E4⁺.

Existen varios reportes que sugieren que las anexinas de parásitos podrían estar relacionadas con la sobrevivencia del parásito, por lo tanto, el trabajo descrito en el segundo capítulo de esta tesis, se centró en la obtención de la EgAxB18 de forma recombinante (rEgAxB18), y en la realización de algunos estudios funcionales.

El análisis sobre la inmunogenicidad de esta proteína recombinante mostró que en ratones Balb/c es capaz de inducir una respuesta significativa de anticuerpos IgM e IgG específicas. Por otra parte, teniendo en cuenta que E4⁺ es capaz de unir células CD19⁺ peritoneales de ratones normales, utilizando la misma estrategia se observó que la rEgAxB18 es capaz de interaccionar con células B CD19⁺ peritoneales normales, en un porcentaje similar al observado con E4⁺.

Considerando, que se ha sugerido que las anexinas de parásitos podrían localizarse en la inter-fase hospedero-parásito cumpliendo diferentes funciones y que existen algunos reportes que muestran la presencia de anexinas de *E. granulosus* en productos de excreción/secreción de protoscolecemas en cultivo. Por lo tanto, en este trabajo se analizó si la EgAxB18 podría ser un constituyente de los productos excreción/secreción. Los resultados demuestran que dicha anexina es excretada/secretada por protoscolecemas en cultivo. Sin embargo, en este trabajo no se pudo determinar, mediante el uso de herramientas bio-informáticas, cual es la vía por la cual esta proteína es secretada.

Finalmente, teniendo en cuenta fue reportado que las cepas de ratones Balb/c y C57Bl/6 muestran diferente susceptibilidad a la infección secundaria por *E. granulosus*, se analizó si los anticuerpos séricos de estas dos cepas de ratones

infectados, eran capaces de reconocer a la rEgAxB18. Así, la cepa más susceptible a la infección (Balb/c), a diferencia de la cepa C57Bl/6, muestra una respuesta significativamente mayor de IgM e IgG contra la anexina B18 recombinante, comparada con aquella del grupo control. Esta diferencia podría ser consistente con resultados obtenidos mediante el uso de predictores bio-informáticos, que indican que sólo el haplotipo H2-IA_d (Balb/c), tienen afinidad por péptidos de la EgAxB18.

En resumen, en este trabajo se demostró que la fracción E4⁺ induce *in vivo* similares efectos que aquellos inducido *in vitro*. Además, se identificó la EgAxB18 como un componente constitutivo de la fracción E4⁺, y se demostró que, por lo menos en cultivo, es una molécula excretada/secretada por el parásito.

La relevancia de estos hallazgos en la interacción hospedero experimental-*E. granulosus* debería ser estudiada con más profundidad.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.- Infecciones por parásitos helmintos.

Los parásitos helmintos comprenden un grupo diverso de organismos metazoarios, clasificados principalmente: nematodos, trematodos y cestodos (Macdonald *et al.*, 2002; Hotez *et al.*, 2008).

En la actualidad se reconocen más de 20 especies de helmintos parásitos capaces de afectar directamente al ser humano, la mayoría de los cuales generan infecciones inicialmente leves o asintomáticas. Se cree que esta ausencia de signos clínicos se debe a cierto nivel de "armonía" entre los parásitos y sus hospederos, posiblemente alcanzada por una larga co-adaptación evolutiva. Esta co-adaptación beneficiaría a ambos, a los helmintos asegurando su sobrevivencia y al hospedero evitando que la respuesta inmune que genera dañe sus propios tejidos. Actualmente se postula que en la mayoría de los individuos infectados por parásitos helmintos, su sistema inmune se encuentra en "equilibrio" con el invasor, mientras que solo en una proporción pequeña de casos este equilibrio no se alcanza (o se desgasta por otros factores), y es a raíz de esto que se generan las manifestaciones clínicas asociadas a las helmintiasis (Wiria *et al.*, 2012).

En su conjunto, estas hipótesis soportarían una de las características más sobresalientes de los helmintos, su cronicidad. Este hecho implica que estos parásitos podrían haber desarrollado estrategias de evasión, supresión y/o modulación de la respuesta inmune del hospedero, permitiéndoles así sobrevivir durante períodos de tiempo prolongados (Everts *et al.*, 2010). La identificación de los potenciales mecanismos que posean helmintos para evadir y/o modular la respuesta inmune del hospedero, continúa siendo un punto de difícil abordaje dado que, estos parásitos son organismos complejos y tienen complejos ciclos de vida.

2.- *Echinococcus granulosus*

Las echinococcosis, tanto alveolar, quística, como poliquística, son un grupo de zoonosis causadas por parásitos cestodos del género *Echinococcus* (Moro & Schantz, 2009). A pesar de los avances en las estrategias de control, gestión clínica y el desarrollo de algunas vacunas, estas enfermedades siguen creciendo en todo el mundo, causando aún hoy en día importantes impactos económicos y de salud pública

(Thompson & Jenkins, 2014). Particularmente, la echinococcosis quística (EQ), cuyo agente etiológico causal es el estadio larval de *E. granulosus*, ha causado pérdidas anuales estimadas por encima de 2 billones de dólares americanos en la industria ganadera (Budke *et al.*, 2006), así como pérdidas mundiales anuales estimadas entre 1 y 3 millones de DALYs (del inglés *disability-adjusted life years*) [Revisado por Cucher, 2016]. Estas pérdidas, en parte se relacionan con el hecho que la EQ es una zoonosis de distribución cosmopolita y de amplia distribución mundial (Figura 1). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) es una zoonosis endémica en áreas del Este de Europa, Rusia, Medio Oriente, China y América del Sur (Pakala *et al.*, 2016; WHO, 2013). Incluso el cono sur de América del Sur se considera una región hiper-endémica, siendo afectadas principalmente las zonas montañosas de Perú y Bolivia, el sur de Brasil, Chile, Argentina y Uruguay (Cucher *et al.*, 2016).

A nivel taxonómico, existen varias “cepas fisiológicas” de *E. granulosus*, descritas inicialmente por Smyth & Davies en 1974, y ampliadas desde entonces en base a diferentes criterios fisiológicos, bioquímicos y anatómicos, entre otros (Cucher *et al.*, 2016; Thompson, 2008). Posteriormente, en base a técnicas de biología molecular, se correlacionaron las mencionadas cepas con polimorfismos en el ADN mitocondrial, designándoles a cada una un genotipo. En ese sentido, se han descrito hasta el momento 10 genotipos (G1-G10), más la “cepa león” (hallada exclusivamente en hospederos salvajes) (McManus, 2013). En la actualidad, mediante análisis filogenéticos mitocondriales estos genotipos se han re-clasificado dentro de nuevas especies. Por tanto, la actual clasificación conforma el complejo *E. granulosus sensu lato* (s.l.), dividido en las siguientes especies: *Echinococcus granulosus sensu stricto* (s.s.) (agrupa los genotipos G1, G2 y G3), *Echinococcus equinus* (genotipo G4), *Echinococcus ortleppi* (genotipo G5), *Echinococcus canadensis* (genotipos G6, G7, G8 y G10), y *Echinococcus felidis* (“cepa león”). La especie *E. granulosus* s.s. (particularmente el genotipo G1) es la que presenta mayor distribución a nivel mundial, siendo a su vez junto con *E. ortleppi* las dos especies reportadas en el ganado bovino en Uruguay (Cucher *et al.*, 2016).

Distribución de *Echinococcus granulosus* y la echinococcosis quística

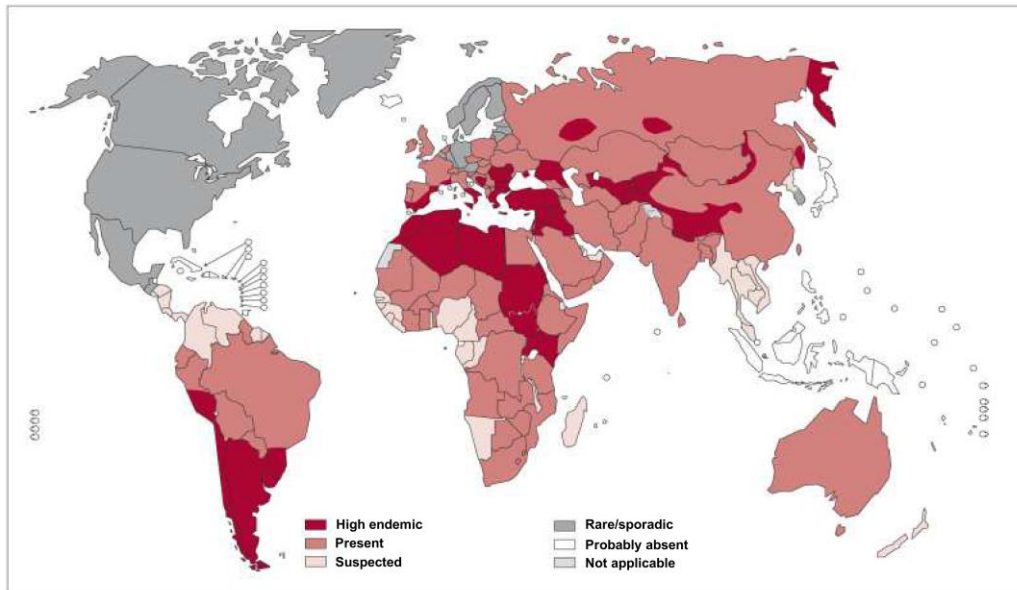


Figura 1.- Distribución global del *Echinococcus granulosus* y la echinococcosis quística. Se indican con los colores rojo, rosado fuerte y rosado pálido, las zonas de alta prevalencia (altamente endémica), zonas donde está presente, y donde se sospecha su presencia, respectivamente. En colores de gris oscuro, blanco y gris claro en donde es esporádica la presencia del *E. granulosus*, probablemente ausente, o no aplica, respectivamente.

(Tomado de *Second World Health Organization report on neglected tropical diseases*: http://www.who.int/neglected_diseases/2012report/en/).

2.1.- Ciclo de vida de *E. granulosus*

El ciclo de vida de *E. granulosus* requiere de dos hospederos para completar su ciclo: un hospedero definitivo, el cual siempre es un carnívoro (cánidos como perros, zorros, entre otros), y un hospedero intermediario (ungulados tanto domésticos como salvajes) (Figura 2). El hospedero definitivo se infecta por ingestión de protoscolec (PSC) provenientes de quistes hidáticos fértiles, los cuales una vez ingeridos pueden desarrollarse en el gusano adulto a nivel del intestino delgado. El gusano adulto es capaz de producir huevos conteniendo oncósferas (embrión) mediante reproducción sexual. Los huevos son expulsados junto con las heces del hospedero definitivo, siendo capaces de sobrevivir en el ambiente por períodos variables hasta ser ingeridos por un hospedero intermediario (Thompson, 1995). Una vez que esto ocurre, las oncósferas se activan en el intestino delgado y producen secreciones líticas que facilitan su pasaje a través de la mucosa intestinal hacia el sistema circulatorio del hospedero (venoso y linfático). Desde allí se distribuyen hacia los distintos órganos, principalmente hígado y/o pulmones, donde cada oncósfera es capaz de desarrollarse en un quiste (Cucher *et al.*, 2016; Siracusano *et al.*, 2009).

Desde un punto de vista estructural, la pared del quiste se puede diferenciar en dos capas: la externa o laminar, y la interna o membrana germinativa. La capa laminar, es acelular, de estructura laminada y principalmente formada por mucopolisacáridos. Por otra parte, la membrana germinativa está constituida por epitelio nucleado, el cual a su vez, es capaz de proliferar y originar agregados de células que se vacuolizan y forman las denominadas vesículas prolíferas. Es en estas últimas en donde se desarrollan por gemación (multiplicación asexual) el siguiente estadio larval del parásito, los protoscolec. Estas vesículas, con el tiempo, se desprenden de la membrana germinativa y flotan en el interior del quiste (vesículas hijas); algunas se rompen y se liberan los PSC que se acumulan formando la denominada "arenilla hidática". El quiste hidático está envuelto por una capa adventicia formada por tejido conjuntivo del hospedero procedente de la reacción inflamatoria local (Siracusano *et al.*, 2009).

A estos quistes que pueden alojar varios miles de PSC, se los denomina quistes fértiles. A su vez, cada PSC tienen la capacidad de desarrollarse en el gusano adulto, como ya se mencionó al principio (Cucher *et al.*, 2016), o puede dar lugar a nuevos quistes, en caso de la rotura de un quiste fértil en un hospedero intermediario. A esto último se lo conoce como Echinococosis quística secundaria o infección secundaria (Cucher *et al.*, 2016; Thompson, 1995).

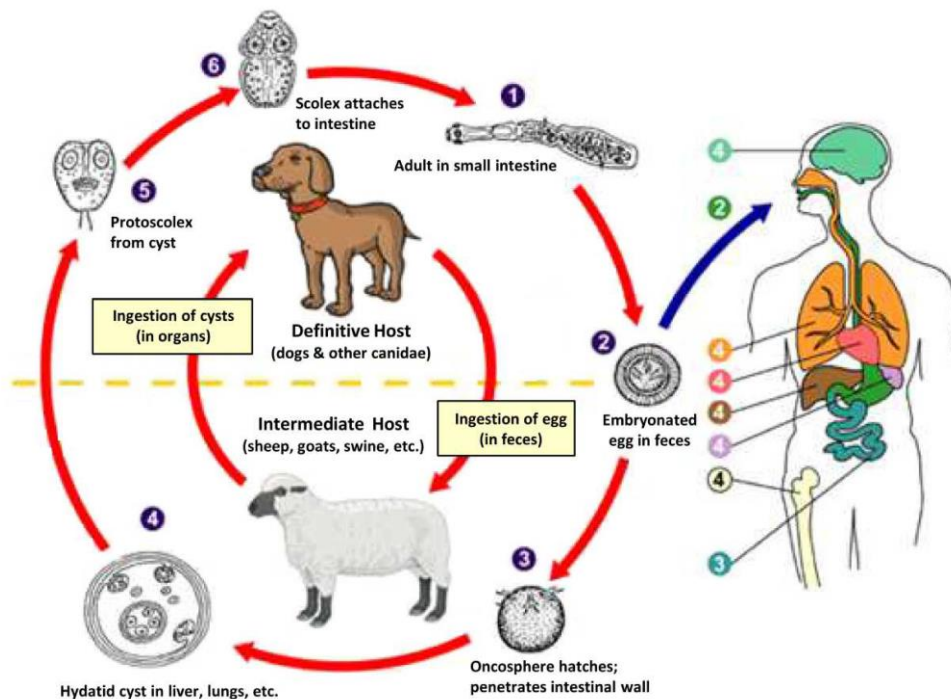


Figura 2.- Ciclo de vida de *Echinococcus granulosus*.

(1) Gusano adulto; (2) Huevo embrionado; (3) Oncósfera; (4) Quíste hidático; (5) Protoscólex; (6) Escólex adherido a la mucosa intestinal.

(Tomado del sitio oficial del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades del gobierno de los Estados Unidos: <http://www.cdc.gov/dpdx/echinococcosis/>).

2.2.- Equinococosis Quística (EQ)

La equinococosis quística (o hidatidosis) es una enfermedad crónica y compleja que afecta tanto a animales domésticos, como al humano. Este último es considerado un hospedero accidental, ya que no forma parte del ciclo de vida del parásito. Una vez infectado el individuo, los quistes pueden desarrollarse en varios órganos, siendo los principales el hígado y el pulmón. El crecimiento del metacestodo en humanos es lento (de 1 a 5 cm por año), llegando en algunos casos (ej: en hígado) a 20 cm de diámetro (Thompson, 1995). Los quistes jóvenes suelen desarrollarse de forma unilocular, esférica y turgente (esto último por contenido de líquido hidático), y con el tiempo se pueden formar septos internos y "quistes hijos" que perturban el patrón

unilocular típico inicial (Díaz *et al.*, 2011). En su desarrollo pueden comprimir estructuras adyacentes, fisurarse, romperse o infectarse. Como se mencionó anteriormente, la rotura de un quiste fértil, produce la siembra interna de PSC, y la formación de nuevos quistes (infección secundaria) (Thompson, 1995).

3.- Respuesta inmune frente a la infección secundaria por *E. granulosus*.

En forma similar a lo que ocurre con otras infecciones por cestodos, la EQ desencadena en el hospedero intermedio respuestas inmunes que generalmente se asume no se asocian con inmunidad protectora. Por lo tanto, se podría postular que el parásito podría ser capaz de evadir y/o modular activamente la respuesta del hospedero en favor de su sobrevivencia a través de mecanismos complejos poco conocidos aún.

En este sentido, se han propuesto algunos mecanismos basados en estudios realizados en el modelo experimental de infección secundaria, empleando para ello ratones de laboratorio como modelos biológicos. Así, múltiples cepas de ratones y distintos estadios parasitarios (además de diversas vías de inoculación) han sido utilizados como modelo de infecciones experimentales (Baz *et al.*, 1995; Baz *et al.*, 2006; Casado *et al.*, 2001; Cucher *et al.*, 2013; Hernández & Nieto, 1994; Pennoit-De Cooman *et al.*, 1974; Siles-Lucas & Hemphill, 2002; Urrea-París *et al.*, 2001). Este modelo, no solo se ha utilizado para el análisis de aspectos básicos de la inmunobiología de la infección (Baz *et al.*, 2006; Cucher *et al.*, 2013; Dematteis *et al.*, 1999, Dematteis *et al.*, 2003; Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011a), sino también para estudios de potenciales candidatos vacunales (Hashemitabar *et al.*, 2005; Hernández & Nieto, 1994), análisis de nuevos agentes quimioterapéuticos (Breijo *et al.*, 2011; Ceballos *et al.*, 2010), así como de herramientas de diagnóstico y/o seguimiento (Denegri *et al.*, 1995; Ferragut *et al.*, 1998; Mamuti *et al.*, 2002).

El modelo de infección secundaria experimental con *E. granulosus* consiste en la inoculación de PSC viables a ratones por vía intraperitoneal (i.p.) (Heath, 1970). Esto se basa en la capacidad de los PSC de generar quistes en un individuo inmunocompetente.

Como modelo experimental se ha empleado principalmente la cepa de ratones Balb/c. Temporalmente, la infección experimental puede dividirse en dos etapas: una etapa temprana (aproximadamente hasta el día 20-30 p.i.) durante la cual se da el

establecimiento de la infección (los PSC se diferencian a quiste), seguida de una etapa tardía o crónica, en la cual el quiste aumenta de tamaño y eventualmente se vuelve un quiste fértil (Richards *et al.*, 1983). En ambas etapas el hospedero produce una respuesta inmune humoral y celular, pero en ninguno de los dos casos logra eliminar la infección. Esto sugiere, una vez más, que en ambos estadios el parásito utiliza mecanismo de evasión/modulación del sistema inmune (Baz *et al.*, 2006).

3.1.- Respuesta inmune durante la etapa temprana de la infección secundaria experimental.

La respuesta inmune frente a la infección por *E. granulosus* (al igual que en la mayoría de los helmintos) se caracteriza por ser una respuesta polarizada hacia un perfil de citoquinas del tipo Th2. Se ha reportado que células de bazo de ratones infectados durante la etapa temprana, secretan IL-10, IL-4, IL-5 pero no niveles significativos de IFN γ (Dematteis *et al.*, 1999). En relación a esto, recientemente se ha reportado que en ratones Balb/c infectados existe una cinética bifásica en la expresión temprana de citoquinas a nivel local, es decir, en células peritoneales. Esta cinética se caracteriza por una inducción inicial de citoquinas de tipo Th1 (IFN- γ , IL-2 e IL-15), seguida de un cambio hacia un perfil de tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13) aproximadamente al día 5 post-infección. Interesantemente, en ratones Balb/c infectados se ha observado un aumento a nivel local de la expresión de IL-10 entre el primer y tercer día post-infección y se ha mantenido por al menos nueve días (Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011a; Mourglia-Ettlin *et al.*, 2016a). La expresión de citoquinas inmunoreguladoras como la IL-10 se ha visto ampliamente asociada a la susceptibilidad del hospedero a varias infecciones por helmintos (Redpath *et al.*, 2014), entre las cuales se encuentra la echinococosis tanto quística como alveolar (Baz *et al.*, 2006; Vuitton, 2003).

Sin embargo el perfil de citoquinas es dependiente de la cepa de ratón utilizada como modelo de infección experimental. En ese sentido, Mourglia-Ettlin *et al.*, (2016a) observaron que durante los primeros días de infección, ratones de la cepa C57Bl/6 presenta un perfil de citoquinas diferente tanto a nivel cinético como en intensidad con respecto a ratones de la cepa Balb/c, especialmente la IL-10 muestra una cinética opuesta a Balb/c al no variar a lo largo de los primeros 7 días p.i.

Es importante destacar que Mourglia-Ettlin *et al.*, (2016b), mostraron que las cepas Balb/c y C57Bl/6 presentan diferente susceptibilidad a la infección por *E. granulosus*. Los autores demuestran que la cepa Balb/c presentó un número de quistes tres veces

mayor (en término de medianas) que la cepa C57Bl/6. Aun así, en la cepa más susceptible, menos del 10% de los PSC inoculados logran establecerse, por lo que resulta claro que la respuesta del hospedero no es completamente eficiente en impedir el establecimiento de la infección, al menos en esta cepa de ratones (Tamarozzi *et al.*, 2016). En este sentido, existen evidencias que sugieren que mecanismos asociados con el IFN γ podrían ser relevantes en la eliminación de un número importante de PSC. Dematteis *et al.*, (2003) han reportado que células peritoneales adherentes de ratones Balb/c normales activadas con IFN γ o IFN γ /LPS muestran *in vitro* actividad protoscolicida. Por otra parte, ratones transfectados con los genes de IFN γ e IL-12 muestran una disminución en la carga parasitaria a las 22 semanas de infección (Al-Qaoud & Abdel-Hafez, 2008). En el caso de la cepa C57Bl/6, resultados de Mourglia-Ettlin *et al.*, (2016a) muestran un aumento del IFN γ desde el primer día p.i., mientras que la IL-12 disminuye recién al día 7 p.i. y TNF α se expresa fuertemente el día 1 p.i. Esa cinética es bien diferente a la observada para la cepa Balb/c (Mourglia-Ettlin *et al.*, 2016a). En suma, estos resultados apoyarían la hipótesis que el IFN- γ (una de las citoquinas importantes en la inducción de respuestas de tipo Th1) podría tener un papel central en la eliminación del parásito, y por lo tanto, el desarrollo temprano de una respuesta de citoquinas hacia un perfil tipo Th2 podría interpretarse como un mecanismo modulado y/o inducido activamente por el parásito en beneficio de su sobrevivencia.

En relación a la respuesta de anticuerpos durante la etapa temprana de la infección secundaria, se ha reportado que ratones Balb/c en la semana 1 p.i. producen anticuerpos IgM e IgG específicos contra PSA a nivel sistémico (Dematteis *et al.*, 1999) y que dichas respuestas inducidas tempranamente serían principalmente contra epítopes glucídicos (Baz *et al.*, 1999, Baz *et al.*, 2008). Más recientemente, nuestro grupo reportó que al día 5 p.i., en exudados de cavidad peritoneal de ratones Balb/c se produce un aumento significativo de IgM e IgG2b específicas contra PSA, lo cual estaría asociado con un activo proceso molecular de diferenciación de los linfocitos B en células productoras de anticuerpos (ASC) (Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011a). Esta respuesta específica de anticuerpos inducida tempranamente podría ser relevante en el establecimiento de la infección, ya que (al menos *in vitro*) los PSC son altamente sensibles a la activación del sistema del complemento por vía clásica (Ferreira *et al.*, 1992). Además, resultados recientes de Mourglia-Ettlin *et al.*, (2016a) sugieren que el mecanismo de citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC) podría ser relevante en una respuesta inmune contra protoscoleces de *E. granulosus*, así como lo es para varios helmintos (Harris & Gause, 2011; Moreau & Chauvin, 2010). Los resultados de

Mourglia-Ettlin *et al.*, (2016a) mostraron que las células peritoneales normales (tanto de Balb/c como C57Bl/6) incubadas con suero de ratón normal (de la cepa correspondiente) presentan actividad protoscolicida, lo cual sugiere un rol de los anticuerpos naturales en mecanismos ADCC debido a una posible reactividad cruzada con antígenos de PSC. En el mismo trabajo los autores reportan, que células peritoneales normales de C57Bl/6 incubadas con suero de ratón con 5 días de infección, mostraron un efecto protoscolicida mayor aún (a diferencia de Balb/c). Esto podría sugerir una respuesta muy temprana de anticuerpos en la cepa C57Bl/6, con capacidad de potenciar el mecanismo ADCC.

3.2.- Respuesta inmune durante la etapa crónica de la infección experimental.

La etapa crónica, es aquella en la cual los quistes ya se han desarrollado y se encuentran en etapa de crecimiento, con la eventual posibilidad de transformarse en quistes fértiles (Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011a). En este contexto, uno de los primeros trabajos en estudiar el papel de la respuesta de citoquinas en la etapa crónica de la infección experimental fue de Haralabidis *et al.*, en 1995. Estos autores muestran la existencia de citoquinas del tipo Th1 y Th2 en suero de ratones Balb/c inoculados con vesículas prolíferas (análisis realizado desde 3 hasta 18 meses p.i.). Por otra parte, estudios de Rogan (1998), han señalado la producción predominante de IL-10 e IL-4, con niveles reducidos de IFN- γ , por células de bazo ratones Balb/c con infección crónica estimuladas *in vitro* con ConA. Además, reportó que las células que rodean el quiste en estos animales producían predominantemente IL-10 al ser estimuladas *in vitro* (Rogan, 1998). Por otro lado, el análisis del perfil de citoquinas en ratones implantados quirúrgicamente con quistes hidáticos viables de ratón, mostró que cuatro meses post-implantación las células de bazo y las células periparasíticas de aquellos animales con quistes inviables producían niveles significativamente elevados de IFN γ , mientras que en los ratones con quistes aún viables la producción de IFN γ era muy reducida (Rogan, 1998). El autor sugiere que las respuestas de citoquinas de tipo Th2 serían inducidas por el parásito de forma tal, de inhibir la producción de citoquinas de tipo Th1 potencialmente perjudiciales para el mismo.

En cuanto a la respuesta de anticuerpos durante la etapa crónica de la infección, se ha reportado que existen variaciones cuantitativas y cualitativas en la producción de anticuerpos en forma dependiente del estadio específico del parásito (Araj *et al.*, 1977; Haralabidis *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1992). Asimismo, se ha mostrado que la respuesta de anticuerpos, de muy baja afinidad, contra líquido hidático durante la fase crónica, está dirigida principalmente contra epítopes glucídicos (Ferragut & Nieto, 1996).

Además, se reportó que la relación entre los títulos de IgG1 e IgG3 específicas (IgG1/IgG3) contra antígenos somáticos de PSC (PSA), así como la avididad de los anticuerpos IgG3 específicos, decrece a lo largo del tiempo, al igual que el reconocimiento de epítopes peptídicos (Severi *et al.*, 1997).

4.- Antígenos parasitarios con potencial capacidad inmuno-moduladora.

4.1.- Antígenos proteicos

La habilidad de las infecciones parasitarias de regular la respuesta inmune del hospedero es un fenómeno que ha sido observado por décadas, dando lugar a infecciones crónicas de muy larga duración. En parásitos nematodos se han reportado algunos ejemplos interesantes, como por ejemplo la proteína *Bm-CPI-2* (*cysteine protease inhibitor-2*) de *Brugia malayi* capaz de inhibir directamente la proliferación de linfocitos T e inducir en macrófagos de ratón la producción de IL-10 (Maizels *et al.*, 2001). En el caso de *Haemonchus contortus* la Calreticulina (CalR) es capaz de unirse a la proteína C reactiva (PCR), disminuyendo su concentración en el entorno y por tanto limitando su funciones, como podría ser su capacidad de activar la vía clásica del complemento (Suchitra *et al.*, 2008). En cuanto a los parásitos helmintos, también se han reportado algunas proteínas asociadas con la modulación del sistema inmune del hospedero. En el parásito *Schistosoma japonicum*, se han observado proteínas en el tegumento que son capaces de unir la región Fc de las inmunoglobulinas del hospedero. De esta forma, mediante un mecanismo que implicaría el enmascaramiento de la superficie del parásito con proteínas del hospedero, este parásito lograría impedir su reconocimiento por el sistema inmune.

Son varias las proteínas con la capacidad de unir la región Fc de las inmunoglobulinas tanto humanas como de animales domésticos, entre las cuales se encuentran la C1qBP (proteína de unión a C1q) y algunos integrantes de la superfamilia de las anexinas (Wu *et al.*, 2015).

Las anexinas son una gran familia de proteínas ampliamente distribuidas entre los organismos eucariotas, presentando a su vez una gran diversidad de propiedades bioquímicas y funciones biológicas. En la *50th Harden Conference* (Primer Conferencia Internacional de Anexinas, *WyeCollege*, UK, 1999), se planteó el uso del sistema de clasificación de las anexinas propuesto por Fernández & Morgan (2003), basado en la integración de análisis filogenéticos con los vínculos y organización de

los genes. En base a estos análisis se delinearon cinco familias principales de anexinas, siendo: la familia de anexinas “A” (correspondiente a vertebrados, incluido el humano), la familia “B” (correspondiente a invertebrados, incluidos los helmintos), la familia “C” (hongos), la familia “D” (plantas) y la familia “E” (protistas) (Cantacessi *et al.*, 2013).

En relación a la estructura de las anexinas, se caracterizan por poseer un conservado dominio C terminal, formado usualmente por cuatro repeticiones (en algunos casos pueden ser más), cada una de aproximadamente 70 aminoácidos que conforman cinco hélices alfa (Moss & Morgan, 2004; Seaton & Dedman, 1998). A estos se los conoce como dominios del tipo anexina y corresponden a dominios de unión a fosfolípidos de forma calcio dependiente (Moss & Morgan, 2004). En contraposición, su extremo N terminal presenta una composición y largo variable en cada anexina, y por ello, se sugiere que podría ser el responsable de la diversidad de funciones que presentan (Flower & Perretti, 2015; Seaton & Dedman, 1998). Por ejemplo, se ha reportado que el extremo N terminal de varias anexinas son buenos sustratos para la fosforilación por *quinasas* (Seaton & Dedman, 1998).

Las funciones que poseen las anexinas son amplias, entre las cuales se incluye el metabolismo del calcio, adhesión celular, diferenciación y transporte subcelular, y reparación de membranas, entre otros. En parásitos, se cree están relacionadas con su supervivencia, desempeñando papeles en el mantenimiento de la integridad estructural de las células, el tegumento y por otra parte, modulando o evadiendo la respuesta inmune del hospedero (Cantacessi *et al.*, 2013; Leow *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2015). En lo que refiere a esto último, se ha reportado que, por ejemplo, las anexinas de *Schistosoma japonicum*, evadirían la respuesta inmune por mimetización (Wu *et al.*, 2015), y que la anexina B1 de *Taenia solium* presenta efectos pro-apoptóticos de eosinófilos humanos (Yan *et al.*, 2008). Además, se la ha localizado en líquido quístico, suero de cerdos infectados, y co-localizada con neutrófilos y eosinófilos en el sitio de interacción hospedero-parásito (Gao *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2008). Por tanto, su localización durante la infección y sus efectos sobre los eosinófilos sugieren que la anexina B1 de *Taenia solium*, podría ser secretada y estar relacionada con la sobrevivencia del parásito al regular negativamente la respuesta inmune del hospedero.

En relación a *E. granulosus*, se han reportado al menos 12 anexinas (<http://www.annexins.org/>). La Tabla 1 (A y B) corresponde a un árbol filogenético Bayesiano de consenso de las anexinas de la familia B, en donde se observa los clados en donde se agrupan las anexinas de *E. granulosus*. Incluso, algunas anexinas,

como la B18 y B38, se encuentran separadas de los clados de otras anexinas (Cantacessi *et al.*, 2013).

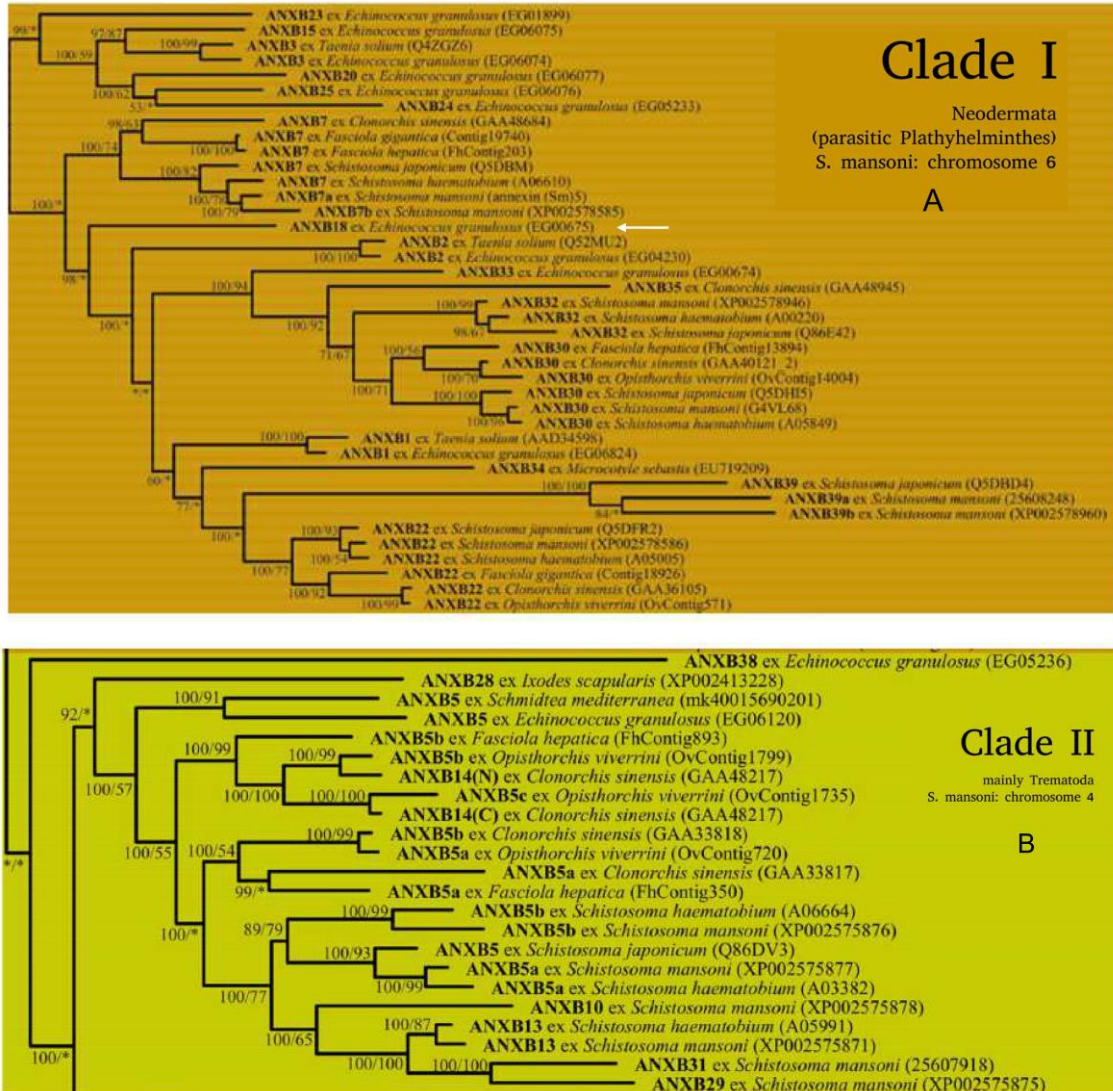


Tabla 1. (A y B). Árbol filogenético Bayesiano de consenso, en el cual se muestran las anexinas B de parásitos. El mismo está basado en el análisis por inferencia Bayesiana de las estructuras basadas en el alineamiento de las secuencias aminoacídicas. Las probabilidades posteriores y los valores máximos de probabilidad de *bootstrap* se muestran en los nodos, respectivamente. (Tomado de Cantacessi *et al.*, 2013).

Por otra parte, estudios de proteómica han determinado la presencia de anexinas en líquido hidático y productos de excreción / secreción (E/S) de protoscoleces cultivados *in vitro* (Aziz *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2016; Virginio *et al.*, 2012). En este sentido, Song *et al.*, (2016) determinaron mediante inmunofluorescencia la localización de la anexina B33 en distintos estadios de *E. granulosus*, estando presente: en tegumento y huevos del gusano adulto; en la capa germinal del quiste; y en el tegumento, corpúsculos calcareos, y a nivel celular en citosol y membrana celular del protoescólex. Además, observaron que ésta anexina se encuentra presente en células de la capa derivada del hospedero que rodea el quiste hidático, por lo cual los autores sugieren un posible rol en la interacción hospedero-parásito. Curiosamente, la anexina B33 al igual que otras anexinas y muchas otras proteínas determinadas en estudios de proteómica, son secretadas (tanto en *E. granulosus* como en otros parásitos) pese a que carecen de péptido señal (Brehm & Koziol, 2017; Lorenzatto *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2008). Algunos autores han sugerido distintos mecanismos posibles de secreción, como mecanismos “no clásicos”, disrupción de membranas, “*shedding*” del tegumento o daño del parásito (Brehm & Koziol, 2017; Lorenzatto *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2016). Estudios más recientes, han reportado la presencia de anexinas en vesículas extracelulares en *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *Taenia crassiceps* y *Mesocestoides corti* (Ancarola *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2017). Las vesículas extracelulares se han reportado en varias infecciones parasitarias, actuando tanto en la inter-comunicación entre parásitos, así como, en la interacción parásito – hospedero. Se ha sugerido que las vesículas extracelulares podrían constituir un mecanismo de exportación de proteínas en trematodos y que las mismas a su vez, podrían explicar la secreción, por parte de helmintos, de proteínas sin péptido señal para la secreción por vía clásica (Marcilla *et al.*, 2014).

4.2.- Glicoconjugados parasitarios.

Los glicoconjugados parasitarios son importantes tanto para el ciclo de vida del parásito, como para la patogenicidad del mismo, presentando una amplia variedad de actividades biológicas, entre las cuales se destacan: a) son inmunodominantes, b) inhibidores de la proliferación celular, c) mimetismo de componentes del hospedero y d) otros efectos inmunosupresores e inmunomoduladores (Harn *et al.*, 2009; van Die & Cummings, 2006, van Die & Cummings, 2010).

Empleando al ratón como modelo biológico, se ha estudiado la modulación de la respuesta inmune del hospedero en relación a varias parasitosis. Un ejemplo es la infección por *Leishmania spp.*, en la cual los glicoconjugados parasitarios, los lipofosfoglicanos y proteofosfoglicanos expresados por *Leishmania spp.* han mostrado ser capaces de inhibir la maduración del endosoma, permitiéndole así al parásito escapar de la destrucción lisosomal (Lodge & Descoteaux, 2005; Piani *et al.*, 1999). En forma similar a la infección por *Leishmania spp.*, las infecciones por helmintos, tanto en humanos como en el modelo murino, muestran fuertes efectos inmunomoduladores (Macdonald *et al.*, 2002; Pearce *et al.*, 2004). Por ejemplo, un importante aspecto de la glicobiología del *Schistosoma spp.*, es su capacidad de promover respuestas anti-inflamatorias y del tipo Th2, mediante interacción con células presentadoras de antígenos (Thomas & Harn, 2004). En estudios con *Schistosoma mansoni*, se ha observado una marcada regulación negativa de la respuesta tipo Th1 en ratones infectados, sugiriéndose un efecto supresor del IFN γ e IL-2 por antígenos de los huevos del parásito (Pearce *et al.*, 1991). Estudios posteriores demostraron que carbohidratos provenientes de antígenos solubles de huevo de *Schistosoma mansoni* (SEA) son capaces de polarizar la respuesta hacia un perfil del tipo Th2 (Okano *et al.*, 1999). En este trabajo, los antígenos solubles de huevo fueron previamente tratados con periodato de sodio (alterando la conformación molecular de los glúcidos) y luego inoculados a ratones normales para analizar *in vitro* la respuesta de citoquinas de células de ganglios linfáticos drenantes frente a una re-estimulación. Los resultados mostraron que el tratamiento con periodato suprime la capacidad de las células de producir citoquinas de tipo Th2 (IL-4 e IL-5 básicamente) (Okano *et al.*, 1999). En forma similar, Tawill *et al.*, (2004) observaron en nematodos tanto parásitos (*Brugia malayi*) como de vida libre (*Caenorhabditis elegans*) que la eliminación de los glicoconjugados de los extractos de nematodos elimina su capacidad de polarizar la respuesta hacia el perfil de tipo Th2. Estos estudios permiten sugerir que los helmintos emplearían glicoconjugados como agentes polarizantes de la respuesta de células T CD4⁺ hacia un perfil del tipo Th2.

En estudios posteriores, se describió la presencia de la estructura glucídica lacto-N-fucopentosa III (LNFPIII) como un componente de los antígenos de huevo de *S. mansoni* (Ko *et al.*, 1990). Dicha estructura posee la capacidad de inducir la proliferación de células B esplénicas de ratones infectados con *S. mansoni* y la consecuente producción de IL-10 y PGE2 (mediadores asociados con respuestas del tipo Th2) (Velupillai & Harn, 1994). Interesantemente, la capacidad polarizante presentada por LNFPIII parecería estar ligada a la presencia en su estructura del

determinante antigénico LewisX (trisacárido terminal), ya que los mismos ensayos en células B esplénicas realizados con su homólogo no fucosilado (lacto-N-neotetraosa) no muestran inducción de citoquinas del tipo Th2 (Velupillai & Harn, 1994). Además, estos autores mostraron que la población de células B1 peritoneales se expande en animales inoculados i.p. con antígenos de huevo soluble nativo, pero no sucede lo mismo al administrarse la forma deglicosilada de este extracto, sugiriéndose así que los glicoconjugados tendrían un papel en la expansión de las células B1 peritoneales (Velupillai *et al.*, 1997). En el mismo trabajo, los autores mostraron también que las células B1 secretan grandes cantidades de IL-10 *in vitro* en respuesta a estimulación por LNFPIII. Okano *et al.*, (2001) observaron que el LNFPIII no solo es un potente inductor de respuestas tipo Th2 *in vivo*, sino que además, es capaz de actuar como adyuvante induciendo una respuesta específica de anticuerpos (principalmente IgG1 e IgE) contra una proteína conjugada al LNFPIII. Por otra parte, Yang *et al.*, (2017) observaron que los glicanos altamente fucosilados inducen potentes respuestas de anticuerpos (IgM e IgG), en el modelo de infección de *Schistosoma* en monos, y sugieren un potencial efecto protector al asociar un alto título de IgGs a la resistencia a la re-infección.

Por otra parte, MacDonald *et al.*, (2001) analizaron los efectos de los antígenos solubles de huevo de *S. mansoni* (SEA) sobre las células dendríticas derivadas de médula ósea. Las mismas, al ser incubadas con SEA, inducen, en células de bazo estimuladas con SEA, una respuesta del tipo Th2. A su vez, Zacccone *et al.*, (2003) observaron en DCs derivadas de médula ósea de ratones NOD, que al ser cultivadas con SEA y LPS producen niveles reducidos de IL-12 y niveles mayores de IL-10, en relación a las cultivadas solo con LPS. Interesantemente, en nematodos también se ha observado efectos moduladores por glicoconjugados parasitarios sobre las DCs. A modo de ejemplo, Favoretto *et al.*, (2017) mostraron en *Ascaris suum* que glicoconjugados con N-glicosilaciones y ricos en manosa, serían capaces de inhibir la maduración de DCs estimuladas con LPS.

Por otra parte, Atochina *et al.*, (2001) analizaron los efectos que tienen los glicoconjugados presentes en SEA sobre los macrófagos, al inocular ratones normales con LNFPIII y midiendo luego los efectos de los macrófagos peritoneales sobre la proliferación de células T CD4⁺. Así, observaron que los macrófagos peritoneales de ratones inoculados con LNFPIII suprimían significativamente la proliferación inducida por ConA de células T CD4⁺ de ratones normales. Los autores sugieren que los

glicoconjugados de parásitos helmintos podrían estar relacionados en la maduración de los macrófagos peritoneales hacia un estadio supresor.

4.3.- Glicoconjugados de *E. granulosus*

En base a lo expuesto hasta el momento, se postula que el parásito helminto *E. granulosus* es capaz de modular/evadir la respuesta inmune del hospedero tanto durante el establecimiento de la infección, como durante la etapa crónica. Por esta razón, varios trabajos se han enfocado en la identificación de los antígenos que podrían estar involucrados en estos mecanismos. Como ya se mencionó, los helmintos generan fuertes respuestas polarizadas hacia un perfil Th2, y son los glicoconjugados los que podrían tener un rol importante en esta polarización. *E. granulosus* no es la excepción, y por lo tanto existen varios estudios centrados en los efectos inmunológicos producidos por los glicoconjugados de este parásito.

En el modelo de infección secundaria experimental por *E. granulosus* se ha descrito que los carbohidratos del parásito son altamente inmunogénicos, siendo incluso inmunodominantes los glúcidos presentes en la superficie del PSC (Míguez *et al.*, 1996). Esta inmuno-dominancia, fue luego demostrada en pacientes con *echinococcosis quística* (EQ) en los cuales se encontró una alta producción de anticuerpos IgG2 de baja avidéz contra carbohidratos parasitarios (Sterla *et al.*, 1999).

En relación a la antigenicidad y a una potencial actividad biológica que presentan los glicoconjugados de PSC, Baz *et al.*, (1999) utilizaron como estrategia, la obtención de una fracción enriquecida en carbohidratos (que denominaron fracción E4⁺), obtenida a partir de antígenos somáticos de PSC (PSA). Para esto, utilizaron un anticuerpo monoclonal que reconocía estructuras glucídicas presentes en PSC y que denominaron E492/G1. Este AcMo reconoce un trisacárido Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β (Baz *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2013), que está presente en el antígeno P1 y que está altamente representado en el tegumento de PSC, en la capa laminar del quiste, en el líquido hidático y en productos de excreción/secreción (Baz *et al.*, 1999, Baz *et al.*, 2006). La fracción E4⁺ ha mostrado poseer actividades biológicas muy interesantes: a) mostró tener actividad mitogénica sobre esplenocitos de ratones Balb/c normales; b) es reconocida por un alto porcentaje de los anticuerpos específicos producidos por ratones Balb/c depletados *in vivo* de células CD4⁺, inmunizados o infectados (Baz *et al.*, 1999); c) induce la producción de IgG2a, IgG2b e IgG3 en ratones C57Bl/6 CD4 *knock out* (Baz *et al.*, 2008) ; d) es inmunogénica en pacientes con EQ, en los cuales

la relación de anticuerpos específicos IgG2/IgG4 contra E4⁺ es mayor que aquella observada que contra antígenos somáticos de PSC (Cardozo *et al.*, 2002) e) células mononucleares de sangre periférica (PBMC), tanto de pacientes con EQ como de individuos sanos, secretan niveles elevados de IL-10 al ser estimuladas *in vitro* con la fracción E4⁺(Cardozo *et al.*, 2002) ; f) células de bazo y cavidad peritoneal de ratones con infección temprana por *E. granulosus*, re-estimuladas *in vitro* con la fracción E4⁺, mostraron una elevada secreción de IL-10 (Dematteis *et al.*, (2001); y g) interesantemente, la estimulación *in vitro* de células peritoneales de ratones Balb/c normales con la fracción E4⁺, también induce la secreción de IL-10 (Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011b).

Más aún, Mourglia-Ettlin *et al.* (2011b) determinaron que componentes de E4⁺ tiene la capacidad de unirse a células peritoneales normales CD19⁺ de ratones Balb/c normales y que esta interacción es capaz de disparar la secreción de IL-10 y la diferenciación de las células CD19⁺ en células productoras de anticuerpos (ASC).

Estos resultados en su conjunto, sugieren que componentes de la fracción E4⁺ podrían estar involucrados en la modulación de la respuesta inmune del hospedero, y por lo menos en parte, podrían ser responsables de la inducción temprana de IL-10 (tanto local como sistémica). De ser así, los componentes de E4⁺ podrían contribuir en el mantenimiento de la respuesta de citoquinas de tipo Th2, característica de los hospederos infectados por *E. granulosus*.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo consistió en identificar, por lo menos parcialmente, los componentes glicoproteicos presentes en una fracción antigénica de *Echinococcus granulosus* y analizar su potencial papel en la inter-relación hospedero experimental-parásito.

CAPITULO 1

**Inmunogenicidad de una fracción de
antígenos somáticos de protoscoleces de *E.*
granulosus e identificación de sus
componentes.**

INTRODUCCION

Como se describió anteriormente, la fracción E4⁺ de protoscolecemas de *E. granulosus* ha mostrado poseer actividades biológicas bien interesantes. Entre ellas: a) es reconocida por un alto porcentaje de los anticuerpos específicos producidos por ratones Balb/c depletados *in vivo* de células CD4⁺, tanto inmunizados como infectados (Baz *et al.*, 1999); b) es reconocida por anticuerpos de pacientes con EQ, en los cuales la relación de anticuerpos específicos IgG2/IgG4 contra E4⁺ es mayor que aquella observada que contra antígenos somáticos de PSC (Cardozo *et al.*, 2002); c) células mononucleares de sangre periférica (PBMC), tanto de pacientes con EQ como de individuos sanos, secretan niveles elevados de IL-10 al ser estimuladas *in vitro* con la fracción E4⁺ (Cardozo *et al.*, 2002); d) es capaz de inducir *in vitro* la secreción de IL-10 tanto por células de bazo, como por células peritoneales de ratones Balb/c infectados o de individuos normales (Dematteis *et al.*, 2001; Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011b); e) tiene la capacidad de unirse a células CD19⁺ peritoneales de ratones Balb/c normales y esta interacción es capaz de disparar: i) la secreción de IL-10; y ii) la diferenciación de células B en células productoras de anticuerpos (ASC) (Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011b).

Estos resultados en su conjunto, sugieren que componentes de esta fracción podrían estar involucrados, al menos en parte, en la modulación de la respuesta inmune del hospedero, y ser responsables de la inducción temprana de IL-10 (tanto local como sistémica). De ser así, resulta de especial interés identificar, aunque sea parcialmente, cual/es del/los componente/s de E4⁺ podría/n ser responsable/s de inducir estas actividades biológicas relevantes.

Objetivos específicos

- 1.- Analizar si la fracción E4⁺ es potencialmente capaz de inducir *in vivo* similares efectos a aquellos observados *in vitro* o disparados por el parásito vivo durante la fase temprana de la infección secundaria experimental.
- 2.- Identificar, por lo menos parcialmente, cual/es componente/s de E4⁺ podría/n estar asociado/s con las actividades biológicas inducidas por esta fracción.

MATERIALES & METODOS

1.- Animales

Se utilizaron ratones hembras Balb/c y C57Bl/6 normales de 6-8 semanas de edad. Los mismos se obtuvieron del Bioterio de Cría de la Dirección de Laboratorios Veterinarios “Dr. Miguel Rubino” (DI.LA.VE) del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (M.G.A.P.). Los animales fueron mantenidos en el Laboratorio Experimental de la Cátedra de Inmunología (Instituto de Higiene) en condiciones asépticas con ciclos luz/oscuridad y temperatura controlada, y alimentados con ración y agua *ad libitum*.

Por otra parte, se utilizó un conejo Neozelandés (3 meses de edad) obtenido en el Campo Experimental del Instituto de Higiene y mantenido en el Laboratorio de Experimentación de Conejos del Instituto de Higiene.

Todos los procedimientos realizados siguieron las Normas de Trabajo con Animales de Experimentación establecidas por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (C.H.E.A.) de la Universidad de la República. Protocolos Números: [101900-001065-11]; [101900-000160-12]; [101900-001413-15]; [101900-000662-12] y [101900-001480-14].

2.- Parásitos

Los protoscoleces de *E. granulosus* fueron obtenidos por punción aséptica de quistes hidáticos bovinos fértiles según Baz *et al.*, (1995). Los parásitos fueron lavados varias veces con buffer fosfato salino (PBS) pH 7.2 conteniendo gentamicina (40 µg/mL). La viabilidad de los parásitos se determinó por exclusión de eosina (Dematteis *et al.*, 2003) y actividad de células flamígeras (Gurri J., 1963). Únicamente fueron utilizados aquellos lotes con una viabilidad superior al 90%.

3.- Antígenos parasitarios.

3.1.- Antígenos somáticos de protoscolex (PSA).

Los antígenos somáticos de protoscoleces fueron obtenidos según Míguez *et al.*, (1996) con algunas modificaciones. Brevemente, siete mL de protoscoleces fueron disgregados por ultrasonido en 30 mL de PBS a 4°C, durante 15 min, con pulsos a

30% (3 segundos cada 10 segundos totales), y a potencia máxima (Omni-Ruptor 4.000, de OMNI International Inc). La fracción insoluble se separó mediante centrifugación a 12.000 r.p.m durante 15 min a temperatura ambiente. El sobrenadante (PSA) se conservó a -20°C hasta su uso.

3.2.- Preparación de una fracción de PSA enriquecida en carbohidratos (E4⁺).

3.2.1.- Obtención del anticuerpo monoclonal (AcMo) E492/G1.

La obtención del AcMo fue realizada según Baz *et al.* (1999). Brevemente, el hibridoma productor del AcMo E492/G1 se creció en RPMI completo (RPMI; 10% FCS inactivado por calor; 100 µg/mL estreptomina; 100 U/mL penicilina, 10 mM L-glutamina) a 37°C en atmósfera controlada con 5% de CO₂ hasta lograr un crecimiento confluyente. Las células fueron luego recuperadas por centrifugación a 1200 r.p.m. durante 7 min. La viabilidad de las mismas se determinó por exclusión con azul de Tripán (0,25%).

Posteriormente, ratones Balb/c normales fueron inoculados en el día 0 con 200 µL de Pristane (Sigma) por ratón, por vía intraperitoneal (ip). Luego de 10 días los animales fueron inoculados por vía ip con 5x10⁶ células viables del hibridoma. En el día 17, todos los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, previa anestesia, y el líquido ascítico generado en cada ratón fue mezclado y centrifugado a 1200 r.p.m. durante 7 min. Finalmente, el sobrenadante se conservó a -20°C.

El líquido ascítico fue deslipidificado utilizando sulfato de dextrano y CaCl₂ de acuerdo a Aceti *et al.* (1989). Brevemente, a un volumen de ascitis se le añadió 0,05xV de una solución acuosa de CaCl₂ 1 M y se agitó suavemente durante 10 min a temperatura ambiente. La mezcla obtenida se centrifugó a 1200 r.p.m. durante 20 min a 4°C.

Luego, la fracción γ globulina del líquido ascítico fue obtenida por precipitación con (NH₄)₂SO₄ 50% (Harlow & Lane, 1988). Brevemente, a un volumen de líquido ascítico deslipidificado se le agregó lentamente un volumen igual de solución saturada de sulfato de amonio, incubando la mezcla durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó la mezcla a 10.000 r.p.m. durante 20 min a 4°C y la fracción insoluble se lavó dos veces con (NH₄)₂SO₄ al 50%. Posteriormente, se resuspendió en el mínimo volumen de PBS y se dializó toda la noche contra PBS a 4°C con agitación constante.

A partir de la fracción γ globulina, los anticuerpos IgG (principalmente IgG3) fueron obtenidos por cromatografía de afinidad empleando como soporte sólido Proteína G.

Brevemente, la muestra fue diluida al medio con PBS pH 8 e incubada con la matriz durante 20 min. A continuación, la matriz fue lavada varias veces con PBS pH 8 y luego como eluyente fue utilizado ácido cítrico 0,1M a pH 3. El eluato fue recolectado de a 1 mL sobre 20 μ L de Buffer Tris 2M pH 11. Finalmente, el mismo fue dializado contra PBS durante 24 h, a 4 °C con agitación lenta. La concentración proteica se determinó por medida de la absorbancia a 280 nm (NanoDrop, Thermo Scientific).

3.2.2.- Detección de anticuerpos IgG3 específicos contra PSA por ELISA.

La detección de IgG3 de ratón específicas contra PSA fue realizada por ELISA de acuerdo a (Dematteis *et al.*, 2001). Muy brevemente, una placa de microtitulación de 96 pocillos (*Greiner*) fue sensibilizada con 10 μ g/mL/pocillos (en proteínas) de PSA en PBS, incubando durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Luego, los sitios activos libres fueron bloqueados con PBS-BSA 1%, incubando 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente, fueron dispensadas diferentes diluciones de la muestra (eluato obtenido anteriormente), incubando durante 1 h a 37°C en cámara húmeda. Luego, fue dispensada una dilución apropiada del conjugado enzimático (anti-IgG3 de ratón-PO) incubando durante 1 h y media a 37°C en cámara húmeda. Finalmente, fue dispensada una solución de H₂O₂ como sustrato y ortofenilendiamina (OPD) como cromógeno. La reacción fue detenida con H₂SO₄ 3M y la absorbancia a 492 nm fue medida en un lector para microplacas (Titertek Multiscan Plus, Low Laboratories, Helsinki, Finlandia).

3.2.3. Preparación de la columna para cromatografía de afinidad.

Las IgG de ratón purificadas utilizando Proteína G fueron inmovilizadas a una matriz de Sepharose 4B activada con BrCN (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, los anticuerpos fueron dializados contra buffer de acoplamiento (NaHCO₃ 0,1M pH 8,3 y NaCl 0,5M) y posteriormente diluidos al décimo en el mismo buffer. Luego, 2g de la matriz fueron hidratados, y empacados en una columna. La matriz fue luego lavada y equilibrada en buffer de acoplamiento. Posteriormente, la matriz fue incubada con la muestra de IgG con agitación suave durante 2 h a temperatura ambiente. A continuación, el buffer de bloqueo para los grupos activos remanentes (glicina 0,2 M pH 8,0) fue agregado, incubando durante 2 h a temperatura ambiente con agitación suave. Los anticuerpos que pudieran no haber quedado unidos covalentemente a la matriz fueron removidos por lavados con buffer

glicina 0,1 M pH 2.8 hasta alcanzar una absorbancia a 280 nm < 0,05 (NanoDrop, Thermo Scientific). Finalmente, la matriz fue lavada con PBS y conservada a 4°C en PBS con 0,02% de NaN₃.

3.2.4.- Purificación de la fracción E4⁺.

La fracción E4⁺ fue obtenida a partir de los antígenos solubles de protoescolex (PSA), mediante cromatografía de afinidad utilizando el AcMo E492/G1 acoplado Sepharose-CNBr, según Baz *et al.*, (1999). Muy brevemente, 1 mL de PSA fue sembrado e incubado durante 20 min a temperatura ambiente. A continuación, la fracción retenida (E4⁺) fue eluída con buffer glicina 0,1M pH 2.8 y el eluato (1 mL) fue recolectado sobre 20 µL de buffer Tris 2M pH 11. Luego, la fracción E4⁺ fue dializada contra agua destilada durante 24 h, a 4 °C con agitación suave. Finalmente, la fracción fue liofilizada (equipo Christ, modelo Alpha 1-4 LD Plus), y resuspendida en un mínimo volumen de PBS y finalmente fue filtrada a través de una membrana estéril de 0,22 µm. La fracción E4⁺ fue conservada a -20°C hasta su uso posterior.

El contenido en carbohidratos se determinó de acuerdo a White & Kennedy (1986) con algunas modificaciones. Brevemente, como estándar fueron utilizadas diferentes diluciones de Dextrano T-2000 (entre 25 y 800 µg/mL). Por otra parte, fue preparado el reactivo de Resorcinol (2 mg/mL) en ácido sulfúrico concentrado. Diferentes diluciones de la fracción E4⁺ en PBS fueron preparadas y luego dispensadas en una microplaca de 96 pocillos (Greiner). La mezcla (resorcinol más muestra o estándar) fue incubada durante 40 min a 80°C en cámara húmeda. Finalmente, luego de dejar enfriar, la absorbancia a 492 nm fue determinada en un espectrofotómetro para microplacas (Titertek Multiscan Plus, Low Laboratories, Helsinki, Finlandia).

La concentración proteica fue determinada empleando el método del ácido bicinconínico (QuantiPro BCA Assay, Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando sero albumina bovina (BSA) como estándar.

4.- Acoplamiento del AcMo E492/G1 a Biotina

La conjugación del AcMo E491/G1 a Biotina fue realizada según Harlow & Lane (1988). Muy brevemente, la muestra fue dializada contra buffer de acoplamiento (buffer borato de sodio 0,1M pH 8.8) durante 24 h En paralelo, fue preparada una

solución de Biotina (Pierce) en dimetil sulfoxido (Amresco) (10 mg/mL). Luego, la Biotina fue incubada con los anticuerpos en una relación 250 µg por miligramo respectivamente, durante 4 h a temperatura ambiente. Posteriormente, 20 µL de NH₄Cl 1M por miligramo de anticuerpo fue agregado, incubando la mezcla durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, la mezcla fue dializada contra PBS por 48 h a 4 °C con agitación suave. Los anticuerpos biotinilados fueron alicuotados y conservados en PBS-BSA 1%-Na₃N 0,02% a 4°C.

5.- Obtención de células peritoneales de ratones Balb/c.

Un grupo de ratones Balb/c normales (n=5) fueron sacrificados por dislocación cervical previa anestesia. La cavidad peritoneal de cada ratón fue lavada con 5 mL de medio de cultivo RPMI 1640 frío suplementado con 2% de suero fetal bovino (FCS) de-complementado (PBS-FSC). La suspensión celular obtenida fue centrifugada a 1200 r.p.m durante 7 min a 4 °C. Las células fueron recuperadas y resuspendidas en PBS-FSC. El número de células y su viabilidad en la suspensión fue determinado utilizando cámara de Neubauer, y tinción vital con azul de Tripán.

6.- Estudio de la unión de componentes de la fracción E4⁺ a células CD19⁺ peritoneales, por citometría de flujo.

En una microplaca de 96 pocillos de fondo redondo fueron dispensadas 2x10⁶ células/pocillo. Luego, la placa fue centrifugada a 1200 r.p.m durante 7 min a 4 °C y los receptores Fc de las células fueron bloqueados con Mouse BD Fc block, (Becton Dickinson) incubando durante 20 min a 4 °C. Luego de lavar, las células fueron incubadas con una dilución apropiada de la fracción E4⁺ diluida en PBS - BSA (0,5%) - NaN₃ (0,02%) (PBS-BSA-Az), durante 30 min a 4 °C. Posteriormente, una dilución apropiada en PBS-BSA-Azida de anti-CD19⁺-FITC y su control isotópico correspondiente (Pharmingen, Becton Dickinson) ; E492/G1-Biotina; y Streptavidina-PE (Pharmingen, Becton Dickinson) fueron incubadas con las células durante 30 min a 4°C en oscuridad. Luego de lavar, las células fueron resuspendidas en PBS y analizadas en un citometro de flujo (FACScalibur, Becton Dickinson) utilizando el *software* de análisis Cell Quest.

7.- Inmunización de ratones Balb/c con la fracción E4⁺

Un grupo de ratones Balb/c normales (n=12) fue inoculado en el día 0 del experimento con 50 µg (en carbohidratos) de E4⁺ en PBS/ratón por vía ip. Un segundo grupo de ratones (n=15) inoculado por vía ip con PBS fue utilizado como grupo control. En los días 1, 3 y 5 post-inoculación, 4 ratones del grupo inoculado con E4⁺ y 5 ratones del grupo control, fueron sacrificados y la cavidad peritoneal de cada individuo fue lavada con 2 mL de PBS-FCS. Luego de centrifugar a 1200 r.p.m. durante 7 min a 4°C, el exudado peritoneal y las células de cada ratón fueron recuperados y conservados en condiciones adecuadas.

8.- qRT-PCR para factores de transcripción y citoquinas.

El análisis por qRT-PCR para factores de transcripción (Blimp-1 y Pax5) y citoquinas (IL-10, IL-6 e IFN γ) fue realizado en células peritoneales totales cada ratón, en diferentes puntos temporales post-inoculación.

8.1.- Extracción de ARN.

La extracción de ARNm fue realizada siguiendo las indicaciones del fabricante de TRIzol® (Invitrogen). Brevemente, las células fueron recuperadas por centrifugación a 1200 r.p.m. durante 7 min a 4 °C, re-suspendidas en TRIzol® a una concentración de 1×10^7 células /mL y congeladas a -70°C hasta su procesamiento.

Una vez descongeladas, una alícuota de 500 µL, fue centrifugada a 12.000 g durante 10 min a 4°C, y el sobrenadante obtenido fue dejado reposar a temperatura ambiente durante 5 min. Luego, 100 µL de CHCl₃ fueron agregados y mezclados por inversión suave hasta alcanzar una monofase. Luego, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 min y se centrifugó la muestra a 12.000 g durante 10 min a 4°C. Posteriormente, la fase acuosa (superior) fue recuperada y centrifugada nuevamente en las mismas condiciones. Luego, 250 µL de isopropanol fueron agregados a la fase acuosa dejando reposar a temperatura ambiente durante 10 min. Seguidamente, la mezcla fue centrifugada a 12.000 g durante 10 min a 4°C, descartando posteriormente el sobrenadante. El pellet fue lavado con 500 µL de etanol 75% y centrifugado a 12.000 g durante 10 min a 4°C. Luego de descartar el sobrenadante, el etanol remanente fue dejado secar durante 30 min a temperatura ambiente. El pellet final seco fue resuspendido en 30 µL de H₂O libre de nucleasas y calentado a 65°C durante 10 min.

Mediante geles de agarosa la integridad de los ARN extraídos fue analizada y la concentración de cada muestra fue determinada por absorbancia a 260 nm (A_{260}) utilizando el equipo NanoDrop (Thermo Scientific). La relación A_{260}/A_{280} fue calculada para analizar la contaminación por proteínas (Sambrook & Russell, 2001).

8.2.- Tratamiento con DNAsa.

La remoción del ADN genómico potencialmente contaminante en la muestra fue realizada previo a la transcripción reversa mediante tratamiento con DNasa I (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Muy brevemente, se incubó 0,35 UI de DNasa I cada 1 μ g de ARN total en la mezcla de reacción durante 15 min. a temperatura ambiente. Luego, la enzima fue inactivada por la adición de 2.5 mM de EDTA y calentamiento a 65°C durante 10 min.

8.3.- RT

La síntesis de ADN copia (ADNc) fue realizada mediante el uso de la transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se incubó conjuntamente 1 μ g de ARN con 0,2 μ g de primers hexaméricos aleatorios (Invitrogen), 0,5 mM dNTPs (Invitrogen), 10 mM DTT (Invitrogen), 40 UI RNaseOUT (Invitrogen) y 200 UI de M-MLV transcriptasa reversa (Invitrogen) en un volumen final de 20 μ L. Muy brevemente, la mezcla final de reacción fue incubada 10 min a 25 °C, seguido de una incubación de 50 min a 37 °C, finalmente 15 min a 70°C. El ADNc generado fue diluido en un volumen final de 80 μ L en H₂O libre de nucleasas y fue almacenado a -20°C.

8.4.- Primers.

Las secuencias de los primers específicos utilizados para la amplificación de los ADNc correspondientes a ARNm de ratón para los factores de transcripción (Pax5 y Blimp-1) y las citoquinas (IFN- γ , IL-6, e IL-10) se muestran en la Tabla más abajo. Los primers fueron obtenidos de la empresa Operon. La β -actina de ratón (de expresión constitutiva) fue utilizada como gen normalizador.

Primer	Secuencia	Producto amplificado (pb)
β -actina _F	GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT	68
β -actina _R	CGTCATCCATGGCGAACTG	
IL-10_F	CATTTGAATTCCCTGGGTGAGA	101
IL-10_R	TGCTCCACTGCCTTGCTCTT	
IL-6_F	GTTCTCTGGGAAATCGTGGAAA	78
IL-6_R	AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA	
IFN γ _F	TCAGCAACAGCAAGGCGAAA	143
IFN γ _R	CCGCTTCCTGAGGCTGGAT	
Blimp-1_F	AAGAGGTTATTGGCGTGGTAAG	114
Blimp-1_R	ACTTCCTGTTGGCATTCTTGG	
Pax5_F	AAACGCAAGAGGGATGAAGGT	101
Pax5_R	AACAGGTCTCCCCGCATCT	

Primers específicos de secuencias murinas para qPCR de citoquinas y factores de transcripción. Se indica la secuencia para cada uno de los *primers* (*forward* y *reverse*) y el tamaño de los productos amplificados.

8.5.- PCR

Las PCR cuantitativas o en tiempo real (qPCR) fueron realizadas utilizando QuantiTech SYBR Green PCR Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones fueron realizada en un volumen final de 10 μ L conteniendo 5 μ L de QuantiTech SYBR Green PCR Kit (QIAGEN) y 2 μ L de ADNc (previamente diluido 1/4), en presencia de 0,9 μ M de cada primer específico. Las qPCR fueron realizadas en un Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science). Muy brevemente, las muestras fueron desnaturalizadas por calentamiento a 95 °C durante 15 min y seguidamente se aplicó a 95 °C 40 ciclos de 15 seg. y a 60 °C por 1 min.

La calidad del ADNc fue estudiada analizando la β -actina y solo se incluyó en el análisis aquellas muestras con un valor de Ct menor a 20. Las cantidades relativas de los ARNm en cada muestra fue calculada utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak K.J. & Schmittgen-T.D., 2001) donde $\Delta Ct = Ct_{analito} - Ct_{\beta-actina}$. Las mismas fueron expresadas

como el incremento en veces de la muestra en estudio respecto al promedio del grupo control.

9.- Determinación de anticuerpos totales por ELISA.

La cuantificación de anticuerpos totales de los isotipos IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 fue realizada por ELISA de captura según Mourglia-Ettlin *et al.*, (2011b). Brevemente, placas de microtitulación de 96 pocillos fueron sensibilizadas con diluciones adecuadas de antisueros de cabra anti-isotipos de ratón (Sigma) en PBS, incubando toda la noche a 4°C. Luego de descartar los sobrenadantes, las placas fueron lavadas dos veces con 200 µL/pocillo de PBS-Tween (0,05%) (PBS-T), incubando 3 min cada vez. Se bloqueó con 200 µL/pocillo de PBS-BSA (1%) incubando durante 1 h. en cámara húmeda a temperatura ambiente. Luego de lavar tres veces, 100 µL/pocillo de las muestras diluidas en PBS-BSA (1%)-Tween (0,05%) (PBS-BSA-T) fueron dispensados. Como estándar fueron utilizados cada uno de los isotipos de ratón purificados (Sigma) en PBS-BSA-T. Las placas fueron incubadas durante 2 h a 37°C en cámara húmeda. Luego de descartar los sobrenadantes, las placas fueron lavadas 4 veces con PBS-T y fueron dispensados 100 µL/pocillo del segundo anticuerpo (anticuerpo monoclonal específico para cada isotipo conjugado a peroxidasa, Sigma) diluido en PBS-BSA-T. Posteriormente, las placas fueron incubadas durante 1 h. en cámara húmeda a 37°C y luego lavadas 6 veces con PBS-T, con un lavado final con PBS. Finalmente, para determinar la actividad peroxidasa fueron dispensados 100 µL/pocillo de solución de H₂O₂ como sustrato y ortofenilendiamina (OPD) como cromógeno, incubando durante 30 min en oscuridad en cámara húmeda a temperatura ambiente. La reacción fue detenida con 50 µL por pocillo de H₂SO₄ 3M y la absorbancia fue medida a 492 nm en un espectrofotómetro para microplacas (Titertek Multiscan Plus, Low Laboratories, Helsinki, Finlandia).

10.- Determinación por ELISA de la potencial unión de diferentes lectinas a componentes de PSA y de la fracción E4⁺.

El análisis de interacción de diferentes lectinas a componentes de PSA y de la fracción E4⁺ fue realizado por ELISA. Brevemente, placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc) fueron sensibilizadas con 10 µg/mL en proteínas de PSA o E4⁺ en PBS, incubando toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Luego de descartar los sobrenadantes, las placas fueron lavadas dos veces con PBS-T. Luego se bloqueó

con 200 µl por pocillo de PBS-Tween (0,5%) incubando durante 2h. en cámara húmeda a temperatura ambiente. Luego de lavar tres veces, fueron dispensados 100 µL/pocillo de las lectinas biotiniladas diluidas (200 ng/mL) en PBS-T, incubando toda la noche a 4°C.

Luego de descartar los sobrenadantes, las placas fueron lavadas 4 veces con PBS-T y fueron dispensados 100 µL/pocillo de una dilución apropiada de extravidina conjugada a peroxidasa (ExtrAvidin®, Sigma) diluida en PBS-T e incubando durante 1 h y 30 min a 37°C en cámara húmeda. Posteriormente, las placas fueron lavadas 7 veces con PBS-T, con un lavado final de PBS. Finalmente, la actividad peroxidasa fue determinada por dispensación de 100 µL/pocillo de solución de H₂O₂ como sustrato y ortofenilendiamina (OPD) como cromógeno, incubando en cámara húmeda a temperatura ambiente. La reacción fue detenida con 50 µL/pocillo de H₂SO₄ 3M y la absorbancia fue medida a 492 nm en un lector para microplacas (Titertek Multiscan Plus, Low Laboratories, Helsinki, Finlandia).

Las lectinas biotiniladas utilizadas en el ensayo fueron: WGA (aglutinina de germen de trigo o *Triticum vulgare*), ConA (Concanavalin A, proteína de unión a carbohidratos, de *Canavalia ensiformis*), GNA (*Snowdrop lectin*, proteína que une motivos de manosa, de *Galanthus nivalis*), LCH (*Lentil lectin*, aglutinina de *Lens culinaris*) y ECL (algotinina de *Erythrina cristagalli*); (todas de GALAB Technologies, Alemania).

11.- Determinación de la especificidad de la unión de lectinas a componentes de PSA y de la fracción E4⁺, por ELISA de inhibición.

La capacidad específica de unión de las lectinas ConA, WGA y LCH a componentes de PSA o de la fracción E4⁺, fue determinada por ELISA de forma similar a la descrita anteriormente, con la diferencia que estas lectinas fueron previamente incubadas con sus inhibidores correspondientes durante toda la noche a 4°C. Los sacáridos utilizados como inhibidores fueron α- methylmannoside para ConA y LCH; y N-acetylglucosamine para WGA (ambos de Vector Laboratorios Inc.)

12.- Electroforesis y electro-transferencia.

Para analizar qué componentes de la fracción E4⁺ fueron capaces de interaccionar específicamente con ConA, dichos componentes fueron resueltos por SDS-PAGE y luego electro-transferidos a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF).

Los componentes de E4⁺ fueron resueltos por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (*Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE) (Laemmli, 1970), con un 12% en poliacrilamida (equipo: Amersham Biosciences y fuente: Techware Sigma Aldrich Co). Posteriormente, la electro-transferencia de dichos componentes a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF), fue realizada durante 1 h a 0,8 mA/cm² de membrana (Novablot, LKB) Luego, la membrana fue bloqueada con PBS-T incubando durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, fue cortada en tiras de tamaño similar, y cada tira fue incubada de forma independiente con: a) 5 mL de una solución de ConA-Biotina (5 µg/mL); b) 5 mL de una solución de ConA-Biotina (5 µg/mL) conteniendo α- methylmannoside; y c) 5 mL de PBS-T (control). Todas las preparaciones fueron diluídas en PBS-T, y las incubaciones fueron realizadas durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Finalmente, una dilución apropiada de avidina conjugada a peroxidasa (ExtrAvidin®, Sigma) diluida en PBS- T fue agregada, incubando durante 2 h a 37°C. La actividad peroxidasa fue determinada por quimioluminiscencia utilizando el kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante, (equipo Bio-Rad).

13.- Resolución por SDS-PAGE e identificación por espectrometría de masas.

La fracción E4⁺ y PSA fueron resueltos por SDS-PAGE, empleando geles al 12%. Estos fueron revelados con tinción con nitrato de plata (de acuerdo al ítem 14), y las bandas de la fracción E4⁺ fueron enviadas para su identificación por espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF) a la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica del Instituto Pasteur de Montevideo.

14.- Tinción con nitrato de plata.

La tinción con nitrato de plata utilizada para visualizar los componentes resueltos por SDS-PAGE fue realizada según Portela M., (Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Instituto Pasteur de Montevideo) (comunicación personal).

Brevemente, el gel fue fijado con ácido acético 12%, etanol 50%, y formalina 0,05% incubando durante 1 h a temperatura ambiente. Luego de lavar 2 veces con etanol 50% durante 5 min y otras dos veces con agua MilliQ, el gel fue incubado con tiosulfato de sodio 0,02% por 30 segundos. Seguidamente, fue lavado dos veces con agua MilliQ durante 1 min e incubado con una solución de nitrato de plata 0,2%,

formalina 0,075% durante 20 min a temperatura ambiente (en oscuridad y con agitación). Luego de lavar dos veces con agua MilliQ, el gel fue incubado con una solución de carbonato de sodio 3%, tiosulfato de sodio 0,02%, formalina 0,05% (a temperatura ambiente y con agitación) hasta visualizar las bandas. La reacción fue detenida utilizando una solución de ácido acético 5%. Todas las soluciones fueron preparadas utilizando agua MilliQ.

15.- Tratamiento de E4⁺ con endoglicosidasa PNGasa F

Para remover las glicosilaciones que podrían estar afectando la identificación de los componentes presentes en la fracción E4⁺ por espectrometría de masas, la misma fue tratada con amidasa Peptide -N-Glycosidase F (PNGasa F), de acuerdo a las instrucciones del fabricante (New England BioLabs). Muy brevemente, la fracción E4⁺ fue mezclada con buffer desnaturalizante (0.5% SDS, 40 mM 1,4-ditiotreitol) hasta un volumen final de reacción de 100 µL. Luego, la mezcla fue incubada a 100 °C durante 10 min y enfriada rápidamente. Posteriormente, fueron agregados a la mezcla de reacción, 20 µL del buffer de reacción al 10x (0.5 M fosfato de sodio, pH 7.5) denominado G7 (New England BioLabs), 20 µL de NP-40 10% (New England BioLabs), y H₂O calidad tipo 1 hasta completar un volumen final de 200 µL. A continuación, 10 µL de PNGasa F (New England BioLabs) fueron agregados a la mezcla, agitando vigorosamente e incubando durante 1 h a 37°C.

Finalmente, la fracción E4⁺ tratada con PNGasa F y la sin tratar fueron resueltas por SDS-PAGE. Esto permitió determinar si la enzima escindió los N-glicanos, al observar una leve disminución del peso molecular de las bandas. La tinción empleada fue por nitrato de plata (de acuerdo al ítem 14) y las bandas de la fracción E4⁺ tratada con PNGasaF fueron identificadas por espectrometría de masas.

16.- Electroforesis bidimensional

Los componentes de la fracción E4⁺ y de PSA fueron resueltos por electroforesis en dos dimensiones (PM y PI) según Machado (2007) y Gorg (2004). Brevemente, 200 µg en proteínas de PSA o de E4⁺, fueron disueltos en un volumen V de buffer de rehidratación, conteniendo 4%V de 1,4-ditiotreitol (DTT) (70 mg/mL) y 0,5%V de buffer IPG (buffer comercial con anfolitos formulado para generar el gradiente de pH en la tira de gel). Esta preparación, fue utilizada para rehidratar las tiras de gel de

isoelectroenfoque (Immobiline DryStrip gel, o tiras IPG) (General Electric®), de rango de pH lineal de 3 a 10, incubándolas toda la noche.

El isoelectroenfoque (separación por punto isoeléctrico) fue realizado utilizando el equipo Ettan IPGphor 3 IEF System (General Electric®), durante 9 h 30 min, con un total de 30.000 Vh (Machado, 2007). Esta separación se realizó en cuatro etapas: a) 500 V (30 min), b) gradiente hasta 1000 V (1 h), c) gradiente hasta 2000 V (1 h) y d) 5000 V (7 h). Las tiras de IPG fueron equilibradas (durante 15 min) con 5 mL/tira de buffer de equilibrio [Tris 75mM pH 8,8; urea 6M; glicerol 30% (v/v); SDS 2% (w/v); azul de bromofenol 0,002% (v/v)], conteniendo 50 mg de DTT., seguido de una segunda incubación de 15 min, con 5 mL de buffer de equilibrio conteniendo 125 mg de iodoacetamida. Finalmente, para la resolución en la segunda dimensión fueron utilizados geles de poliacrilamida al 12%, colocando sobre los mismos las tiras ya equilibradas y sellando con un gel de agarosa (equipo: Amersham Biosciences y fuente: Techware Sigma Aldrich Co).

Dos geles fueron preparados en paralelo, uno de ellos fue teñido con nitrato de plata (de acuerdo al ítem 14), y el otro fue electrotransferido a una membrana de PVDF (1 h a 53 mA, 0,8mA/cm² de membrana) (Novablot, LKB).

17.- Electro-transferencia e immunoblotting

La membrana de PVDF, fue posteriormente bloqueada con PBS-BSA 1% durante toda la noche a 4°C. A continuación, fue lavada con PBS-T durante 5 min a temperatura ambiente con agitación, seguido de una incubación de 1 h y media con agitación a 37°C con 4 mL de AcMo E492/G1 a una concentración de 200 µg/mL en PBS-BSA-T. A continuación, el sobrenadante fue descartado, la membrana lavada (10 veces con PBS-T con agitación) e incubada con una dilución apropiada de anti-IgG3 de ratón acoplado a peroxidasa durante 1 h y media a 37°C. Luego, la membrana fue lavada 10 veces con PBS-T, con un último lavado con PBS. La actividad peroxidasa fue determinada por quimioluminiscencia utilizando el kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las imágenes fueron obtenidas utilizando el equipo G:BOX (Syngene).

18.- Selección de spots e identificación por espectrometría de masas

Aquellos spots con similar PM y PI identificados en el gel en 2D de E4⁺ que estaban presentes en el gel de PSA fueron cortados y enviados para su identificación por

espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF), a la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas del Instituto Pasteur de Montevideo.

Para confirmar que los spots seleccionados no fueran un artefacto, los mismos fueron identificados en paralelo por inmunoblotting utilizando el AcMo E492/G1, como control.

19.- Análisis estadístico

Para evaluar diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupos experimentales y sus controles, fue utilizado el test no paramétrico de Mann-Whitney-Wilcoxon.

RESULTADOS

1.- Preparación de E4⁺ y controles de calidad

En primer lugar, para poder realizar todos los estudios necesarios tendientes a identificar/caracterizar el/los componente/s de la fracción E4⁺, fue necesario obtener cantidades adecuadas de dicha fracción para realizar, dentro de lo posible, todos los ensayos con un único lote.

Esto involucró una serie de pasos, alguno de ellos laboriosos. Primero, el hibridoma productor del AcMo E492/G1 (IgG3), el cual reconoce un epítopo glucídico presente en antígenos somáticos de protoscolecis de *E. granulosus*, fue crecido en cultivo estático. Luego, para obtener cantidades adecuadas de este hibridoma y controlar en los sobrenadantes de cultivo la producción del AcMo E492/G1, los hibridomas fueron inoculados por vía i.p. a ratones Balb/c. Una vez que el líquido ascítico fue recuperado, este fue deslipidificado, la fracción γ globulina obtenida por precipitación con sulfato de amonio, y finalmente los anticuerpos del isotipo IgG fueron obtenidos por cromatografía de afinidad utilizando como soporte sólido Proteína G.

El control de la presencia del AcMo E492/G1 en esta preparación, fue realizado por ELISA utilizando microplacas sensibilizadas con PSA. Los resultados se muestran en la Figura 3 e indican la presencia del AcMo (IgG3 de ratón) en cantidades relativamente adecuadas considerando los valores de Ab492nm para diferentes concentraciones de IgG. En forma paralela, protoscolecis de *E. granulosus* fueron obtenidos a partir de quistes hidáticos fértiles, disgregados por ultrasonido, y finalmente el sobrenadante (PSA) fue recuperado. La fracción E4⁺ fue obtenida a partir de PSA por cromatografía de afinidad utilizando como matriz E492/G1 acoplado a Sepharose-CNBr, los eluatos obtenidos fueron mezclados y liofilizados. Los controles de "calidad" que se realizaron a esta fracción fueron: a) determinación de la concentración proteica y glucídica (Tabla 2) y b) la capacidad de los componentes de E4⁺ de unirse a células B (CD19⁺) peritoneales de ratones Balb/c normales (Figura 4). Los resultados obtenidos son consistentes con los previamente reportados (Baz *et al.*, 1999; Mougliá-Ettlin *et al.*, 2011b).

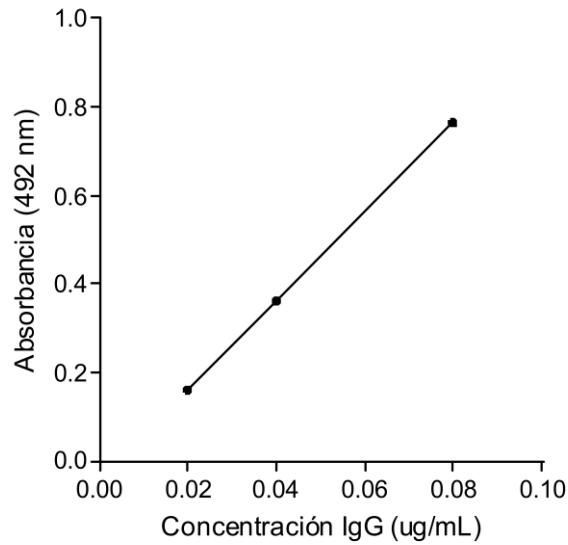


Figura 3.- Control obtención de anticuerpos IgG3 específicas contra PSA

	Concentración proteínas (mg/mL)	Concentración carbohidratos (mg/mL)	Relación CH : P
PSA	11.2	4,98	0,5
E4 ⁺	2,2	5,1	2,3

Tabla 2.- En las dos preparaciones parasitarias (PSA y E4⁺) se determinó la concentración proteica y glucídica utilizando el Kit BCA (Sigma) y el Método modificado del resorcinol respectivamente. La relación CH:P fue 4,6 veces mayor en E4⁺ comparada con la misma en PSA.

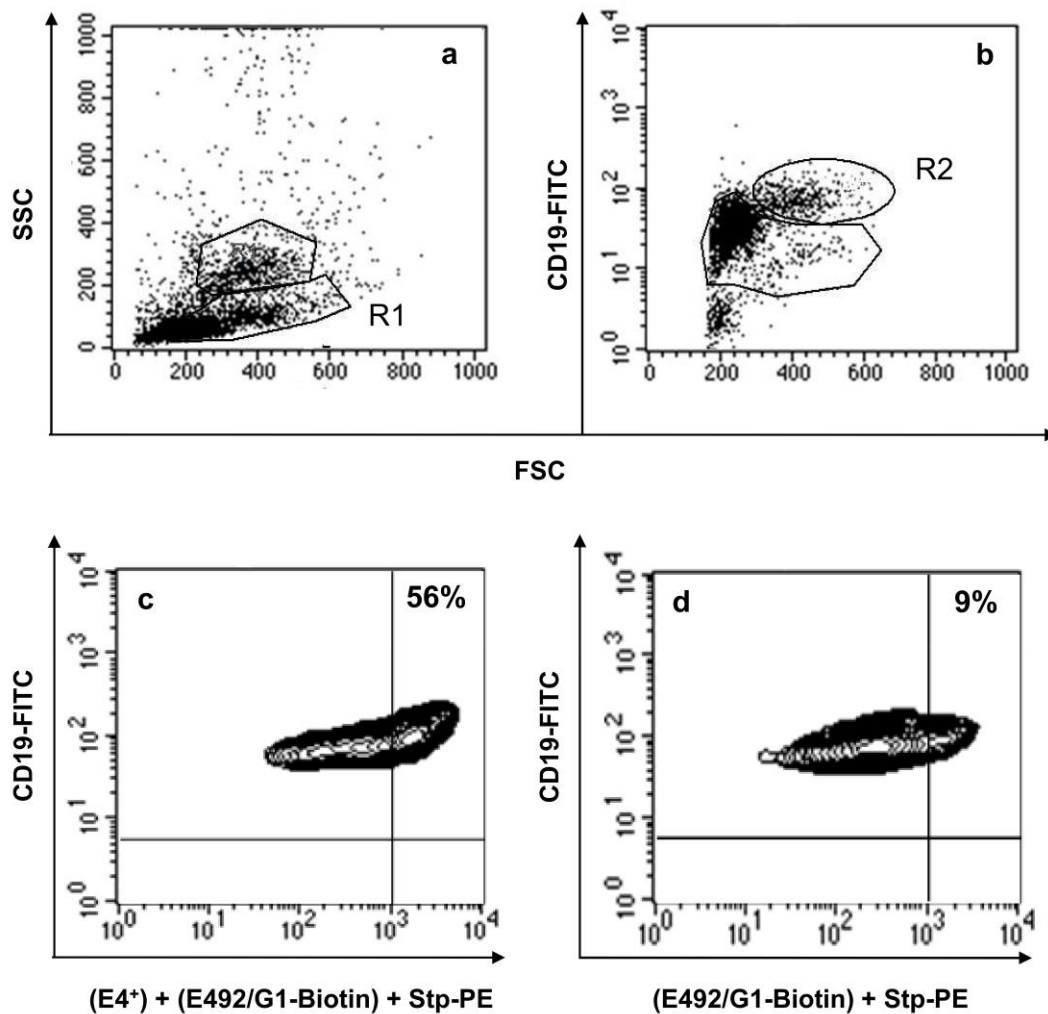


Figura 4.- Control por citometría de flujo de la unión de la fracción E4⁺ a células B peritoneales de ratones Balb/c normales.

Células peritoneales de ratones Balb/c normales fueron incubadas con: Ac bloqueantes de receptores Fc; anti-CD19 de ratón-FITC, E4⁺, E492/G1-Biotina y Streptavidina-PE y fueron analizadas por citometría de flujo. Los linfocitos (R1) fueron identificados en función de los valores de FSC/SSC (a). Los linfocitos CD19⁺ (R2) fueron determinados mediante un análisis de subordinación a R1. El estudio de la unión de E4⁺ y células CD19⁺ fue realizado mediante un análisis subordinado a R2 (c y d).

2.- E4⁺ es una fracción molecularmente heterogénea.

La información sobre los componentes de la fracción E4⁺ es escasa, por lo tanto, se comenzó analizando la homogeneidad de la misma en cuanto a sus constituyentes.

Para esto, la fracción E4⁺ fue resuelta por SDS-PAGE y sus componentes se hicieron visibles por tinción con nitrato de plata (tinción que revela tanto componentes proteicos como glucídicos). La Figura 5 muestra claramente que la fracción E4⁺ es una mezcla no tan heterogénea como PSA. Esto indica que, lejos de representar un antígeno particular, E4⁺ es una fracción constituida por múltiples componentes y además sugiere que el epitope Gal α (1,4)Gal β (1,4)GalNac (reconocido por el AcMo E492/G1) podría estar representado en varias glicoproteínas de esta fracción.

3.- Análisis de los efectos *in vivo* de la fracción E4⁺.

Varios interesantes efectos *in vitro* de la fracción E4⁺ sobre células peritoneales normales han sido reportados (Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011b). Sin embargo, no existen reportes centrados sobre los efectos potenciales que podría inducir *in vivo* la fracción E4⁺ a nivel local, es decir, en la cavidad peritoneal de ratones normales.

Para esto, se realizó un grupo de experimentos con el fin de determinar en ratones Balb/c inoculados con la fracción E4⁺ : a) en células de cavidad peritoneal: i) los niveles de expresión de citoquinas (IL-10, IL-6 e IFN γ ; y ii) los niveles de expresión de los factores de transcripción (Blimp-1 y Pax5) asociados en el proceso de la diferenciación de las células B en células productoras de anticuerpos (ASC); y b) la concentración de IgM totales y diferentes subclases de IgG totales en exudados peritoneales. Estos análisis se realizaron en diferentes puntos temporales post-inoculación.

3.1.- Los componentes de E4⁺ inducen *in vivo* un aumento en los niveles de expresión de IL-10, IL-6 pero no de IFN γ .

El nivel de expresión de ARNm para las citoquinas IL-10, IL-6 e IFN γ en células peritoneales de ratones inmunizados y controles, fue determinado por qRT-PCR. Los resultados obtenidos (Figura 6A) indican que E4⁺ es capaz de inducir rápidamente *in vivo* un aumento significativo de los niveles de expresión de IL-10 y de IL-6. Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en la expresión de IFN γ con respecto al grupo control. Estos resultados sugieren que componentes de la fracción

E4⁺ podrían estar involucrados en algún mecanismo regulador negativo de respuestas pro-inflamatorias, ya que, particularmente la IL-10, es una citoquina anti-inflamatoria clave en la inhibición de respuestas tipo Th1 (Fishman & Perelson, 1994; Moore *et al.*, 2001; Mosmann & Moore, 1991; Saraiva & O'Garra, 2010).

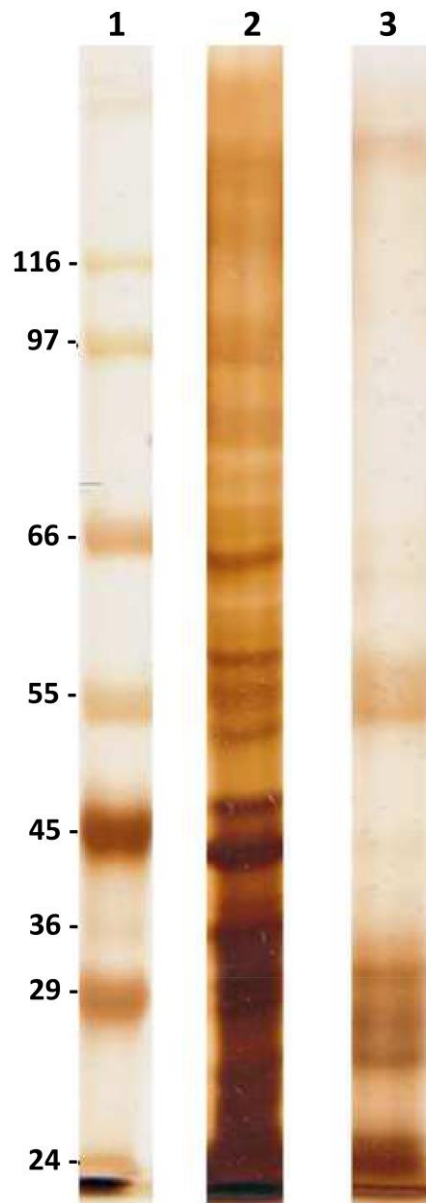


Figura 5. Patrones de los componentes de PSA y E4⁺.

Los antígenos PSA y E4⁺ fueron resueltos por SDS-PAGE en condiciones reductoras. (1) Kit PM (kDa); (2): antígenos somáticos de protoscolecemas (PSA) y (3): fracción E4⁺.

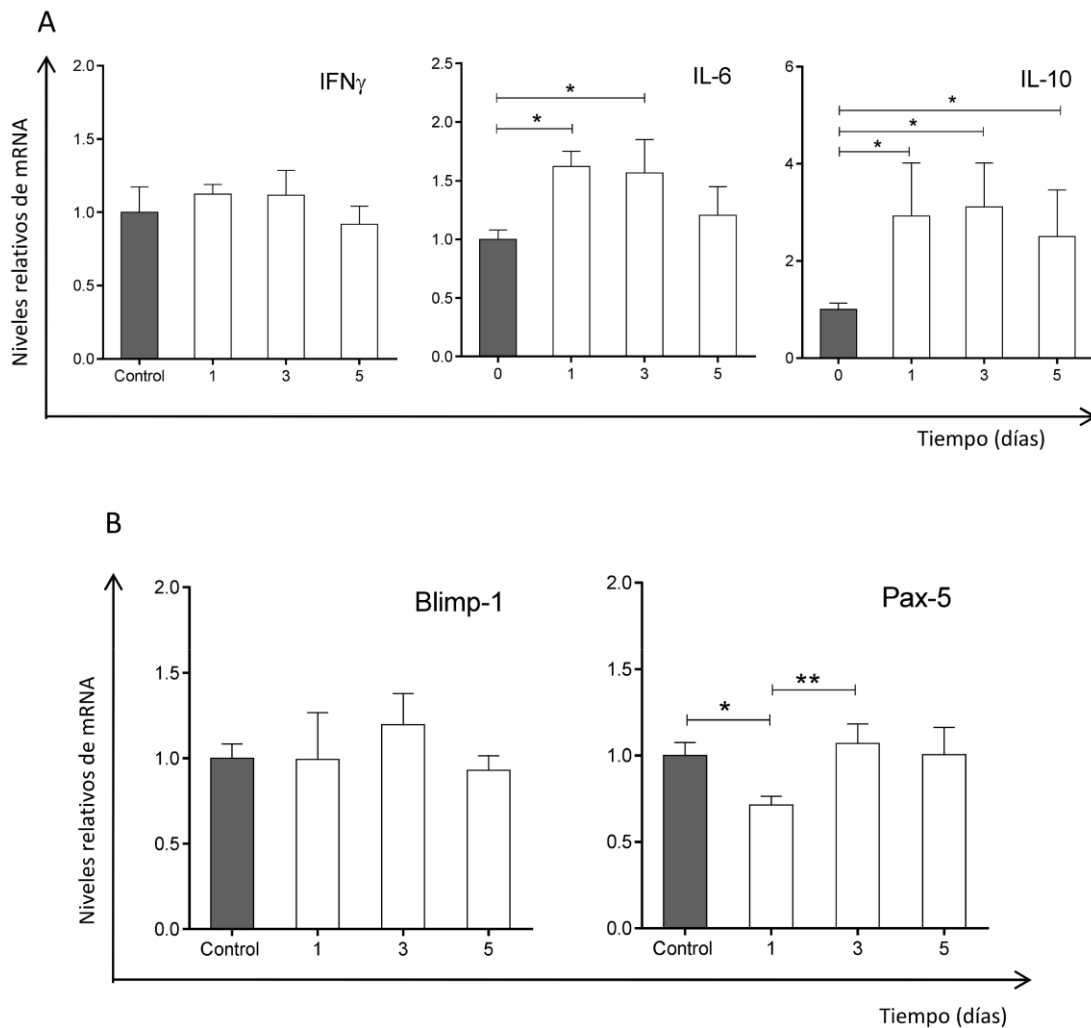


Figura 6. – Expresión de Citoquinas y Factores de Transcripción.

Un grupo de ratones Balb/c (n=12) fue inoculado en el día 0 del experimento con 50 μ g (en carbohidratos) de E4⁺/ratón. Un segundo grupo de ratones (n=15) fue inoculado con PBS (grupo control). En los días 1, 3 y 5 post-inoculación, 4 ratones del grupo inoculado con E4⁺ y 5 ratones del grupo control, fueron sacrificados y las células peritoneales fueron recuperadas. Mediante qRT-PCR (utilizando primers específicos) se analizó el nivel relativo de mRNA para (A) IFN γ , IL-6, IL-10 y (B) los factores de transcripción Blimp-1 y Pax-5. Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM. (*) indica diferencia estadísticamente significativa (P<0.05) con respecto al grupo control.

3.2.- E4⁺ induce una rápida reducción de los niveles de expresión de Pax-5.

La determinación de los niveles de expresión de ARN de los factores de transcripción Blimp-1 y Pax-5 fue realizada por qRT-PCR. Los resultados (Figura 6B) indican que E4⁺ induce una rápida (día 1) y significativa reducción de los niveles de expresión de Pax-5. Por el contrario, los niveles de Blimp-1 mostraron no ser significativamente diferentes aquellos del grupo control.

3.3.- E4⁺ es capaz de inducir *in vivo* un aumento significativo de anticuerpos IgM totales a nivel local.

Los niveles de IgM total así como de las subclases de IgG totales en exudados peritoneales de cada individuo, fueron determinados por ELISA de captura. Los resultados obtenidos (Figura 7) sugieren que E4⁺ es capaz de inducir *in vivo* un aumento significativo de los niveles de IgM total. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de IgG1, IgG2a, IgG2b totales con respecto al grupo control. Con referencia a los niveles de IgG3 total, si bien estos no fueron significativamente diferentes comparados con el grupo control, los resultados mostraron (Figura 7D) una cierta tendencia a un aumento, por lo menos en término de medianas. Así, se observó que los niveles de IgG3 en los ratones inmunizados fueron 2 veces superiores, en términos de medianas, a aquellos correspondientes al grupo control. Este perfil de anticuerpos secretados (IgM e IgG3) ha sido asociado por otros autores con una respuesta de anticuerpos independiente de las células T colaboradoras (Baz *et al.*, 1999; Dematteis *et al.*, 1999; Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011b), por lo tanto, estos resultados sugieren que algún/os componente/s de E4⁺ podría/n inducir respuestas de anticuerpos T-independiente.

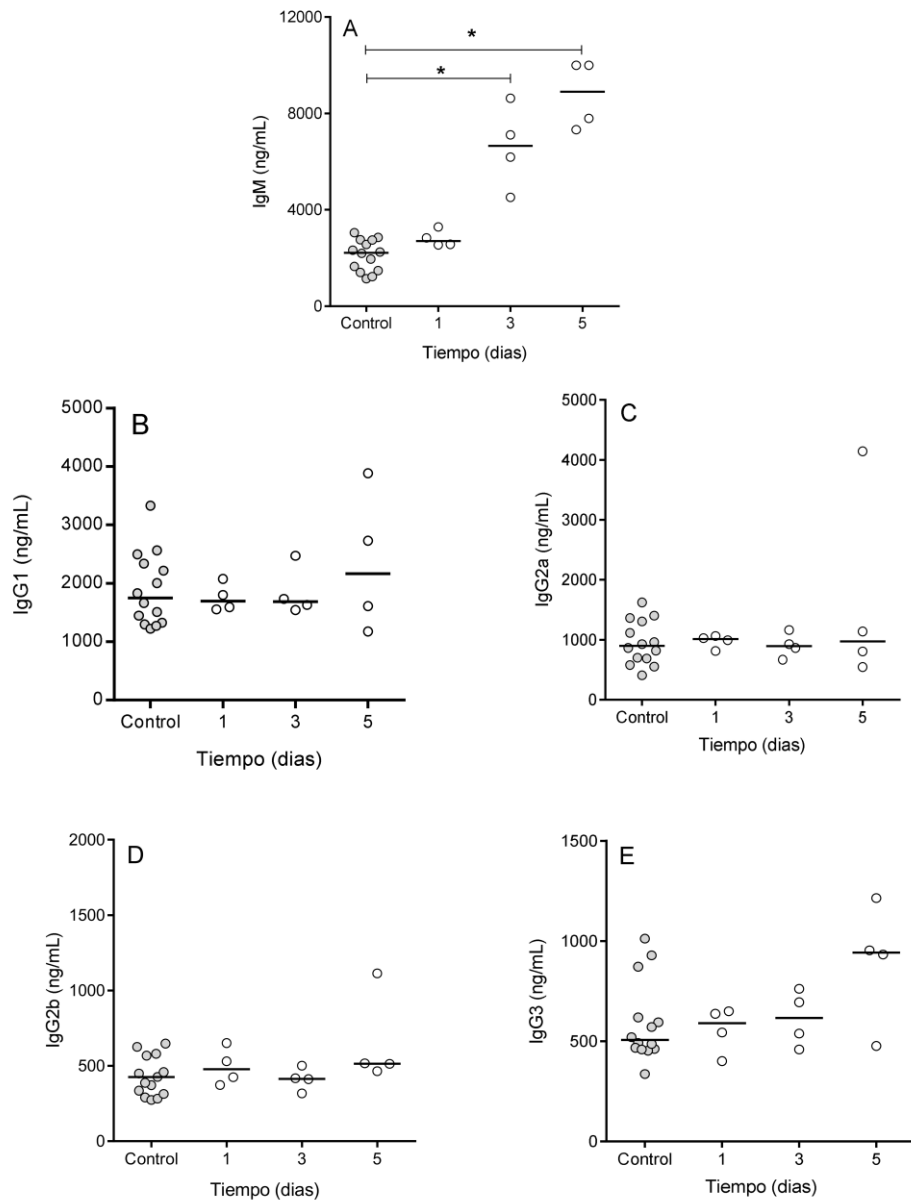


Figura 7. – Concentración de IgM total y suclases de IgG totales en exudado de cavidad peritoneal de ratones Balb/c inoculados con la fracción E4⁺ por vía intraperitoneal. Un grupo de ratones Balb/c (n=12) fue inoculado en el día 0 del experimento con 50 ug (en carbohidratos) de E4⁺/ratón. Un segundo grupo de ratones (n=15) fue inoculado con PBS (grupo control). En los días 1, 3 y 5 post-inoculación, 4 ratones del grupo inoculado con E4⁺ y 5 ratones del grupo control, fueron sacrificados y el exudado peritoneal de cada ratón fue recuperado. Se analizó por ELISA de captura los niveles totales de IgM (A), IgG1 (B), IgG2a (C), IgG2b (D) e IgG3 (E), en exudado de cavidad peritoneal de cada ratón individual. Los círculos representan los

valores individuales y la línea el valor de la mediana. (*) indica diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) con respecto al grupo control.

4.- E4⁺ es capaz de interactuar con las lectinas WGA y ConA.

Un segundo conjunto de experimentos estuvo centrado en estudiar la capacidad de unión de estructuras glucídicas presentes en componentes de E4⁺ a diferentes lectinas. Los análisis fue realizado por ELISA seleccionando las lectinas-biotiniladas: WGA, ConA, LCH, ELC y GNA, teniendo en cuenta resultados preliminares obtenidos por Mourglia-Ettlin G. (comunicación personal).

Los resultados (Figura 8) sugieren que existirían estructuras glucídicas en componentes de E4⁺ que preferentemente son capaces de interactuar con las lectinas WGA y ConA. Para demostrar que esta unión a WGA y ConA no se trataba de un artefacto, se realizaron ELISAs de inhibición con los sacáridos N-acetilglucosamina y Methylmanoside para WGA y ConA respectivamente. Los resultados (Figura 9) muestran que el sacárido N-acetilglucosamina inhibe un 82% la unión de la lectina WGA y que el sacárido Methylmanoside inhibe un 60% la unión de la lectina ConA a estructuras glucídicas de los componentes de E4⁺.

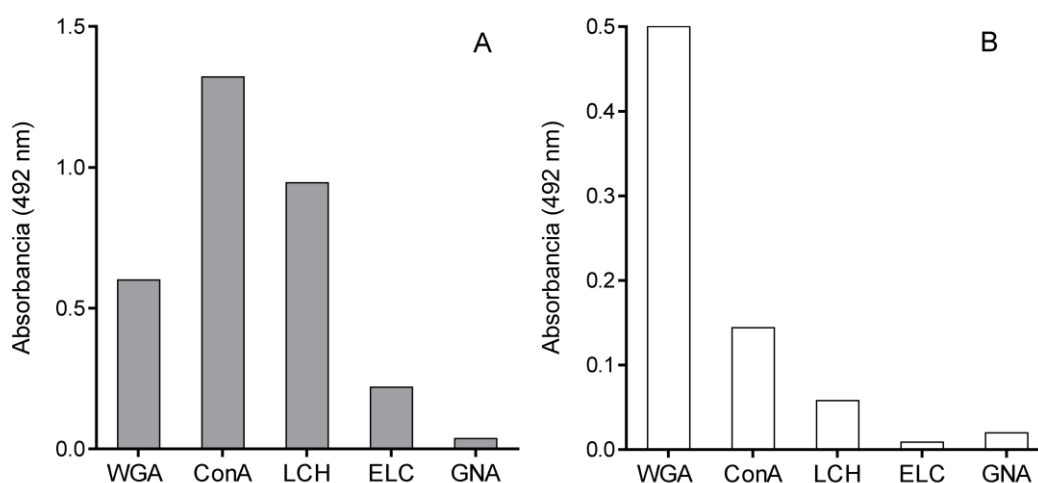


Figura 8.- Capacidad de unión de diferentes lectinas a componentes de la fracción E4⁺. Se analizó por ELISA la capacidad unión de diferentes lectinas biotiniladas: WGA (Aglutinina de germen de trigo), ConA (Concanavalina A), LCH (aglutinina de *Lens Culinaris*), ELC (algotinina de *Erythrina cristagalli*) y GNA (Lectina

de *Galanthus nivalis*) a componentes de la fracción E4⁺ (B) y componentes de antígenos somáticos de protoscolecemas (PSA) (A).

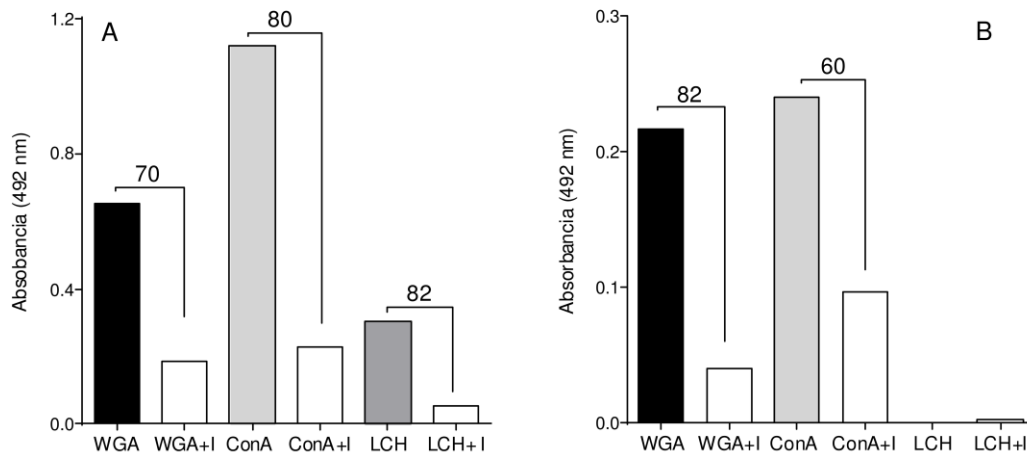


Figura 9.- Inhibición a través de ligandos para lectinas (WGA, ConA y LCH) de la unión a componentes de PSA y de E4⁺.

Se analizó el efecto que inducía la inhibición de cada lectina por su ligando correspondiente (N-Acetilglucosamina para WGA; Methylmannoside para ConA y Methylmannoside para LCH) sobre la unión de cada lectina a componentes de PSA (A) y E4⁺ (B).

5.- La lectina ConA se une a por lo menos a tres componentes de E4⁺.

El siguiente experimento estuvo basado, además del resultado anterior (Figura 9) en el reporte de Khoo *et al.* (1997). Los autores proponen diferentes estructuras glucídicas tentativas presentes en componentes de PSA. Una de las estructuras propuestas posee el sacárido Gal α (1,4)Gal β (1,4)GalNAc (epitope reconocido por el AcMo E492/G1) unido a mananos los cuales son capaces de unir ConA.

El ensayo consistió en resolver la fracción E4⁺ por SDS-PAGE y luego realizar una electro-transferencia a membranas de PVDF. Tiras de esta membrana fueron luego incubadas con ConA y con ConA previamente incubada con Methylmannoside. Los resultados (Figura 10) muestran claramente que, por lo menos tres componentes de

E4⁺, con PM aparente de 55, 52 y 43 kDa poseen estructuras glucídicas capaces de unirse a ConA. Esto es consistente, como se especificó anteriormente, con una de las estructuras propuestas por Khoo *et al.*, (1997) y sugiere además que dichas estructuras glucídicas podrían ser N-glicanos.

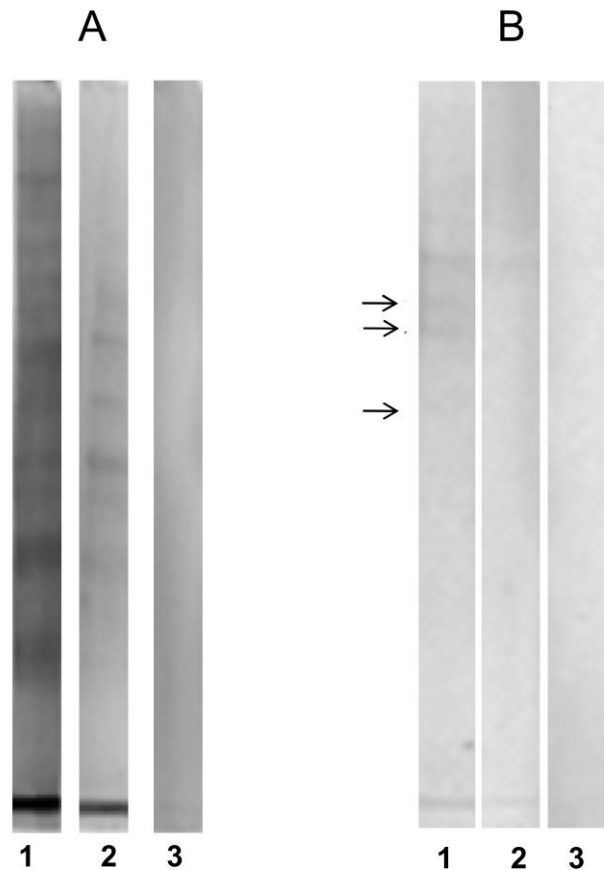


Figura 10.- SDS-PAGE y Electro-transferencia de PSA y E4⁺.

PSA y E4⁺ fueron resueltos por SDS-PAGE en condiciones reductoras y luego electro-transferidos a membranas de PVDF. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con: a) ConA-biotina; b) con ConA-biotina pre-incubada con Methylmannoside, y finalmente todas las membranas incubadas con Stravidina-PO.

En (A) se muestran los resultados obtenidos para PSA. [(1): ConA-biotina + Stravidina-PO; (2): (ConA+ methylmannoside) + Stravidina-PO; y (3): Stravidina-PO].

En (B) se muestran los resultados obtenidos para la fracción E4⁺. [(1): ConA-biotina + Stravidina-PO; (2): (ConA + methylmannoside) + Stravidina-PO; y (3): Stravidina-PO].

La unión de ConA a tres componentes de la fracción E4⁺ con PM aparente: 55, 52 y 43 kDa fue inhibida por la pre-incubación con methylmannoside.

6.- Identificación de los componentes de E4⁺ por MALDI-TOF-TOF.

Teniendo en cuenta que, por los menos tres glicoproteínas de E4⁺ podrían estar asociadas a N-glicanos, la fracción E4⁺ fue tratada con la amidasa Peptide-N-Glycosidase F conocida comúnmente como PNGasa F (Figura 11). Esta enzima escinde principalmente oligosacáridos con alto contenido de manosa, entre los residuos GlcNAc y asparagina. La idea de este ensayo fue fundamentada por el hecho que los carbohidratos podrían interferir en la identificación por espectrometría de masas. En consecuencia, una escisión de los N-glicanos, podría ser una buena estrategia para un análisis posterior por espectrometría de masas. Sin embargo, los resultados obtenidos utilizando bases de datos específicas para *E. granulosus* y *E. multilocularis* no mostraron homología con ningún antígeno parasitario (datos no mostrados).

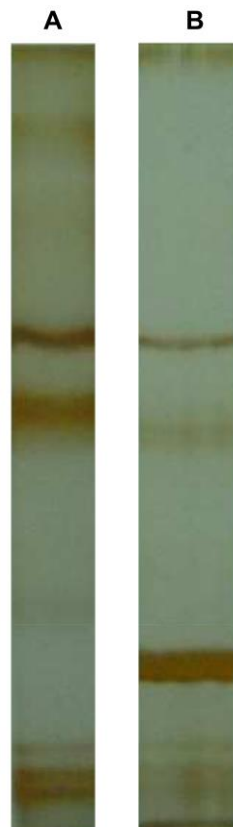


Figura 11.- Tratamiento con PGNasa F de la fracción E4⁺.

Los componentes de la fracción E4⁺ (A) y de E4⁺ pre-tratado con PGNasaF (B) fueron resueltos por SDS-PAGE en condiciones desnaturizantes y posteriormente analizados por espectrometría de masa (MALDI-TOF-TOF). Los resultados obtenidos

por espectrometría utilizando bases de datos específicas para *E. granulosus* y *E. multilocularis* no mostraron homología con ningún antígeno parasitario.

7.- Resolución de E4⁺ por electroforesis en dos dimensiones.

Dado que la resolución de E4⁺ en una dimensión (PM) no permitió identificar ningún componente de esta fracción que tuviera homología con antígenos del parásito, se decidió utilizar otra estrategia de resolución. Así, E4⁺ fue resuelta por electroforesis en dos dimensiones, es decir, por PM y punto isoeléctrico.

Los resultados (Figura 12) muestran la presencia de numerosos *spots*, seis de los cuales fueron aislados y analizados por espectrometría de masas. Este análisis mostró que uno de los *spots* tenía una alta homología con la Anexina B18 de *E. granulosus* (EgAxB18) (Tabla 3). Este resultado es por demás interesante, ya que ha sido propuesto recientemente que las anexinas parasitarias podrían tener un papel crítico, en la modulación de la respuesta inmune de los hospedadores vertebrados (Cantacessi *et al.*, 2013).

Para demostrar que este resultado no era consecuencia de un artefacto se realizaron varios controles. Estos consistieron: a) resolución de PSA por electroforesis bidimensional (Figura 12B); b) resolución por electroforesis 2D y electrotransferencia de PSA (Figura 13B) y E4⁺ (Figura 13A) y posterior identificación con el AcMo E492/G1. Los resultados de estos controles muestran claramente que la EgAxB18 es un componente de PSA y que es reconocido por el AcMo E492/G1 tanto en PSA como en la fracción E4⁺.

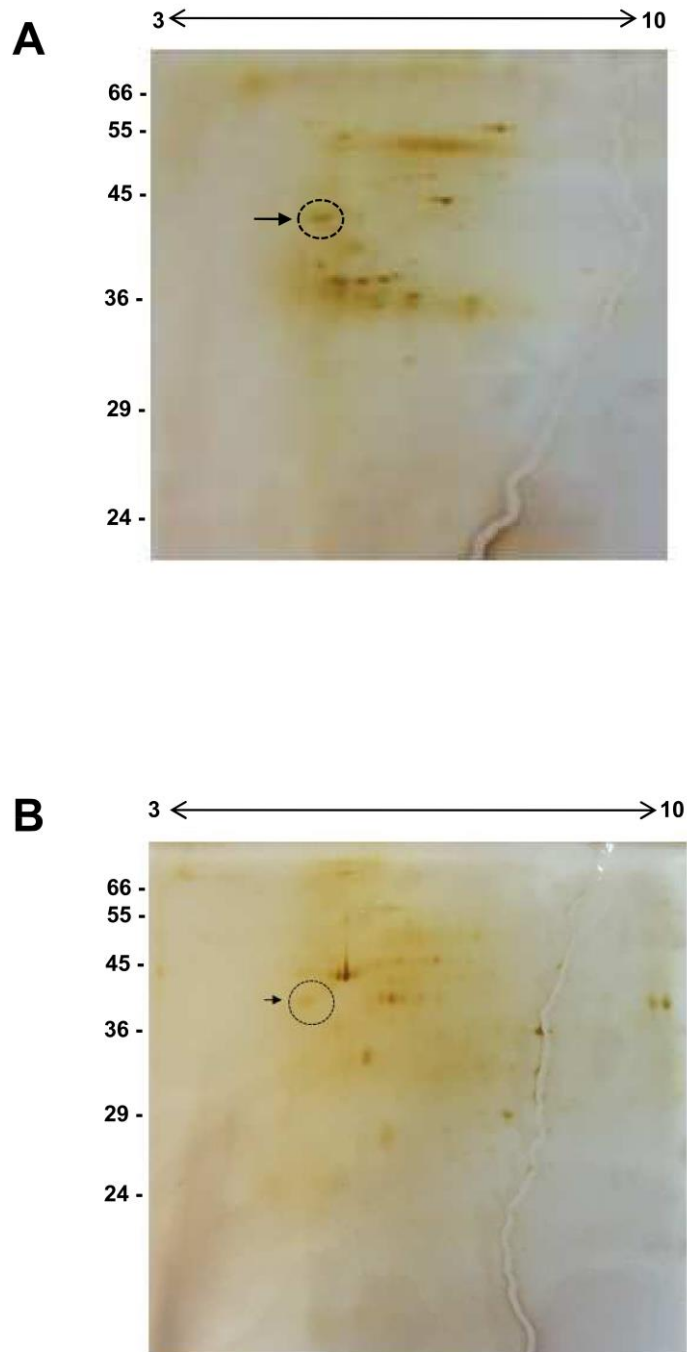


Figura 12.- Electroforésis bidimensional de la fracción E4⁺ y análisis por espectrometría de masa (MALDI-TOF-TOF).

Los componentes de la fracción E4⁺ y de PSA fueron resueltos por electroforesis en dos dimensiones (PI y PM). (A) patrón de spots correspondiente a componentes de E4⁺ y (B) patrón de spots correspondiente a componentes de PSA.

La fecha indica el spot correspondiente a la anexina B18 de *E. granulosus* (EgAxB18) identificada por MALDI-TOF-TOF. Kit de punto isoeléctrico tiene un rango lineal de pH de 3 a 10.

Spot No.	Mapeo peptídico	PM	PI
1	“Queratina”	66	5.1
2	“Egr_000041200.1” “Annexin” de <i>Echinococcus granulosus</i> .	47	4.9
3	No identificada	41	6.0
4	No identificada	42	4.9
5	“β-Casein de Bos taurus”	34	6.0
6	No identificada	32	8.3

Tabla 3.- Identificación de la Anexina B18 de *E. granulosus*. Seis spots fueron seleccionados y posteriormente analizados por espectrometría de masa (MALDI-TOF-TOF). Los resultados mostraron que uno de los componentes de la fracción E4⁺ fue la Anexina B18 de *E. granulosus*.

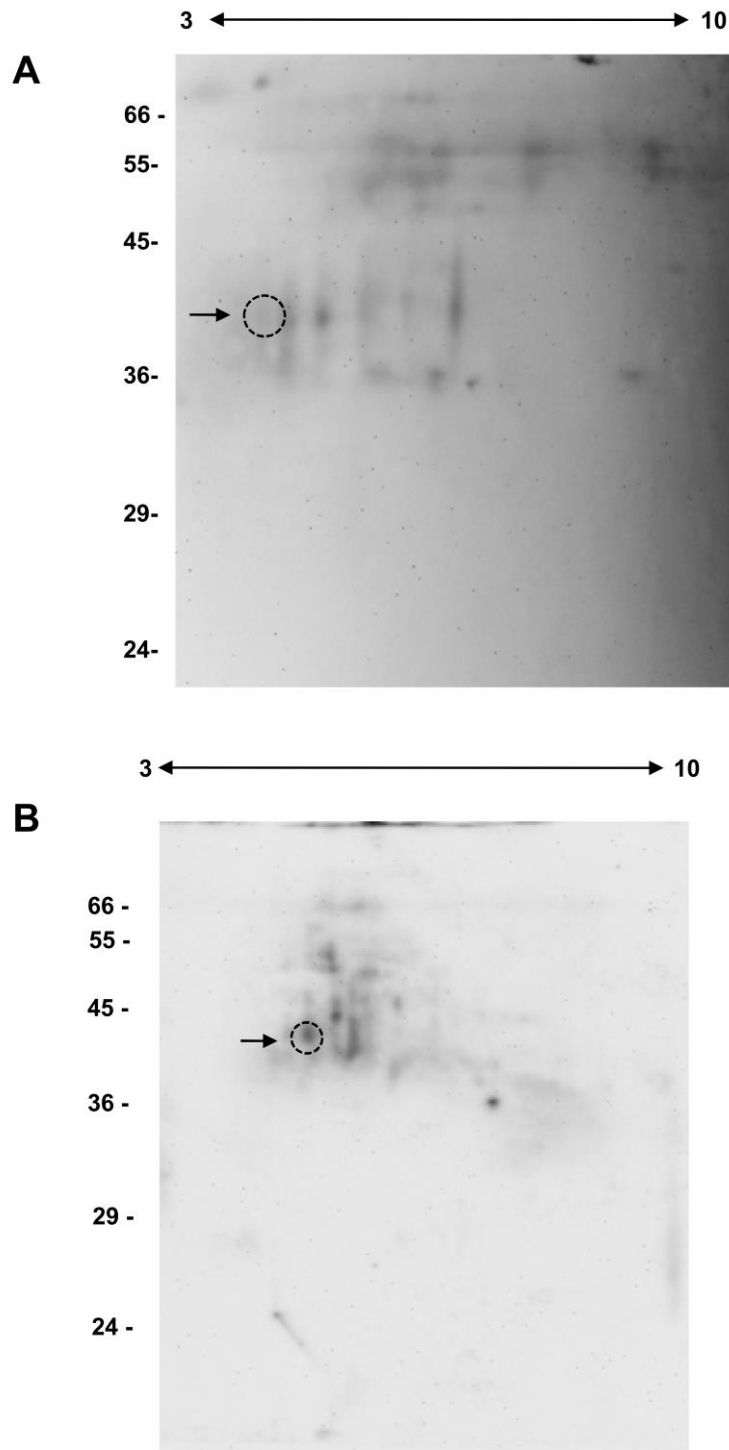


Figura 13.- Electroforesis en dos dimensiones, transferencia a membranas PVDF e immunoblotting. La fracción E4⁺ y el PSA fueron resueltos por electroforesis 2D y luego transferidos a membranas PVDF. La figura muestra el patrón de reconocimiento del AcMo E492/G1 de: (A) E4⁺ y (B) PSA.

8.- La proteína EgAxB18 contiene potenciales sitios de glicosilación.

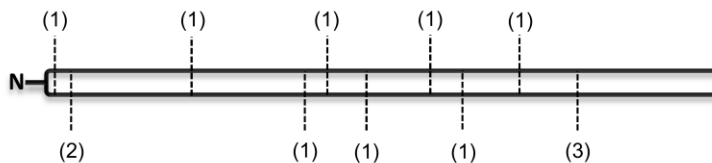
La secuencia codificante de la anexina B18 de *E. granulosus* fue obtenida a partir de la base de datos de GeneDB (Código: EgrG_000041200.1). Para identificar potenciales sitios de glicosilación fue realizado un análisis bio-informático utilizando los predictores NetNGlyc, NetGlycate y NetOGly.

Los resultados sugieren (Tabla 4) que esta proteína potencialmente posee sitios para N-glicosilación, O-glicosilación y además de glicaciones del grupo ϵ -amino de lisinas. Esto indica que las estructuras glucídicas presentes en componentes de la fracción E4⁺ podrían ser N-glicanos, lo que sería consistente con la hipótesis planteada. Sin embargo, es claro que es particularmente relevante, la realización de estudios más sistemáticos que demuestren la presencia de los distintos tipos de glicosilación.

A

Predictores potenciales de sitios de glicosilación EgAxB18			
Tipo de glicosilación	Posición	Residuo (frecuencia)	Programa
N-glicosilación	13	Asn (NPTL)	<i>NetNGlyc</i>
Glicación del grupo ϵ -amino	4	Lys	<i>NetGlycate</i>
	75		
	133		
	145		
	165		
	198		
	214		
244			
O-glicosilación	274	Thr	<i>NetOGlyc</i>

B Potenciales glicosilaciones en EgAxB18



C

N°	Tipo de glicosilación
1	Glicación del grupo ϵ -amino
2	N-glicosilación
3	O-glicosilación

Tabla 4.- Potenciales sitios de glicosilación en EgAxB18.

En base a la secuencia aminoacídica de la anexina EgAxB18 se analizó sus potenciales sitios y tipos de glicosilación. Para ello, se emplearon tres predictores informáticos: *NetNGlyc* (predictor de sitios de N-glicosilaciones), *NetGlycate* (predictor de glicaciones en el grupo ϵ -amino de lisinas), *NetOGlyc* (predictor de O-glicosilaciones). En (A) se muestran los resultados de los predictores, en donde se indican la glicación y las glicosilaciones que presenta la EgAxB18; la posición de las mismas en la proteína (contando el número de aminoácidos a partir del extremo N terminal), el residuo glicosilado y el programa empleado para cada resultado. En (B) se muestra un esquema lineal de la proteína, en donde se indica la posición de los sitios de glicosilación (marcados con líneas punteadas) y en (C) se detallan los tipos de glicosilación.

DISCUSIÓN

Los glicoconjugados de parásitos juegan un papel importante en la interrelación hospedero-parásito. Existen numerosos reportes que sugieren que los glicoconjugados de los parásitos helmintos son antigénicos, inmuno-dominantes e inmuno-moduladores (Harn *et al.*, 2009; van Die & Cummings, 2006, van Die & Cummings, 2010).

Particularmente, en el caso del helminto *E. granulosus* se ha reportado que una fracción antigénica enriquecida en carbohidratos, denominada E4⁺, ha mostrado tener actividades biológicas interesantes (Baz *et al.*, 1999; Baz *et al.*, 2008). En este sentido, varios estudios *in vitro* han demostrado la capacidad de la fracción E4⁺ de inducir la secreción de IL-10 tanto por células mononucleares de sangre periférica de pacientes con hidatidosis, y de manera por demás interesante, por células de individuos sanos (Cardozo *et al.*, 2002). Utilizando el modelo murino se ha mostrado que E4⁺ induce similares efectos sobre células peritoneal de ratones Balb/c infectados pero también sobre células peritoneales normales (Dematteis *et al.*, 2001; Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011b).

Estos resultados en su conjunto, sugieren que los componentes de E4⁺ podrían jugar un papel relevante en la interacción hospedero-parásito y podrían estar involucrados en mecanismos que permitan la sobrevivencia de *E. granulosus* tanto en humanos como en el modelo experimental.

Por lo tanto, el primer objetivo específico planteado en este trabajo fue analizar si los componentes de E4⁺ son capaces de inducir efectos similares *in vivo* a aquellos reportados *in vitro* (Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011b) y a aquellos disparados por el parásito durante la etapa temprana de la infección secundaria experimental (Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011a).

Así, el primer conjunto de experimentos se centró en estudiar qué efectos potenciales tiene la administración de E4⁺ en ratones de experimentación, a nivel local, es decir sobre células peritoneales y exudado de cavidad peritoneal.

Para esto, un grupo de ratones Balb/c fue inoculado vía i.p. con la fracción E4⁺, en ausencia de cualquier tipo de adyuvante, ya que ha sido ampliamente reportado que su uso podría condicionar el tipo de respuesta inducido a nivel local (Coffman *et al.*, 2010).

En primer lugar, se analizó si las células peritoneales de ratones inmunizados mostraban un aumento de los niveles de expresión de las citoquinas IL-10, IL-6 e IFN- γ . Los resultados obtenidos fueron similares a los descritos por Mourglia-Ettlin *et al.* (2011b). Es decir, un incremento significativo de los niveles de expresión de IL-10 e IL-6 y no detección de variaciones en los niveles de IFN- γ . Esto es por demás interesante, dado que la IL-10 es una de las citoquinas más relevantes en la regulación negativa de las respuestas tipo Th1 (Fishman & Perelson, 1994; Moore *et al.*, 2001; Mosmann & Moore, 1991; Saraiva & O'Garra, 2010) y en consecuencia responsable del tipo de respuesta de anticuerpos inducida. Por lo tanto, esta similitud en los efectos disparados por E4⁺ *in vivo* e *in vitro*, apoyan nuestra hipótesis que ciertos antígenos del parásito presentes en esta fracción podrían estar involucrados en potenciales mecanismos de evasión de la respuesta del hospedero experimental, así como en humanos.

Por otra parte, Mourglia-Ettlin *et al.*, (2011b) mostraron que E4⁺ es capaz de inducir *in vitro* la diferenciación de linfocitos B hacia células productoras de anticuerpos (ASC), analizando por citometría de flujo la expresión de las moléculas de superficie CD19 y CD138.

El proceso de diferenciación B hacia plasmocito (estadio de diferenciación terminal), está estrechamente regulado a nivel molecular por factores de transcripción específicos de estadio (Roth *et al.*, 2014; Shapiro-Shelef & Calame, 2005; Soro *et al.*, 1999). El factor de transcripción Pax5 (y BCL-6) mantienen al linfocito B en un estadio maduro, reprimiendo (entre otras funciones) la expresión de los factores de transcripción "maestros" del proceso de diferenciación hacia plasmocito: Blimp-1 (entre otros). Es decir que, en un proceso activo de diferenciación B sería esperable encontrar disminuidos los niveles de Pax5 y aumentados los niveles de Blimp-1. Por esta razón, en este estudio se analizó en células peritoneales de ratones inoculados con E4⁺, la expresión de estos dos factores de transcripción asociados con la diferenciación B. Los resultados (Figura 6B) muestran que se produce una disminución significativa de los niveles de Pax5 (tan pronto como al día 1 pi), pero no se pudo detectar un aumento en la expresión de Blimp-1. Esto no necesariamente contradice la hipótesis planteada, es decir que E4⁺ pueda inducir la diferenciación de las células B peritoneales, ya que no observar aumentos en la expresión de Blimp-1 podría estar en cierta forma asociada con algunos aspectos del diseño experimental. Por ejemplo, los puntos temporales seleccionados. El primer punto seleccionado fue el día 1 pi. y dado que E4⁺ fue inoculado en PBS, el estímulo podría no ser prolongado. A su vez,

resultados de Kallies *et al.*, (2007), sugieren que la inhibición de Pax-5 precede a la expresión de Blimp-1 y por tanto la diferenciación podría iniciar en ausencia de Blimp-1. En este sentido, podría especularse que las ASC inician su diferenciación (mostrando una disminución de Pax5, pero sin cambios en Blimp-1) y rápidamente podrían migrar de la cavidad peritoneal hacia sitios anatómicos de diferenciación final o nichos de supervivencia (Fairfax *et al.*, 2008; Hargreaves *et al.*, 2001; Kallies *et al.*, 2007; Roth *et al.*, 2014; Zehentmeier *et al.*, 2014).

Asumiendo que E4⁺ fuera capaz de inducir *in vivo* la diferenciación B hacia ASC, se realizó un estudio funcional. Es decir, se cuantificó la concentración de IgM total y de subclases totales de IgG en exudados de cavidad peritoneal de ratones inmunizados. Así, se observó (Figura 7) un aumento significativo de IgM total a partir del día 2 pi. En cuanto a las concentraciones de IgG1, IgG2a e IgG2b, no se observó una variación significativa con respecto a sus controles (Figura 7B y 7C). Sin embargo, con referencia a los niveles de IgG3 totales los resultados mostraron una cierta tendencia (Figura 7D) a un aumento, aunque no significativo, hacia el día 5 pi. Efectivamente, los niveles de IgG3 total fueron dos veces mayores que los observados en el grupo control, por lo menos en términos de medianas ($p=0.07$). Estos resultados son parcialmente coincidentes con los reportados por Mourglia-Ettlin *et al.* (2011b) que indican que E4⁺ induce *in vitro* la secreción de IgM, IgG3 e IgG2b. La respuesta de anticuerpos contra glicoconjugados de parásitos está asociada a una rápida producción de IgM e IgG3 (Eherenstein & Notley, 2010; Panda & Ding, 2015; Vale *et al.*, 2015).

Con respecto a la no detección de niveles significativos de IgG2b en exudados peritoneales de ratones inoculados con E4⁺ a diferencia de lo reportado *in vitro*, podría ser debida a diferentes causas. Sin embargo, la explicación que parecería ser más razonable es que los puntos temporales seleccionados para este estudio no fueron los adecuados. El cambio de clase a IgG2b (por ende su detección) podría tener una cinética de producción tal que sea imposible detectarla durante el corto periodo de tiempo analizado.

En resumen, hemos mostrado que los efectos disparados *in vivo* por E4⁺ a nivel local son bastante coincidentes a aquellos inducidos *in vitro*. Es decir: a) la inducción de IL-10 e IL-6 pero no de IFN- γ ; b) probable diferenciación de linfocitos B peritoneales hacia ASC; y c) inducción de la secreción de IgM y eventualmente de IgG3 totales.

Con respecto a los efectos disparados por el parásito vivo, Mourglia-Ettlin *et al.* (2011a) realizaron un estudio detallado sobre la expresión de diferentes citoquinas a nivel local (entre ellas IL-10, IL-6 e IFN- γ) en diferentes puntos temporales de la etapa temprana de la infección secundaria experimental. Los autores mostraron que particularmente en el día 5 p.i. los niveles de expresión de IL-10, IL-6 e IFN- γ estuvieron significativamente aumentados. Esta diferencia en la detección de IFN- γ en animales infectados y no en animales inmunizados con E4⁺ podría ser consecuencia de que los antígenos inductores de la expresión de IFN- γ no fueran componentes de la fracción E4⁺. Sin embargo, esta es una especulación que debería ser demostrada.

En cuando a la expresión de los factores de transcripción Blimp-1 y Pax5, Mourglia-Ettlin *et al.* (2011a), reportaron que el parásito es capaz de inducir un aumento significativo en los niveles de expresión de Blimp-1 asociado con una disminución significativa de los niveles de Pax5. Esta diferencia en la expresión de Blimp-1 entre ratones inmunizados (Figura 6B) y ratones infectados podría ser explicada por el hecho que, en el caso de la inoculación de PSC vivos, estos se mantienen retenidos en la cavidad peritoneal generando un estímulo antigénico continuo. Sin embargo, este no sería el caso con E4⁺ ya que el mismo fue inoculado sin adyuvante lo que podría implicar su posible rápida biodegradación tendiente a que parte de los efectos se indujeran de manera más rápida que aquellos en los cuales este antígeno está presente de forma persistente como es el caso de los cultivos *in vitro* o de la infección experimental.

En resumen, hay ciertas similitudes entre los efectos inducidos *in vivo* por E4⁺ y los disparados por el parásito durante la etapa temprana de la infección experimental. A pesar de ser resultados relativamente alentadores es importante tener en cuenta, como se mencionó anteriormente, que la cronicidad del estímulo en el caso de la infección es una variable importante a considerar.

Teniendo en cuenta la potencial relevancia de los efectos biológicos inducidos *in vivo* por la fracción E4⁺, el segundo objetivo específico de este trabajo consistió en tratar de identificar cuál/es componente/s de esta fracción podría/n estar involucrado/s en tales actividades biológicas.

Como se describió anteriormente, la resolución de los antígenos E4⁺ y PSA por SDS-PAGE (Figura 5) mostró que si bien esta fracción es menos compleja que PSA, está igualmente constituida por varios componentes.

El AcMo E492/G1 utilizado para la obtención de E4⁺ reconoce el motivo glucídico Gal α (1,4)Gal β (1,4,)GalNac (Lin *et al.*, 2013). Considerando que: a) Walker *et al.*, (2004) utilizando la misma estrategia que para la obtención de la fracción E4⁺ de *E. granulosus*, obtuvieron una fracción del metacestodo de *Echinococcus multilocularis* (que denominaron Em492) con similares características biológicas que la fracción E4⁺ : a) los autores reportaron que Em492 también resultó ser una fracción compleja conteniendo predominantemente O-glicanos y N-glicanos, posiblemente ricos en manosa, así como residuos N-acetil galactosamina; y b) una de las posibles estructuras propuesta (Figura 14A) por Khoo *et al.* (1997) presentes en componentes de PSA, es que se decidió comenzar por analizar la unión de diferentes lectinas a componentes de la fracción E4⁺ y posteriormente realizar un ensayo de inhibición de su unión utilizando sacáridos adecuados (Figura 8 y Figura 9). Este último análisis sugiere que tanto la WGA como la ConA son capaces de unirse a componentes de la fracción E4⁺. El análisis por blotting mostró (Figura 10) que la inhibición con metilmanosa evitaba la unión de ConA a tres componentes de E4⁺ con PM aparente de 55, 52 y 43 kDa. Esto sugiere que por lo menos tres componentes de E4⁺ podrían contener N-glicanos con una estructura consistente a la propuesta por Khoo *et al.* (1997) (Figura 14B). Esto podría estar apoyado por el hecho que, la lectina WGA también es capaz de unirse a componentes la fracción E4⁺ (Figura 8 y Figura 9) y las estructuras propuestas por Khoo *et al.*, (1997) también presentan N-acetil-glucosamina y su dímero, los cuales son reconocidos por la WGA (Allen *et al.*, 1973). Sin embargo, estos resultados no demuestran la ausencia de O-glicanos en por lo menos uno a más componentes de E4⁺.

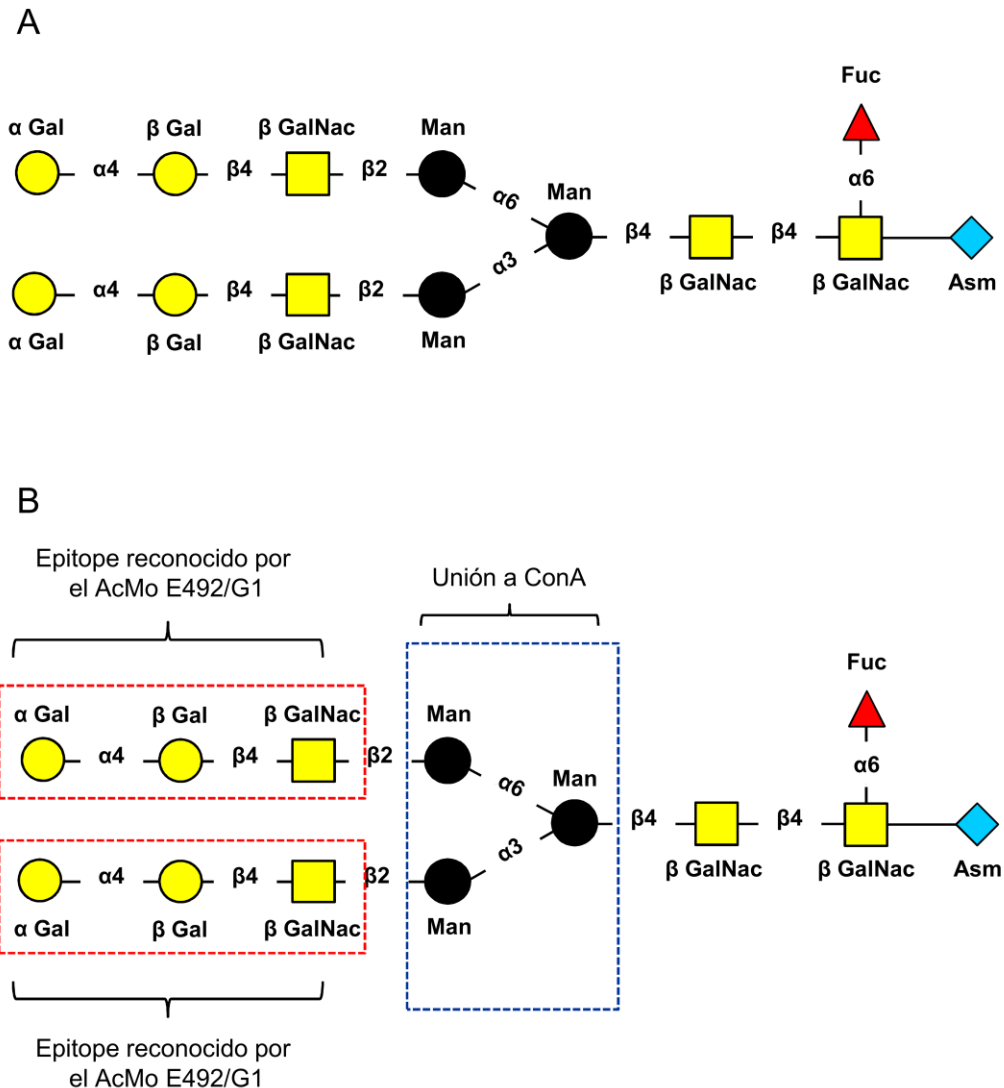


Figura 14.- (A) una de las estructuras propuesta por Khoo *et al.* (1997) de ciertos componentes de PSA. (B) resultados que podrían apoyar la existencia de este tipo de estructuras (N-glicanos) en componentes de la fracción E4⁺.

Por otra parte, dado que el análisis por espectrometría de masas de las bandas de E4⁺ resueltas por SDS-PAGE, no mostró homología de ninguna de estas con antígenos de *E. granulosus*, se consideró que este análisis podría estar afectado por un eventual alto grado de glicosilación de los diferentes componentes. Por esta razón, la fracción E4⁺ tratada con PGNasaF (Figura 11), fue luego resuelta por SDS-PAGE, para finalmente realizar un análisis de cada banda por espectrometría de masas. Nuevamente, este análisis mostró que ninguna de las bandas tenía homología con antígenos de *E. granulosus* (datos no mostrados). Por lo tanto, si fuera el grado de

glicosilación lo que estuviera afectando el resultado del análisis de espectrometría de masas, se deberían haber utilizado además enzimas capaces de escindir O-glicanos.

Por este motivo, se decidió resolver los componentes de E4⁺ y PSA por electroforesis bidimensional, es decir en función del PM y punto isoeléctrico. Posteriormente, se analizó por espectrometría de masas aquellos spots con similar PM y PI detectados en E4⁺ y PSA. Los resultados (Figura 12 y Tabla 3) indican que la Anexina B18 de *E. granulosus* ("Egr_000041200.1") (que denominaron a partir de aquí: EgAxB18) es un componente de la fracción E4⁺ y por ende de PSA. Este resultado se confirmó mediante immunoblotting utilizando el AcMo E492/G1 (Figura 13). Una vez identificada la secuencia de esta proteína, utilizando predictores bioinformáticos, se identificaron potenciales sitios de glicosilación y tipo de glicosilación (Tabla 4). Efectivamente, estos predictores mostraron que la EgAxB18 presentaría sitios potenciales de N-glicosilación, como habíamos presupuesto. Sin embargo, también mostraron la existencia de sitios potenciales de O-glicosilación así como glicación del grupo ε-amino de lisinas.

En este sentido, existen reportes donde se muestra que otras anexinas serían también reconocibles por ConA, y que incluso presentarían sitios potenciales de N-glicosilación en sus secuencias amino acídicas (Goulet *et al.*, 1992). Sin embargo, nuestros resultados claramente indican que un enfoque más sistemático debería ser realizado para identificar todas los tipos de estructuras glucídicas presentes por lo menos en EgAxB18.

Recientes investigaciones en proteómica de *E. granulosus* han mostrado la existencia de por lo menos 12 anexinas denominadas B1, B2, B3, B5, B15, B18, B20, B23, B24, B25, B33 y B38 (<http://www.structuralchemistry.org/annexins/seq/search.php>). A partir de análisis filogenéticos, basados en la inferencia bayesiana y la máxima diferencia de análisis de la probabilidad en dos casos Cantacessi *et al.* (2013) han mostrado que la anexina B18 es poco parecida al resto de las anexinas de *E. granulosus*. La implicancia de esta diferencia particular de la Anexina B18 del resto de las anexinas es aún desconocido.

Más allá de esto, este resultado es bien interesante teniendo en cuenta que se ha propuesto que las anexinas de parásitos podrían estar asociadas, entre otras funciones, con la modulación de la respuesta inmune del hospedero (Cantacessi *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2008).

CAPITULO 2

Anexina B18 de *E. granulosus*: potenciales funciones biológicas

INTRODUCCIÓN

Las anexinas desempeñan un papel clave en una gama de actividades biológicas fundamentales, incluyendo el metabolismo del calcio, la adhesión celular, el crecimiento y diferenciación y transporte subcelular, así como la reparación de la membrana (Cantacessi *et al.*, 2013).

Aunque la estructura del núcleo de la proteína es altamente similar, diferentes anexinas participan en distintos procesos fisiológicos, por ejemplo: la fusión de membranas y la exocitosis; la regulación de los canales iónicos; la respuesta inflamatoria; la angiogénesis y la inhibición de la coagulación de la sangre, etc. (Wang *et al.*, 2006). Las Anexinas son generalmente proteínas citosólicas, con mezclas de tanto de una forma soluble y una forma estable o reversible asociada con componentes del citoesqueleto o proteínas que median las interacciones entre la célula y la matriz extracelular (Moss & Morgan, 2004).

En el caso de las anexinas de parásitos, se considera que podrían tener un papel crítico en los mecanismos vinculados a su supervivencia, incluido el mantener la integridad de la estructura celular, y la modulación de la respuesta inmune de los hospedadores vertebrados. Debido a que las anexinas se localizan en la interface hospedero-parásito y a sus propiedades inmunogénicas, se ha propuesto que estas proteínas podrían ser blancos potenciales de nuevos candidatos a fármacos y en el desarrollo de vacunas (Cantacessi *et al.*, 2013).

Recientemente, las investigaciones sobre proteómica de *E. granulosus* ha mostrado la existencia de por lo menos 12 anexinas. La anexina B33 pudo ser detectada en productos excretados/secretados y en líquido hidático (Virginio *et al.*, 2012; Aziz *et al.*, 2011). Los autores sugieren que esta proteína podría potencialmente cumplir un papel importante en mecanismos de sobrevida del parásito durante la infección (Virginio *et al.*, 2012; Aziz *et al.*, 2011). Más recientemente, Song *et al.*, (2016) confirmaron la presencia de la anexina B33 en líquido hidático.

A partir de análisis filogenéticos, basados en la inferencia bayesiana y la máxima diferencia de análisis de la probabilidad en dos casos (Cantacessi *et al.*, 2013) han mostrado que la anexina B18 es poco parecida al resto de las anexinas de *E. granulosus*. La razón del por qué esta diferencia es aún desconocida.

Tomando estos resultados en su conjunto, es posible plantearse como hipótesis que la anexina B18 podría tener un potencial papel inmuno-modulador de la respuesta del hospedero hacia una respuesta permisiva al establecimiento de la infección experimental.

Objetivos específicos

- 1.- Obtención de la proteína recombinante Anexina B18 de *E. granulosus*.
- 2.- Evaluar la inmunogenicidad de la rEgAxB18 en ratón y en conejo.
- 3.- Analizar la capacidad de rEgAxB18 de interactuar con células peritoneales de ratones Balb/c normales.
- 4.- Analizar la presencia de la EgAxB18 en productos de excreción/secreción de protoscoleces cultivados *in vitro*.
- 5.- Analizar si anticuerpos generados por ratones experimentalmente infectados con protoscoleces de *E. granulosus* de la cepa Balb/c y de la cepa C57Bl/6 tienen la capacidad de reconocer la proteína rEgAxB18.
- 6.- Analizar el efecto de la transferencia pasiva de anticuerpos anti-rEgAxB18 sobre el resultado de la infección secundaria experimental por *E. granulosus*.

MATERIALES & METODOS

1- Preparación de la anexina B 18 de *E. granulosus* recombinante

1.1- Preparación del vector de expresión.

La secuencia codificante de la anexina B18 de *E. granulosus* (EgAxB18), identificada por espectrometría de masas, fue obtenida utilizando la base de datos de *GeneDB* (Código: EgrG_000041200.1).

La secuencia fue sintetizada, optimizada (para su expresión en *E. coli*) y clonada en el vector pET28a(+) (GenScript HK Limited). Se emplearon los sitios de restricción para las enzimas *NdeI* y *BamHI*, de modo de incorporarle una *HisTag* (cola de 6 histidinas) en su extremo N terminal (GenScript HK Limited). Finalmente, el vector con el inserto fue solubilizado en H₂O MilliQ estéril, a una concentración de 0.1 µg/mL y fue conservado a -20°C.

1.2.- Transformación de *E. coli DH5α* competentes por electroporación

La obtención de copias del plásmido fue realizada transformando bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) *DH5α*, según (Sambrook & Russell, 2001) con algunas modificaciones. Brevemente, 0,1 µg del plásmido fueron mezclados con 40 µL de células *DH5α* electrocompetentes (Lucigen®). Luego, la mezcla fue transferida a una celda de electroporación fría, y expuesta a un pulso de 2500 V (*time*: 5.9), empleando el equipo MicroPulser (BioRad) y el programa Ec2. Posteriormente, las células fueron recuperadas incubándolas con 500 µL de medio de cultivo LB (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%), con glucosa al 20% durante 1 h a 37°C (agitación: 220 r.p.m.). Finalmente, las células fueron sembradas en placas con LB - agar 1.5% con 50 µg/mL de Kanamicina (LBK agar), incubando toda la noche a 37°C.

1.3.- Extracción de ADN plasmídico.

La extracción del ADN plasmídico fue realizada por Lisis alcalina según (Sambrook & Russell, 2001) con algunas modificaciones. Brevemente, se realizó un cultivo de las células *DH5α* transformadas, incubando cada colonia con 3 mL de LBK (medio LB más 50 µg/mL de Kanamicina) durante toda la noche a 37 °C, con agitación (220 rpm). A

continuación, se centrifugó a 5000 r.p.m., durante 15 min a 8°C. El pellet bacteriano fue resuspendido en 200 µL de la solución I (50 mM glucosa, 25 mM Tris-Cl pH8, 10 mM EDTA pH 8), agregando 1 µL de ARNasa 0.1 mg/mL (Fermentas). Luego, fueron agregados a la mezcla 200 µL de solución II (0,2N NaOH, 1% SDS), agitando suavemente por inversión e incubando durante 3 min a temperatura ambiente. Posteriormente, fueron agregados 200 µL de solución III (60 mL acetato de potasio 5 M, 11,5 mL ácido acético glacial, 28,5 mL de agua), mezclando lentamente por inversión y centrifugando durante 5 min a 12000 r.p.m. El sobrenadante fue recuperado, y se le agregó 600 µL de isopropanol, mezclando por inversión e incubando durante 3 min a temperatura ambiente. Nuevamente, se centrifugó durante 10 min a 12000 r.p.m., descartando el sobrenadante. El pellet (ADN) se lavó con 500 µL de etanol al 70%, se centrifugó (5 min a 12000 r.p.m.), se descartó el sobrenadante y el pellet se dejó secar. El ADN plasmídico fue resuspendido en H₂O MilliQ estéril, seguidamente se dejó a 60°C por 15 min, y finalmente se conservó a -20°C hasta su uso.

1.4.- Electroforesis en geles de agarosa

El control del estado del ADN plasmídico obtenido fue realizado utilizando geles de agarosa. Para esto, se preparó un gel de agarosa al 1% en TAE 1x (Tris 40 mM, ácido acético 40 mM, EDTA 1 mM), conteniendo Bromuro de etidio en una concentración final de 0.5 mg/mL. Luego, fueron dispensados 5 µL de ADN en H₂O MilliQ estéril y buffer glicerol 50%, EDTA 0.2 M pH 8.3 con azul de bromofenol 0.05%. El gel se corrió a 100 V por 15 min, y posteriormente se visualizó el ADN por exposición a la luz UV.

1.5.- Transformación de *E .coli* BL21[DE3]

Para expresar la proteína rEgAxB18 se transformaron células de *Escherichia coli* (*E .coli*) BL21[DE3] electrocompetentes (Lucigen®), siguiendo el procedimiento descrito en el ítem (1.2). En este caso, se transformaron dos alícuotas de 50 µL cada una. Una de ellas, fue transformada con 0.1 µg del plásmido (pET28a(+)) con la anexina, y la otra alícuota se transformó con 0.1 µg del plásmido pET28a(+) sin inserto (control).

1.6.- Expresión de la rEgAxB18

Las bacterias *E. coli* ya transformadas, fueron cultivadas durante 16 h en 10 mL de LBK. A continuación, se diluyó el mencionado cultivo hasta un volumen final de 500 mL de LBK, y se dejó crecer el cultivo a 37°C con agitación, hasta que alcanzó una densidad óptica de 0.6 aproximadamente a 600 nm (espectrofotómetro UV-120-02, Shimadzu). En este punto, se indujo la expresión de la anexina recombinante con el agregado de 500 µL de IPTG 1 M, e incubando el cultivo a 20°C con agitación durante 22 h. Finalmente, el cultivo fue centrifugado a 4°C, durante 15 min a 5.000 r.p.m., y el *pellet* celular fue conservado hasta su uso a -80°C en un volumen mínimo de PBS.

1.7.- Extracción y purificación de la rEgAxB18

La extracción de la rEgAxB18 expresada en las *E.coli* inducidas, fue realizada lisando las bacterias y recolectando la fracción soluble, según Schmidt *et al.* (2005) con algunas modificaciones. Para ello, el *pellet* celular fue descongelado y centrifugado a 4°C, durante 15 min, a 5000 r.p.m. Después de descartar el sobrenadante, el *pellet* fue resuspendido en buffer de lisis (3% Nonidet P40, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA), y fue disgregado por ultrasonido al 50% de la potencia máxima por 20 min, con un pulso al 30% (Omni-Ruptor 4.000, de OMNI International Inc). Posteriormente, se continuó trabajando con la fracción soluble, a partir de la cual se purificó la rEgAxB18 mediante afinidad de la cola de histidinas a una resina de níquel - agarosa (Ni-NTA Agarose, Invitrogen), previamente empaquetada en una columna. A continuación, la columna fue equilibrada con PBS y luego se sembró la fracción soluble (diluida 4 veces en PBS y con imidazol al 20 mM). Seguidamente, la columna fue lavada con PBS más imidazol 20 mM, y proteínas retenidas fueron recuperadas por elución con imidazol al 500 mM. A continuación, para eliminar de la mezcla el imidazol así como posibles restos del buffer de lisis, el eluato fue purificado por "desalting" (gel filtración) utilizando una columna PD-10 (*Desalting Columns*, de GE Healthcare).

Finalmente, la concentración de proteínas fue cuantificada utilizando el método del ácido bicinonínico (BCA), empleando el *kit* comercial QuantiPro™ BCA Assay Kit (SIGMA), siguiendo las instrucciones del fabricante, y luego la rEgAxB18 fue conservada a 4°C.

1.8.- Control de la proteína recombinante rEgAxB18.

Como control la muestra fue resuelta por SDS-PAGE desnaturalizante al 10%, y la banda visualizada por tinción con nitrato de plata, fue enviada a analizar por Espectrometría de Masas (MS/MS), a la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica del Instituto Pasteur de Montevideo.

2.- Inmunogenicidad de rEgAxB18.

2.1.- Inmunización de ratones.

En el día 0 del experimento, un grupo de ratones normales Balb/c (n=13) fueron inoculados por vía ip, con 100 µl de rEgAxB18 en ACF (30 µg/ratón). En el día 30, una segunda inoculación ip con 100 µl de rEgAxB18 en AIF (15 µg/ratón) fue realizada. En el día 55 del experimento, todos los animales, previa anestesia, fueron sangrados a punto final. Los sueros de cada individuo fueron conservados a -70°C.

Un segundo grupo de ratones Balb/c normales (n=5), fueron inoculados en los días 0 y 30 con PBS en ACF y con PBS en AIF respectivamente (grupo control).

2.2.- Inmunización de un Conejo.

Un conejo Neozelandés fue inoculado en el día 0 con 300 µg de rEgAxB18 en ACF por vía subcutánea. En el día 30, el conejo fue inoculado con 150 µg de la proteína recombinante en AIF por vía intramuscular. El conejo fue sangrado en los días 0, 30 y 60 y los sueros fueron conservados a -70°C.

2.3.- Determinación de anticuerpos específicos contra rEgAxB18 en suero de ratón o de conejo por ELISA.

Muy brevemente, placas de microtitulación de 96 pocillos fueron sensibilizadas con 5 µg/mL de rEgAxB18 diluida en PBS, incubando toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Luego, las placas fueron bloqueadas con 200 µL/pocillo de PBS-BSA, incubando durante 1h. a temperatura ambiente. Posteriormente, fueron dispensados 100 µL/pocillo de los sueros diluidos (ratón o conejo) en PBS-BSA-T incubando durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, fueron dispensados 100 µL/pocillo de anti-IgM de ratón o anti-IgG de ratón acoplados a peroxidasa (Sigma) o anti-IgG de

conejo-PO, todos diluidos en PBS-BSA-T. Las placas fueron incubadas durante 1 h a 37°C. Finalmente, la actividad de la peroxidasa fue detectada por dispensación de una solución de H₂O₂ como sustrato y ortofenilendiamina (OPD) como cromógeno. La reacción se detuvo con 50 µL por pocillo de H₂SO₄ 3M y la absorbancia fue medida 492 nm en un lector para microplacas (Titertek Multiscan Plus, Low Laboratories, Helsinki, Finlandia).

3.- Obtención de y globulinas de conejo por precipitación con sulfato de amonio.

La fracción y globulina del suero del conejo inmunizado fue obtenida por precipitación con sulfato de amonio según Harlow & Lane, (1988). Brevemente, 30 mL de suero de conejo fue centrifugado a 3.000 r.p.m. durante 30 min y diluido al medio con PBS. Un volumen igual de una solución saturada de sulfato de amonio (760g/L en H₂O destilada) fue agregada lentamente y con agitación suave. La mezcla fue posteriormente incubada durante 1 h a temperatura ambiente. Luego de centrifugar a 10.000 r.p.m. durante 20 min a 4°C, y la fracción insoluble fue lavada 2 veces con (NH₄)SO₄ al 50%. Finalmente, la fracción insoluble fue resuspendida en un volumen mínimo de PBS y dializada contra PBS durante 48 h.

4.- Obtención de los productos de excreción/secretión de protoscolec es en cultivo.

Los PSC de *E. granulosus* fueron incubados *in vitro* en RPMI 1640 suplementado con gentamicina, penicilina, estreptomycin a y anfotericina B (40 µg/mL, 100 U/mL, 100 µg/mL y 0.25 µg/mL respectivamente) a 37°C en atmósfera de CO₂ (5%). Los sobrenadantes fueron removidos cada 2 días durante un tiempo total de 8 días de cultivo, y luego de centrifugar durante 7 min a 1200 r.p.m, fueron conservados a -20°C. Todos los sobrenadantes obtenidos fueron mezclados, dializados contra agua destilada a 4°C con agitación, y luego liofilizados (Christ Alpha 1-4 LD plus). Finalmente, la mezcla liofilizada fue resuspendida en un volumen mínimo de PBS. La concentración proteica fue determinada por espectrofotometría (Nanodrop 1000, Thermo Scientific).

5.- Determinación de EgAxB18 en productos de E/S por SDS-PAGE e inmunoblotting.

Los productos de E/S (20 µg) fueron resueltos por SDS-PAGE al 10%, el PSA (20ug) y la rEgAxB18 (3 ug) fueron utilizados como control. Posteriormente, fueron transferidos a una membrana de PVDF durante 1 h a 0,8mA/cm² de membrana, luego bloqueada con PBS-BSA 1% durante toda la noche a 4°C y finalmente la membrana fue recortada en tiras. Cada tira fue incubada durante toda la noche a 4°C, con: a) la fracción y globulina de conejo, b) la fracción y previamente incubada (durante 1 h a temperatura ambiente y agitación) con bacterias *E. coli* BL21 muertas (3 ciclos de congelado/descongelado a -80°C), y c) PBS-BSA-T como control. Luego de descartar el sobrenadante, las tiras fueron lavadas 10 veces con PBS-T con agitación a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron durante 1 h a 37°C con una dilución apropiada de anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa. Luego, fueron lavadas 10 veces con PBS-T y la última vez con PBS. Finalmente, la actividad peroxidasa fue determinada quimioluminiscencia utilizando el kit *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las imágenes fueron obtenidas utilizando el equipo G:BOX (Syngene).

6.- Acoplamiento de la proteína recombinante a Isocianato de Fluoresceína.

El acoplamiento de la proteína rEgAxB18 (1 mg) y de BSA como control, fue realizado siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, ambas proteínas fueron primero dializadas durante toda la noche contra buffer NaHCO₃ 0,1M pH 9. Posteriormente, 500 µL de isocianato de fluoresceína (FITC) (Pierce) en DMSO fueron agregados en alícuotas de a 5 µL agitando vigorosamente, luego fueron incubados durante 8 h a 4°C en oscuridad y finalmente se dializaron contra PBS durante 24 h en oscuridad. Como control de conjugación se utilizó la relación FITC/Proteínas, la cual fue estimada midiendo las Abs₄₉₅ / Abs₂₈₀, corroborando que el valor de la misma estuviera dentro del rango de 0,3 a 1,0. Finalmente, las dos proteínas (rEgAxB18-FITC y BSA-FITC) fueron conservadas a 4°C en oscuridad.

7.- Obtención de células peritoneales de ratones Balb/c normales.

Un grupo de ratones Balb/c normales (n=5) fueron sacrificados por dislocación cervical previa anestesia. La cavidad peritoneal de cada ratón fue lavada con 5 mL de medio de cultivo RPMI 1640 frío suplementado con 2% de suero fetal bovino (FCS) de-complementado (PBS-FSC). La suspensión celular obtenida fue centrifugada a 1200 r.p.m durante 7 min a 4 °C. Las células fueron recuperadas y resuspendidas en PBS-FSC. El número de células y su viabilidad en la suspensión fue determinado utilizando cámara de Neubauer, y tinción vital con azul de Tripán.

8.- Análisis de la unión rEgAxB18 a células peritoneales normales por citometría de flujo.

En una placa de 96 pocillos de fondo redondo fueron dispensadas 2×10^6 células/pocillo, se centrifugó a 1200 r.p.m durante 7 min a 4 °C y luego se bloquearon los receptores Fc (Mouse BD *Fc block*, Becton Dickinson) por incubación durante 20 min a 4 °C. Luego de lavar las células, éstas fueron incubadas con una dilución apropiada de la fracción E4⁺ diluida en PBS - BSA (0,5%) - NaN₃ (0,02%) (PBS-BSA-Az), durante 30 min a 4 °C. Posteriormente, una dilución apropiada en PBS-BSA-Azida de anti-CD19-PE, el control isotípico correspondiente (todos (Pharmingen, Becton Dickinson), rEgAxB18-FITC y BSA-FITC, fueron incubadas con las células durante 30 min a 4°C en oscuridad. Luego de lavar, las células fueron resuspendidas en PBS y analizadas en un citometro de flujo (FACScalibur, Becton Dickinson) utilizando el *software* de análisis *Cell Quest*.

9.- Infección secundaria experimental de ratones Balb/c y C57BL/6.

Un grupo de ratones Balb/c normales (n= 9) y otro de ratones C57Bl/6 normales (n= 10) fueron inoculados por vía ip con 200 µL/ratón de una suspensión en PBS estéril de 2000 protozoos vivos. Otros dos grupos de ratones Balb/c (n=6) y C57Bl/6 (n=4) inoculados por vía ip con 200 µL de PBS estéril/ratón fueron utilizados como grupos control. Todos los animales fueron sangrados en las semanas 1, 2 y 3 post-inoculación y el suero de cada individuo fue conservado a -80°C.

10.- Detección por ELISA de anticuerpos séricos contra la rEgAxB18

El título de IgM e IgG contra rEgAxB18 en suero de cada individuo fue determinado por un ELISA similar al descrito en el ítem (2.3). Una mezcla de sueros positivos fue utilizada como estándar para cada cepa, definiendo un título arbitrario expresado en Unidades Arbitrarias por mililitro (UA/mL). Con valores de Ab y UA/mL del estándar se construyó una recta de mínimos cuadrados con el mejor ajuste y las Abs_{450nm} de los sueros se interpolaron para obtener el título de cada muestra en UA/mL.

11.- Transferencia pasiva, desafío y evaluación del resultado de la infección en ratones Balb/c.

La transferencia pasiva y la evaluación de la infección se realizó según (Mourglia-Ettlin *et al.*, 2016b), con algunas modificaciones. Brevemente, un grupo de ratones Balb/c (n=8) fue inoculado por vía ip con 300 µL de una mezcla de los sueros (diluidos al medio en PBS) de ratones Balb/c inmunizados con la proteína rEgAxB18.

Un segundo grupo de ratones (n=6) fue inoculado por vía ip con 300 µL de una mezcla de sueros de ratones Balb/c normales (diluidos al medio en PBS), siendo este uno de los grupos control. Un tercer grupo de ratones (n=6) inoculado por vía ip con 300 µL de PBS estéril fue utilizado como segundo grupo control.

Luego de 24 h de realizada la transferencia de sueros, todos los animales fueron inoculados con 200 µL/ratón de una suspensión en PBS conteniendo 2.000 PSC vivos. A los 8 meses post-inoculación, todos los animales fueron sacrificados, previa anestesia, por dislocación cervical. El resultado de la infección fue evaluado: a) contando el número de quistes en cavidad peritoneal de cada ratón y b) por medida del diámetro de cada quiste.

12.- Análisis Bio-informáticos.

Empleando la secuencia aminoacídica de la Anexina B18 de *E. granulosus* (GeneDB: EgrG_000041200), se analizó mediante predictores informáticos las vías posibles de excreción/secreción, y los potenciales epitopes T capaces de ser acomodados en las moléculas de MHC de clase II de las cepas Balb/c (H2-IAd) y C57BL/6 (H2-IAb).

Para determinar si la proteína EgAxB18 podría ser secretada por vía clásica (presentando péptido señal) o no clásica (sin péptido señal), se emplearon los

predictores *SignalP* (Petersen *et al.*, 2011) y *SecretomeP* (Bendtsen *et al.*, 2004) respectivamente.

Para la determinación de potenciales epitopes T capaces de acomodar en la molécula de MHC de clase II de ratón (haplotipo H2-IA_d en Balb/c y haplotipo H2-IA_b en C57Bl/6), se emplearon los programas *on-line* de la Immune Epitope Database and Analysis Resource (<http://www.iedb.org/>) (Nielsen & Lung, 2009).

13.- Análisis estadístico

Para evaluar diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupos experimentales y sus controles, fue utilizado el test no paramétrico de Mann-Whitney-Wilcoxon.

RESULTADOS

Dado que las anexinas podrían ser proteínas relevantes en la interrelación hospedero-parásito (Song *et al.*, 2016; Virginio *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2008), el siguiente conjunto de experimentos estuvo centrado primero en la obtención de la proteína recombinante (rEgAxB18) y posteriormente en el estudio de ciertas características de la misma desde el punto de vista funcional.

1.- Obtención de la proteína recombinante y control por espectrometría de masas.

La secuencia de la EgAxB18 obtenida utilizando la base de datos GeneDB fue sintetizada, clonada en el vector pET28a(+), expresada en *E. coli* BL21[DE3] y luego fue controlada por análisis de espectrometría de masas. La secuencia de la EgAxB18 clonada se muestra en la Figura 15A y el control por MALDI-TOF/TOF se muestra en la Figura 15B.

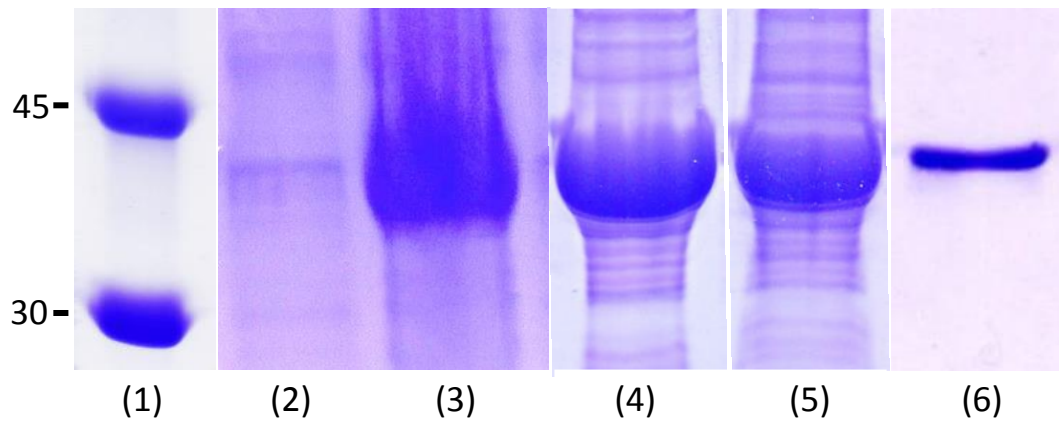
A.- Secuencia de la Anexina B18 recombinante

CAT

```
ATGAGCATCAAGGTTACCAACTGCGGTCTGCCGTGCAATCCGACCCTGCGCCCCTATCCGAAC
TTCAACGCGAATAGCGACGTGGAGCTGCTGAAGAAAGCGATGGACGGTATGGGCACCGATGAG
GCGATGATCATTGAAATCCTGGGTACCCGTACCAGCCAGCAACGTGTGGAGATTGCGGAAGCG
TACAAGGGTAGCTATGGCGAGGACCTGCGTGAAAAACTGCAGGGCGAGCTGAGCGGTGACTTC
GGCGAACTGGTTGATCTGATGTTTTACACCATCCCGGAGCTGAAGGCGCAACTGTGCTATGAC
GCGATTAACGGTGCGGGCACCGATGAGCTGGCGCTGATCGAAGTGATTTGCACCAGCACCAAC
AGCGAGATCGAGGAACTGAAGAAAGAATACGCGAAGGTTTGCCAGAACCACGGTAAAGCGGGC
AACGAGAACAGCCTGGAAAAGGACGTGGTTGGTGATACCAGCGGCTATTTCAAACGTATTCTG
GTTGCGCTGCTGGCGGCGCAACGTCATGAGCCGACCGAACAGCAACTGAAAGACATCGCGAA
CCGTGGCATTGACAGCATCATTGATAAGAAAAGCGGCGGAGGCGGATGCGCAGAAGCTGTACGA
TGCGGGTGAAAAACGTCTGGGCACCGATGAGGAAAGCGTTCATCACCATTCTGTGCACCCGTAG
CCCGTGGCAACTGATCGCGATTAGCAAGGCGTATGAGAAGATCAGCAAACCTGCGTCTGGTGG
GGCGATTGCGAGCGAAACCAAGGGTGACTTTTCGTGCTGCGCTGCTGACCACCTGCTGGCGA
ACACCAACACCCCGATGGCGTTCGCGGAACACTTTAACGATGGCCTGAGCGGTGCGGGCACC
AACGACGATCAGTGATGCGTCTGATCGTGGCGTAGCGAGGTTGACATGAAGGAAATTTAA
AACTGCTACCTGACCCGTTATAACCGTGATCTGGTTGACGATATCAAAGACGATACCAGCGGTG
ATTACGAGAAACTGCTGGTTCGCCTGCTGGGTAGCCAATAA
```

GGATCC

B.- Expresión de la rEgAxB18 y seguimiento por SDS-PAGE.



C.- Control de la Anexina B18 recombinante por MALDI/TOF/TOF

Masa Molecular en el gel (kDa)	Proteína identificada por espectrometría de masa	Masa Molecular Teórica (kDa)
38	Identifica como rEgAxB18 con una cobertura del 52%.	41

Figura 15.- Obtención y control de EgAxB18 recombinante.

La secuencia en nucleótidos de la rEgAxB18 fue sintetizada y optimizada para su expresión en *E. coli*. En (A) se muestra la secuencia optimizada y en celeste se indican las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción (NdeI y BamHI) utilizadas para clonarla en el vector pET28(a). En (B) se muestra el seguimiento de la expresión y obtención de la rEgAxB18 de forma soluble. A partir de la fracción soluble del lisado de las bacterias, se purificó la rEgAxB18 empleando la columna de Ni-NTA agarosa. Se muestra en: (1) el Kit PM; (2) lisado de bacterias previamente cultivadas sin inducir (sin IPTG); (3) lisado de bacterias previamente cultivadas e inducidas (con IPTG); (4) fracción insoluble del lisado de *E. coli* previamente inducidas; (5) fracción soluble del lisado de *E. coli* previamente inducidas; (6) rEgAxB18 purificada por la columna Ni-NTA agarosa. Finalmente, (C) la expresión de rEgAxB18 fue corroborada por espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF).

2.- rEgAxB18 induce una respuesta de anticuerpos específica tanto en ratones Balb/c como en conejo.

Para analizar la inmunogenicidad de rEgAxB18, un grupo de ratones Balb/c normales (n=13) fueron inoculados por vía i.p. con, 30 µg de la proteína recombinante en ACF y luego con 15 µg en AIF. Un grupo de ratones normales (n=5) inoculados con PBS en ACF y luego en AIF fue utilizado como grupo control. Los títulos de IgM y de IgG específicas en suero de cada individuo 15 días después de la última inoculación fueron determinados por ELISA. Los resultados mostrados en las Figuras 16A y 16B indican que rEgAxB18 induce una respuesta significativa de IgM e IgG específicas 2 y 13 veces mayores respectivamente (en términos de mediana) que los ratones control.

Por otra parte, la proteína recombinante es capaz de inducir la producción de IgG específicas en un conejo Neozelandés (Figura 16C). En términos de Ab492 nm las IgG al día 60 post-inoculación fue 20 veces mayor que aquella observada en el día 0.

3.- rEgAxB18 es capaz de unirse a células peritoneales de ratones Balb/c normales.

Mourglia-Ettlin *et al*, (2011b) reportaron que componentes de la fracción E4⁺ fueron capaces de unirse a células B peritoneales de ratones Balb/c normales. Dado que EgAxB18 es un componente de esta fracción, se realizó un análisis similar por citometría de flujo. Los resultados (Figura 17) sugieren que rEgAxB18 es capaz de unirse a un alto porcentaje de células B (CD19⁺) peritoneales normales (Figura 17 D). Se utilizó para este ensayo BSA como control (Figura 17C).

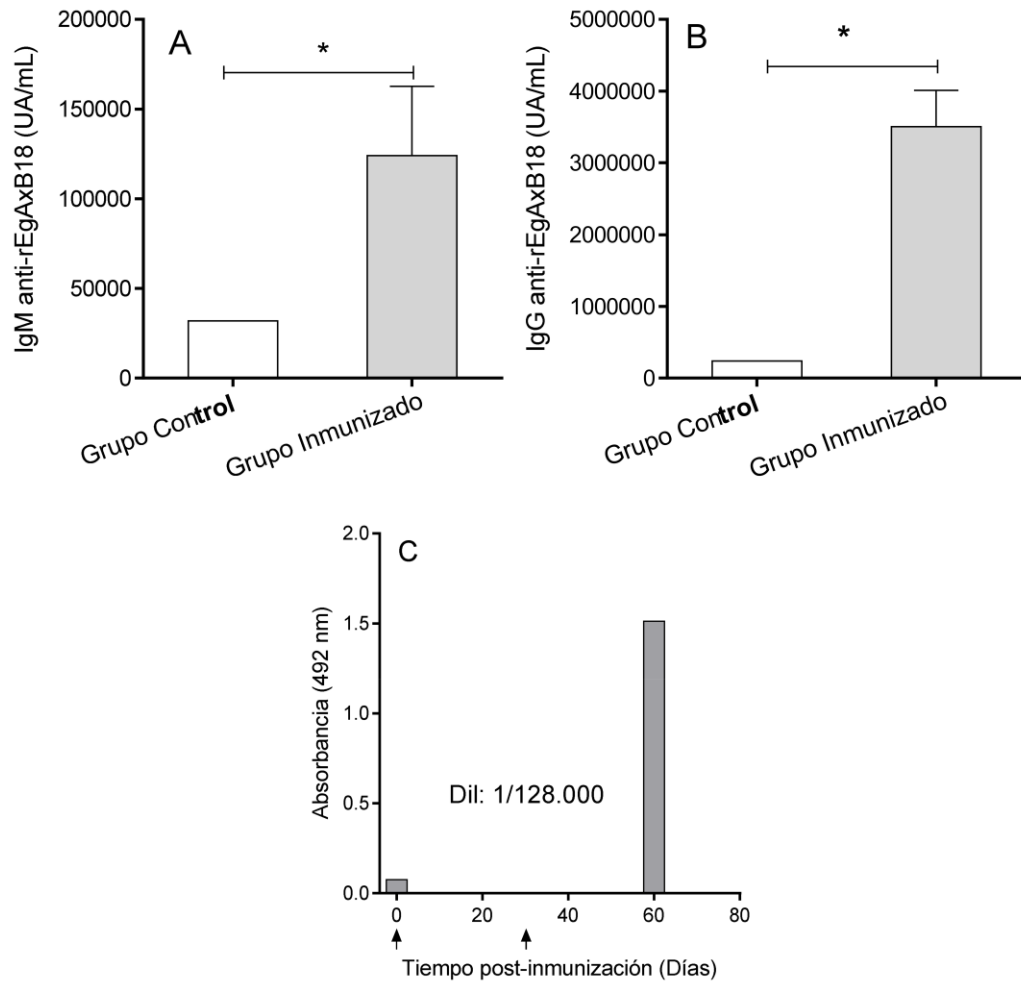


Figura 16.- Análisis de la inmunogenicidad de rEgAxB18 en ratón y en conejo.

Para analizar la inmunogenicidad de rEgAxB18 en ratón, en el día 0 del experimento un grupo de ratones Balb/c (n=13) fueron inoculados con 30 µg de rEgAxB18/ratón en ACF y posteriormente en el día 30 se les inoculó con 15 µg de rEgAxB18/ratón en AIF. Un segundo grupo de ratones normales (n=5) fueron inoculados en los días 0 y 30 con PBS en ACF y en AIF, respectivamente. En el día 55 del experimento todos los ratones fueron sangrados, previa anestesia a punto final y los sueros fueron conservados a -70 °C, hasta su uso posterior. En (A) se muestra el título de IgM específicas anti-rEgAxB18 y en (B) el título de IgG específicas anti-rEgAxB18, ambos determinados por ELISA. En paralelo, un conejo Neozelandés fue inoculado en el día 0 con 300 µg de rEgAxB18 en ACF y el día 30 con 150 µg de la proteína en AIF. En (C) se muestra la Abs a 492nm para una dilución 1/128.000 del suero (IgG específicas anti-rEgAxB18). Las inoculaciones se indican con flechas.

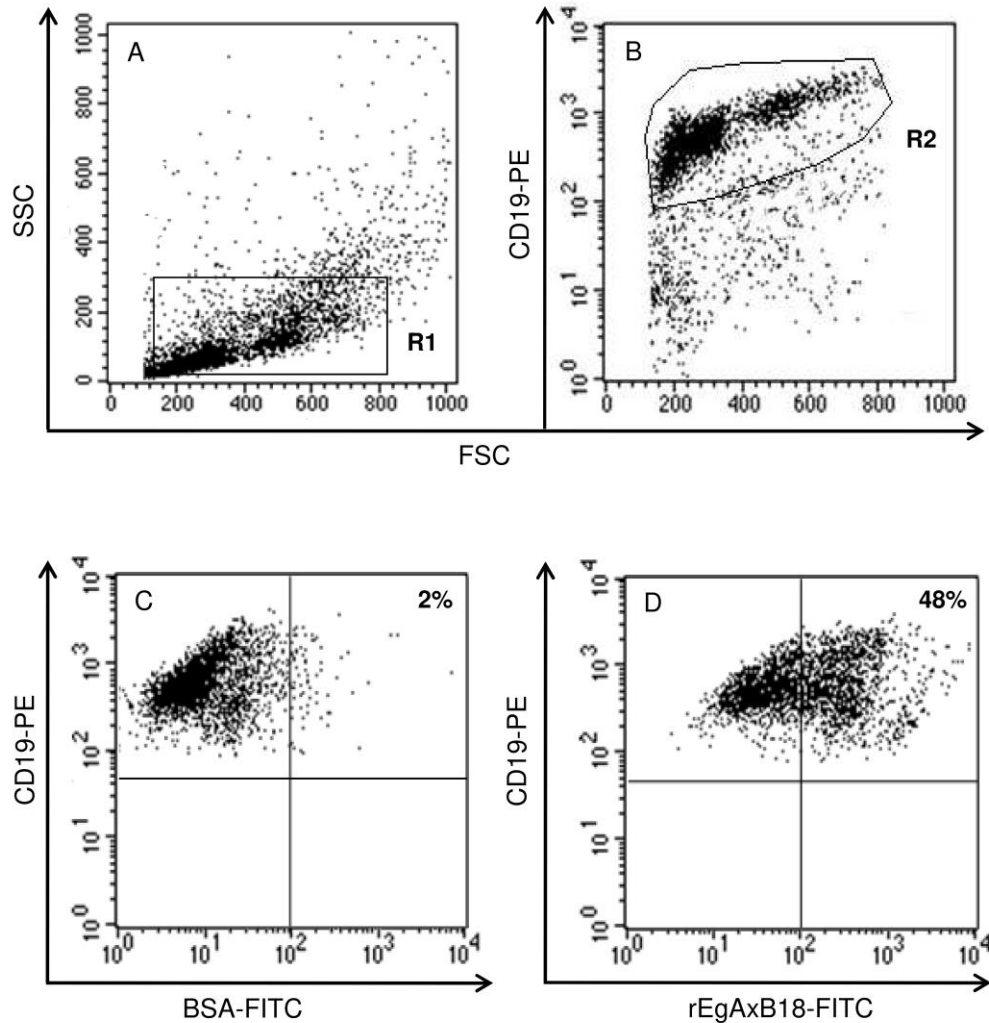


Figura 17.- Determinación por citometría de flujo de la potencial unión de rEgAxB18 a células peritoneales CD19⁺ de ratones Balb/c normales.

Células peritoneales normales fueron incubadas con: a) Ac bloqueante de receptores Fc; anti-CD19-PE; BSA-FITC y rEgAxB18-FITC, fueron luego analizadas por citometría de flujo. Los linfocitos (R1) fueron identificados por sus características de tamaño y granulosidad (FSC/SSC) (A). Las células CD19⁺ (B) fueron identificadas mediante un análisis de subordinación a R1. El estudio de unión de las células CD19⁺ a rEgAxB18 (D) así como al control BSA-FITC (C), fue realizado mediante un análisis de subordinación a R2. El número total de eventos adquiridos fue 20.000.

4.- La Anexina B18 es un antígeno excretado/secretado por protoscolec es de *E. granulosus*, en cultivo.

Las proteínas presentes en la inter-fase hospedero-parásito (ya sean excretadas/secretadas o unidas a membrana) suelen participar en una amplia variedad de funciones relevantes para la sobrevivida del parásito, entre las cuales se incluye la penetración y establecimiento en los tejidos del hospedero, la incorporación de metabolitos provenientes del hospedero y la modulación del sistema inmune del hospedero (Rosenzvit *et al.*, 2006).

La cronicidad de de la infección por *E. granulosus*, podría estar basada en la capacidad de este parásito de evadir/modular la respuesta inmune del hospedero, y se ha sugerido que las moléculas que expone el parásito hacia el hospedero podrían tener un papel importante en este tipo de mecanismo (Virginio *et al.*, 2012). Particularmente, se ha sugerido que los productos de excreción/secreción que serían capaces de modular tanto la respuesta inmune innata como adaptativa (Virginio *et al.*, 2007; Siracusano *et al.*, 2008). Por lo tanto, la identificación de estos antígenos del parásito presentes en la interfase hospedero-parásito son de especial relevancia para mejorar el entendimiento sobre los mecanismos asociados a la adaptación de los parásitos a sus hospederos específicos, lo cual es un conocimiento necesario para el desarrollo de nuevas estrategias de inmuno-profilaxis (Rosenzvit *et al.*, 2006; Virginio *et al.*, 2012).

Los resultados mostrados en el Capítulo 1 de este trabajo, indican que la Anexina B18 es un componente presente en antígenos somáticos de protoscolec es. En este contexto, en este trabajo se realizaron varios experimentos para determinar si esta proteína podría ser un antígeno secretado o excretado por el parásito en cultivo. Así, los protoscolec es fueron cultivados durante 8 días en RPMI 1640 suplementado solo con antibióticos.

Para demostrar que la Anexina B18 podría ser un componente de los productos de excreción/secreción, todos los sobrenadantes de los cultivos recuperados cada dos días fueron mezclados, luego resueltos por SDS-PAGE, posteriormente transferidos a una membrana de PVDF y finalmente incubados con γ globulinas de conejo, la cual

contiene anticuerpos específicos contra rEgAxB18. Tanto PSA como la proteína recombinante rEgAxB18 fueron utilizados como control.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 18 y sugieren, en función del PM aparente, que la anexina B18 es un antígeno excretado/secretado *in vitro* por los protoscoleces en ausencia de un estímulo en particular.

En función de los patrones observados por immunoblotting y principalmente para descartar que este resultado no se tratara de un artefacto, las γ globulinas de conejo que contienen los anticuerpos generados por inmunización con la rEgAxB18 fueron previamente incubados con un lisado de bacterias *E. coli* BL21, ya que la proteína recombinante utilizada para las inmunizaciones podría eventualmente estar contaminada por antígenos de estas bacterias. Los resultados obtenidos (Figura 19) muestran que no hubo variación en el patrón de reconocimiento, confirmando así el mismo no es debido a contaminación con productos bacterianos.

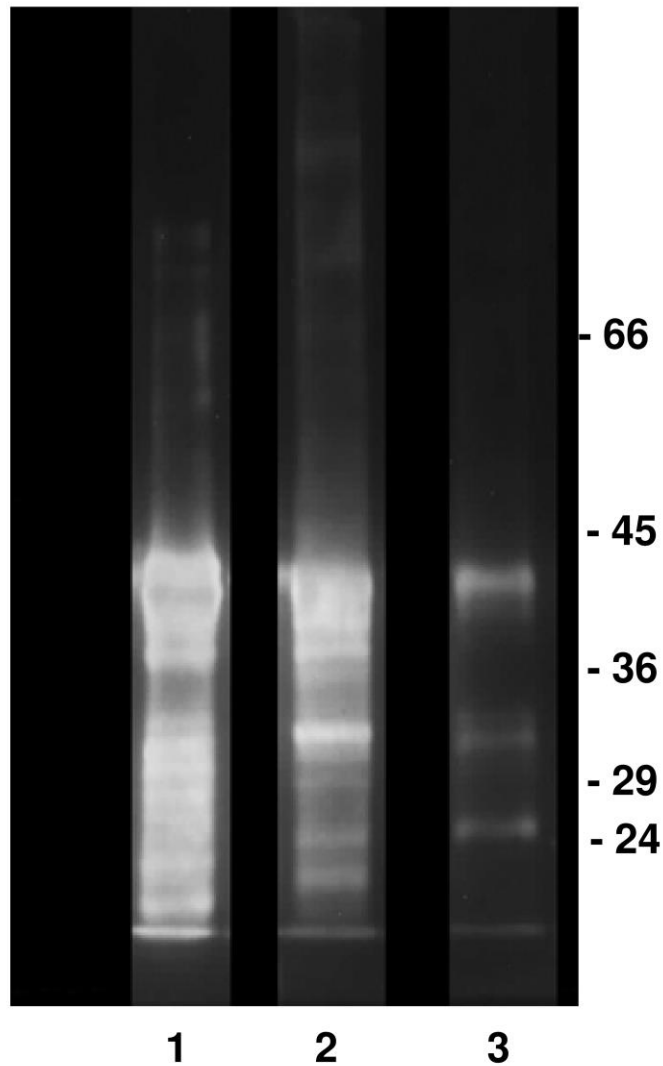


Figura 18.- Detección de EgAxB18 en productos de excreción/secreción de protoscoleces cultivados *in vitro*.

Los productos de E/S de protoscoleces de *E. granulosus* fueron obtenidos por cultivo de los PSC en RPMI 1640 suplementado con antibióticos. Luego fueron resueltos por SDS-PAGE en condiciones reductoras y posteriormente transferidos a membranas de PVDF. Antígenos somáticos (PSA) y la proteína recombinante rEgAxB18 fueron utilizadas como control. Finalmente, los tres antígenos fueron incubados con γ globulinas de conejo inmunizado con rEgAxB18 y luego con anti-IgG de conejo-PO. Se muestra en : (1) el patrón obtenido para la rEgAxB18; (2) el patrón para PSA y (3) el patrón de productos de E/S.

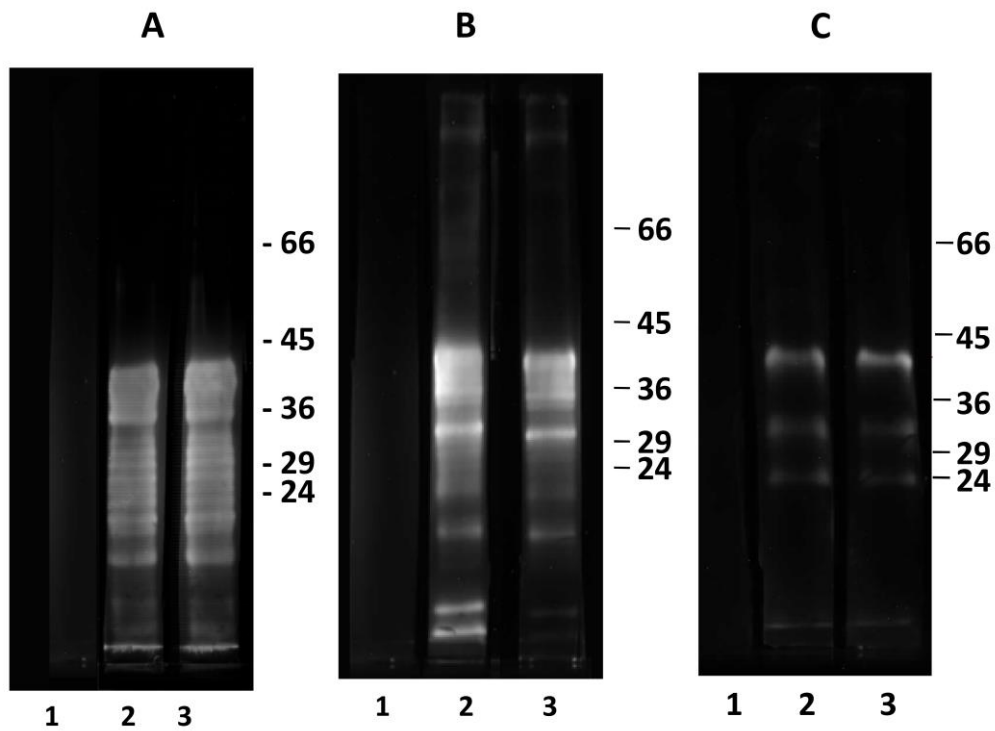


Figura 19.- Control del reconocimiento específico de IgG de conejo anti-rEgAxB18.

Los productos de E/S, los antígenos somáticos (PSA) y la proteína recombinante (rEgAxB18), fueron resueltos por SDS-PAGE en condiciones reductoras y posteriormente transferidos a membranas de PVDF.

(A) rEgAxB18: (1) control de conjugado, (2) γ globulinas de conejo sin inhibir y (3) γ globulinas de conejo pre-incubadas con lisado de bacterias *E.coli* BL21.

(B): PSA: (1) control de conjugado, (2) γ globulinas de conejo sin inhibir y (3) γ globulinas de conejo pre-incubadas con lisado de bacterias *E.coli* BL21.

(C): E/S; (1) control de conjugado, (2) γ globulinas de conejo sin inhibir y (3) γ globulinas de conejo pre-incubado con lisado de bacterias *E.coli* BL21.

5.- La anexina B18 de *E. granulosus* no es secretada por las vías: clásica o no clásica.

Para analizar las potenciales vías de secreción de la proteína EgAxB18, fue realizado un estudio bio-informático. Los resultados obtenidos utilizando dos predictores (SignalP y SecretomeP) (Tabla 5) sugieren que la Anexina B18 no sería secretada por una vía clásica (péptido señal) o por una vía no clásica.

Vía de Secreción	Resultado	Predictor
Vía Clásica (péptido señal)	No presenta	<i>SignalP</i>
Vía no clásica	No presenta	<i>SecretomeP</i>

Tabla 5.- Análisis de la potencial vía de secreción de la anexina EgAx B18 de *E. granulosus*. Para analizar la potencial vía de secreción de la anexina EgAxB18 se utilizaron los predictores bio-informáticos SignalP (Petersen *et al.*, 2011) y SecretomeP (DyrlovBendtsen *et. al.*, 2004 y 2005).

6.- La infección secundaria experimental induce en ratones Balb/c, a diferencia de los ratones C57Bl/6, una respuesta de anticuerpos capaz de reconocer a la Anexina B18 de *E. granulosus* recombinante.

Mourglia-Ettlin *et al.* (2016b) reportaron que la cepa de ratones Balb/c era más susceptible a la infección secundaria por *E. granulosus*, que la cepa de ratones C57Bl/6. Los autores sugieren además, que los anticuerpos naturales y los inducidos por el parásito, podrían contribuir en esta diferencia en la susceptibilidad entre ambas cepas. Por lo tanto, resulta relevante analizar si los anticuerpos inducidos por el parásito vivo en estas dos cepas de ratones pueden ser capaces de reconocer la Anexina B18 de *E. granulosus*.

Es importante resaltar, que dado que no se disponía de una cantidad suficiente de la EgAxB18 nativa, para este ensayo se utilizó la proteína rEgAxB18. Teniendo esto presente, los resultados (Figura 20) muestran diferencias interesantes. Los individuos de la cepa Balb/c generan una respuesta significativa de anticuerpos IgM e IgG capaz de reconocer la Anexina B18 recombinante (Figura 20A y 20B). Por el contrario, la infección secundaria no induce, al menos en los puntos temporales seleccionados, una respuesta significativamente diferente de anticuerpos (IgM e IgG) en ratones de la cepa C57Bl/6 comparados con el grupo control (Figura 20C y 20D).

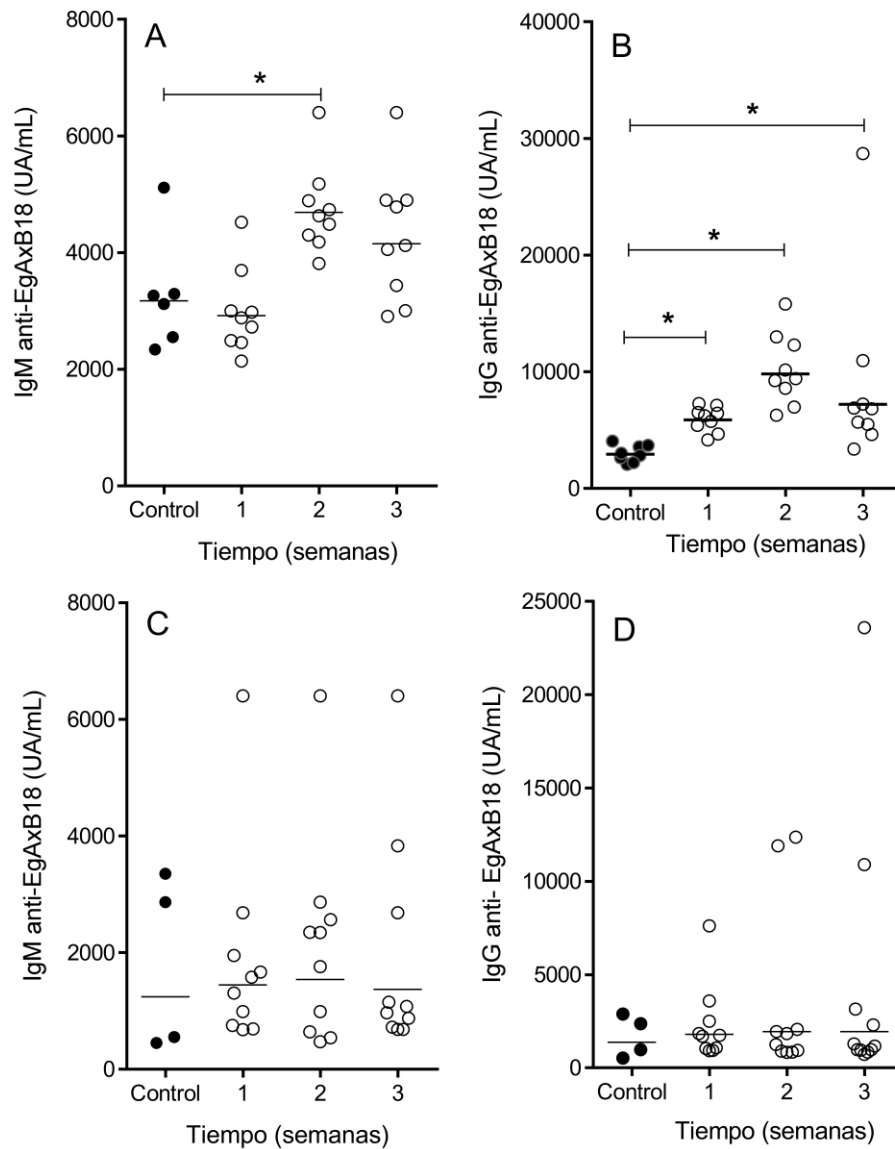


Figura 20.- Reconocimiento de la rEgAxB18 por anticuerpos de ratones Balb/c y C57Bl/6 inoculados con protoscoleces viables de *E. granulosus*.

Un grupo de ratones Balb/c (n= 9) y un segundo grupo de ratones C57Bl/6 (n=10) fueron inoculados por vía intraperitoneal con 2000 protoscoleces viables de *E. granulosus*. A su vez un tercer grupo de ratones Balb/c (n=6) y finalmente un cuarto grupo de ratones C57Bl/6 (n=4) inoculados con PBS fueron utilizados como grupos control. La Figura muestra los títulos de anticuerpos séricos IgM e IgG anti-rEgAxB18 en ratones Balb/c (A y B respectivamente) y aquellos correspondientes en ratones C57Bl/6 (C y D respectivamente), en las semanas 1, 2 y 3 post-inoculación. Los círculos representan el valor de cada individuo y las líneas representan los valores de la mediana.

7.- La proteína EgAxB18 solo contiene potenciales epitopes T capaces de interactuar con el haplotipo H2-IAd de ratones Balb/c.

Para discernir sobre el hecho de esta diferencia de reconocimiento de la proteína rEgAxB18 por anticuerpos de ratones Balb/c y C57Bl/6, se utilizó una herramienta bioinformática: el predictor MHC-II Binding Prediction Results (IEDB) empleando el método *NN-align*, el cual es un algoritmo de alineación basado en redes artificiales, que permiten simultáneamente tanto la identificación de los péptidos de unión a determinadas moléculas de MHC de clase II, así como predecir la afinidad entre el péptido y la molécula de MHC II (Nielsen & Lund, 2009). Los resultados (Tabla 6) sugieren claramente que la proteína EgAxB18 solo presenta péptidos potencialmente afines ($IC_{50} < 500$ nM) a interactuar sólo con el haplotipo H2-IAd de ratones de la cepa Balb/c. Esto podría dar cuenta de la ausencia de anticuerpos específicos, por lo menos contra rEgAxB18, en individuos infectados de la cepa C57Bl/6, en los puntos temporales analizados.

Epitopes T presentes en EgAxB18			
	No. Epitopes T ($IC_{50} < 500$ nM)	No. Epitopes T (diferente <i>core</i>)	Epitope con mayor afinidad
Balb/c (H2-IAd)	22	7	140 nM
C57Bl/6 (H2-IAb)	0	0	527 nM

Tabla 6. – Potenciales epitopes T presentes en EgAxB18.

La predicción de los posibles epitopes T presentes en la anexina B18 de *E. granulosus*, fue realizada empleando el predictor MHC-II Binding Prediction Results (IEDB) empleando el método *NN-align*, el cual es un algoritmo de alineación basado en redes artificiales que permiten simultáneamente tanto la identificación de los péptidos de unión a determinadas moléculas de MHC de clase II (secuencia *core* o núcleo en aminoácidos más los residuos flanqueantes), como predecir la afinidad entre el péptido y la molécula de MHC II. Esta última se indica como un valor de IC_{50} (nM), siendo potencialmente afines los péptidos que presenten valores de IC_{50} menores a 500 nM. En este caso, se analizó la presencia de epitopes T en la anexina B18 de *E. granulosus* en relación a dos alelos de MHC de clase II: el H2-IAd (cepa Balb/c) y H2-IAb (cepa C57Bl/6).

8.- Efecto de la transferencia pasiva de anticuerpos contra la rEgAxB18 sobre el resultado de la infección secundaria experimental.

Para determinar la relevancia que podría tener la proteína EgAxB18 sobre el resultado de la infección experimental, se utilizó como estrategia la transferencia pasiva de sueros de ratones Balb/c inmunizados con la proteína recombinante, seguida del y desafío con protoscoleces vivos. Lamentablemente, los resultados obtenidos no permitieron sacar ninguna conclusión al respecto (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

El modelo experimental de la infección secundaria, consiste en la administración vía intraperitoneal de protoscoleces a ratones de experimentación (Heath,1970). En este modelo, la diferenciación del protoscoleces a quiste es un fenómeno que ocurre con relativa rapidez (aprox. 20 días) (Richards *et al.*,1983). Por otra parte, solo un pequeño número de los protoscoleces que se administran logran desarrollarse a quiste (Ferragut & Nieto, 1996; Dematteis *et al.*, 2003). En este contexto, no resulta extraño pensar que los eventos tempranos que se producen localmente en el sitio anatómico donde se establece la infección (cavidad peritoneal), podrían tener una particular importancia en condicionar el resultado de la infección.

En este trabajo hemos identificado a la Anexina B18 de *E. granulosus* (Código: EgrG_000041200.1) como uno de los componentes de los antígenos somáticos de protoescoleces y de una fracción de estos antígenos denominada E4⁺. Este resultado es bien interesante, teniendo en cuenta que fue reportado que las anexinas parasitarias podrían localizarse en la interface hospedero-parásito (Cantacessi *et al.*, 2013), razón por la cual, se postula, podrían tener un rol relevante en los mecanismos asociados con la sobrevivencia del parásito y/o con la modulación de la respuesta inmune de los hospederos vertebrados (Cantacessi *et al.*, 2013).

Por esta razón, en este trabajo se clonó, expresó y purificó la Anexina B18 recombinante de *E. granulosus* (rEgAxB18) (Figura 15), para posteriormente estudiar algunos efectos funcionales inducidos por la misma.

Dado que nuestro grupo emplea usualmente ratones de la cepa Balb/c como modelo experimental de la infección secundaria, se analizó la capacidad inmunogénica de rEgAxB18 en esta cepa de ratones. Los resultados (Figura 16) indican claramente, que la rEgAxB18 es capaz de inducir una respuesta significativa de anticuerpos IgM e IgG específicos, comparada con el grupo control.

Por otra parte, teniendo en cuenta que componentes de la fracción E4⁺ tienen la capacidad de unirse a células B (CD19⁺) peritoneales de ratones Balb/c normales (Mourglia-Ettin *et al.*, 2011b), se analizó, utilizando la misma estrategia, si rEgAxB18 podía tener la capacidad potencial de unirse a células peritoneales de ratones Balb/c normales. Efectivamente, los resultados sugieren que rEgAxB18 tiene la capacidad de

unirse a células B (CD19⁺) peritoneales normales (Figura 17). Si bien el porcentaje de células CD19⁺ (56%) (Figura 4 Cap. 1) peritoneales al cual se une la fracción E4⁺ es algo similar al obtenido con la rEgAxB18 (46%) (Figura 17), estos resultados no permiten *a priori* concluir que la proteína EgAxB18 sea el principal o único componente de E4⁺ que al unirse a las células B, tenga la capacidad de disparar los efectos biológicos observados para esta fracción. Por ejemplo, la inducción de la secreción de determinadas citoquinas o secreción de anticuerpos de ciertos isotipos. Hay una serie de hechos que deben ser considerados. Por ejemplo, estos ensayos fueron realizados utilizando la Anexina B18 recombinante, que por ende no es una proteína glicosilada. Esto sugiere que la interacción de la anexina con las células B podría darse a través de un receptor o ligando existente en la membrana de la célula B.

En este contexto, podría plantearse hipotéticamente que si la Anexina B18 está realmente glicosilada, la parte proteica podría interactuar con las inmunoglobulinas de las células B peritoneales y que la estructura glucídica asociada a esta proteína, podría ser ligando de algún tipo de receptor de membrana de la célula B. Esta especulación podría estar apoyada por el hecho que los linfocitos B poseen en su superficie receptores tipo lectina (CLRs), como Dectin1, Dectin 2 y DNGR1 (Geijtenbeek & Gringhuis, 2009; Seo *et al.*, 2016) que podrían interactuar con motivos glucídicos presentes en la Anexina B18 nativa. Estas dos interacciones en actuando en conjunto podrían inducir la activación B, de forma similar a lo que ocurre en el caso de los TLRs (Browne, 2012; Pone, *et al.*, 2010).

Interesantemente, la región N-terminal de las anexinas es usualmente asociada a las funciones particulares de cada anexina, ya que es la región más variable (Flower & Perretti, 2015; Seaton & Dedman, 1998). En el presente trabajo mostramos que la EgAxB18 podría tener un potencial sitio de N-glicosilación en el extremo N-terminal (Tabla 4), lo que podría apoyar la hipótesis planteada.

Sin embargo, esto solo es una especulación, estudios sobre los efectos (por ejemplo: secreción de citoquinas y anticuerpos en sobrenadantes de cultivo) *in vitro* de la estimulación de células peritoneales con la proteína recombinante y la proteína nativa deberían ser realizados.

Las anexinas son generalmente proteínas citosólicas, con mezclas de tanto una forma soluble y una forma estable o reversible asociada con componentes del citoesqueleto

o proteínas que median las interacciones entre la célula y la matriz extracelular (Moss & Morgan, 2004). En ciertos casos, las anexinas se pueden expresar en la superficie de la célula a pesar de la ausencia de péptido señal; por ejemplo, la anexina A1 humana puede translocarse desde el citosol a la superficie de la célula después de la exposición a análogos de glucocorticoides (Solito *et al.*, 1994).

De manera interesante, algunas anexinas sin señal secretoria han sido encontradas en el espacio extracelular (por ejemplo, la anexina B1 de *T. solium*, y otras como las anexinas A1, A2 y A5 de humanos (He *et al.*, 2008; Yazid *et al.*, 2013; van Genderen *et al.*, 2008). El mecanismo por el cual este fenómeno ocurre es aún desconocido (He *et al.*, 2008; Nickel, 2005).

En el caso de los parásitos, se postula que las anexinas de parásitos se localizan en la interfase hospedero-parásito (Cantacessi *et al.*, 2013). Por ejemplo, se ha reportado que una de las anexinas de *Schistosoma mansoni* está estrechamente asociada con el desarrollo del tegumento, lo cual es bien interesante ya que este se encuentra en la interfase hospedero-parásito (Tararam *et al.*, 2010).

En el caso particular de *E. granulosus* la información sobre los posibles efectos biológicos de las anexinas es escasa o nula.

Por esta razón, en este trabajo se realizaron una serie de experimentos centrados primero en analizar si los protoscolecemas de *E. granulosus* cultivados *in vitro*, sin ningún estímulo en particular, podrían secretar/excretar la EgAxB18. Efectivamente, nuestros resultados muestran (Figura 18) que los PSC son capaces de secretar/excretar la EgAxB18 *in vitro*. Posteriormente, mediante el uso de herramientas bio-informáticas realizamos una aproximación tendiente a discernir las posibles vías de secreción de esta anexina. Los predictores informáticos SignalP (Petersen *et al.*, 2011) y SecretomeP (Bendtsen *et al.*, 2004) (Tabla 5), indican que la EgAxB18 no sería una proteína secretada por la vía clásica, ya que carece de péptido señal, y tampoco por una vía no clásica. Esta última, corresponde a una vía de secreción independiente del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (Tanudji *et al.*, 2002), y por tanto las proteínas que ingresan a esta vía no presentan péptido señal para la secreción (Kuchler *et al.*, 1997). Aun así, Bendtsen *et al.*, (2004) y Bendtsen *et al.*, (2005) desarrollaron un predictor bio-informático capaz de reconocer las proteínas que serían secretadas por la vía no-clásica, basado en su secuencia aminoacídica. La secreción no-clásica no está caracterizada por un único mecanismo, sino que corresponde a un grupo de mecanismos que se clasifican en dos grupos: no vesiculares (ejemplo:

translocación directa a través de la membrana plasmática), y vesiculares (ej: vía lisosomas) (Nickel, 2010). Si bien la anexina B18 no parecería ser secretada/excretada por ninguna de las vías mencionadas, existe otro mecanismo que podría explicarlo. Recientemente, algunos autores han reportado la presencia de anexinas en vesículas extracelulares de los parásitos *E. granulosus* (Siles-Lucas *et al.*, 2017), *E. multilocularis* (Zheng *et al.*, 2017), *Taenia crassiceps* y *Mesocestoides corti* (Ancarola *et al.*, 2017). Particularmente, la anexina de *E. granulosus*, identificada en exosomas de líquido hidático, fue la B20 (Siles-Lucas *et al.*, 2017). Las vesículas extracelulares son un grupo de varios tipos de vesículas, que se distinguen según su tamaño, morfología o composición proteica/lipídica, siendo las más caracterizadas las microvesículas y los exosomas (Colombo *et al.*, 2014).

Por otra parte, Mourglia-Ettlin *et al.* (2016b) reportaron que ratones de las cepas Balb/c y C57Bl/6 mostraron tener diferente susceptibilidad a la infección secundaria por *E. granulosus*. Efectivamente, los ratones Balb/c mostraron ser significativamente más susceptibles a la infección que los ratones C57Bl/6. Además, estos autores han sugerido que la diferencia en la respuesta de anticuerpos (naturales o inducidos) entre estas dos cepas de ratones podría dar cuenta, por lo menos en parte, de esta diferencia de susceptibilidad a la infección.

En este contexto, en este trabajo se analizó, seleccionando diferentes puntos temporales, si los anticuerpos séricos de ratones Balb/c y C57Bl/6 infectados eran capaces de reconocer la rEgAxB18. Los resultados indican (Figura 20) que los ratones Balb/c, a diferencia de los ratones de la cepa C57Bl/6, montan una respuesta de anticuerpos IgM e IgG significativa capaz de reconocer la anexina B18 recombinante. Es importante destacar que la respuesta de anticuerpos detectada es contra la rEgAxB18, no contra la proteína nativa lo que implica que el reconocimiento de posibles estructuras glucídicas presentes en la proteína nativa no se detectan en este sistema. Sin embargo, para poder discernir cual sería la razón de esta diferencia entre estas dos cepas de ratones por lo menos en el reconocimiento de la rEgAxB18 fue utilizado el predictor MHC-II Binding Prediction Results (IEDB) empleando el método *NN-align*. Este predictor permite la identificación de potenciales péptidos que podrían interaccionar con determinadas moléculas de MHC de clase II, y a su vez predice la afinidad entre el péptido y la molécula de MHC II. Los resultados sugieren (Tabla 6) que la Anexina B18 de *E. granulosus* tiene potenciales epitopes T capaces de unirse a moléculas del haplotipo H2-IA_d (Balb/c), pero no a moléculas del haplotipo

H2-IAb (C57Bl/6). Esto podría dar cuenta de la diferencia en el reconocimiento de la rEgAxB18 entre estas dos cepas de ratones.

Finalmente, para analizar la relevancia de la EgAxB18 en el establecimiento de la infección experimental, se realizó la transferencia pasiva de sueros de ratones Balb/c inmunizados con la rEgAXB18 a ratones Balb/c normales, los cuales fueron luego desafiados por inoculación de protoscoleces viables. El establecimiento de la infección fue determinado 8 meses pi. Lamentablemente, los resultados obtenidos de estos ensayos no permitieron sacar ninguna conclusión. También en este caso cabe destacar que los sueros transferidos a los animales en forma pasiva no contienen anticuerpos capaces de bloquear posibles estructuras glucídicas presentes en la EgAxB18 nativa. Esto podría afectar significativamente los efectos sobre el resultado de la infección.

Discusión final global

Los glicoconjugados de parásitos juegan un papel importante en la interrelación hospedero-parásito. Existen numerosos reportes que sugieren que los glicoconjugados de los parásitos helmintos son antigénicos, inmuno-dominantes e inmuno-moduladores (Harn et al., 2009; van Die & Cummings, 2006, van Die & Cummings, 2010). Particularmente, en *E. granulosus* se ha reportado que una fracción antigénica enriquecida en carbohidratos, denominada E4⁺, ha mostrado tener actividades biológicas interesantes (Baz et al., 1999, Baz et al., 2008; Dematteis et al., 2001; Mourglia-Ettlin et al., 2011b).

De manera interesante, en este trabajo mostramos que los efectos de la fracción E4⁺ *in vivo* son similares a los observados *in vitro* (Dematteis et al., 2001; Mourglia-Ettlin et al., 2011b). En efecto, E4⁺ tiene la capacidad de: a) unirse a células CD19⁺ peritoneales normales; b) inducir la secreción de IgM totales y c) aumentar la expresión de las citoquinas IL-10 e IL-6 a nivel local, pero no la de IFN γ . Estos resultados a su vez, tienen cierta similitud con los disparados por el parásito durante la etapa temprana de la infección experimental, aunque la duración del estímulo durante la infección es una variable a considerar.

Por tanto, estos efectos biológicos inducidos por la fracción E4⁺ podrían sugerir una posible participación de alguno de sus componentes, en mecanismos asociados con evasión/modulación de la respuesta inmune del hospedero. En consecuencia, resulta relevante identificar que antígenos componen esta fracción. En este trabajo se mostró que la fracción E4⁺: a) es una fracción compleja en glicoproteínas, aunque menos que el PSA; b) posee tres componentes que son reconocidos por la lectina ConA; c) algunos de sus componentes son reconocidos por la lectina WGA; y d) la anexina B18 es una proteína constitutiva de esta fracción (y por ende PSA).

En cuanto a las estructuras glucídicas, los resultados obtenidos son interesantes y consistentes con algunas estructuras propuestas Khoo *et al.*, (1997). Pero es claro que estudios más rigurosos y sistemáticos deberían realizarse.

El hecho de haber identificado la anexina B18 como uno de los componentes de la fracción E4⁺, es un resultado bien importante, ya que se ha propuesto que las anexinas de parásitos podrían estar asociadas a funciones relevantes en la interrelación hospedero-parásito (Cantacessi *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2008).

En este contexto, en este trabajo se clonó, expresó y purificó la forma recombinante de la EgAxB18, para posteriormente, emplearla en algunos estudios funcionales. En primer lugar se analizó la capacidad inmunogénica de la rEgAxB18 en ratones de la

cepa Balb/c, mostrando que se produce una respuesta significativa de anticuerpos IgM e IgG específicos. Por otra parte, observamos que la rEgAxB18 es capaz de unirse a células CD19⁺ peritoneales normales con un porcentaje similar al mostrado por la fracción E4⁺.

Algunas anexinas de parásitos se han localizado en esta inter-fase hospedero-parásito (Cantacessi *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2016). En este trabajo, hemos mostrado que los PSC en cultivo son capaces de secretar/excretar la EgAxB18 (Figura 18). Los resultados obtenidos a partir de la utilización de herramientas bio-informáticas sugieren que la EgAxB18 no sería secretada por la vía clásica, o por una vía no clásica. Sin embargo, esta anexina podría ser secretada/excretada en vesículas extracelulares, de manera similar a lo reportado en el caso de la anexina B20 de *E. granulosus* (Siles-Lucas *et al.*, 2017), y de otras anexinas de los parásitos, por ejemplo, *E. multilocularis* (Zheng *et al.*, 2017), *Taenia crassiceps* y *Mesocestoides corti* (Ancarola *et al.*, 2017).

Dado que la EgAxB18 es excretada/secretada por los PSC (al menos *in vitro*), podría plantearse hipotéticamente que estaría expuesta al sistema inmune del hospedero durante la infección secundaria experimental y en consecuencia generar una respuesta de anticuerpos específica.

En este contexto, considerando que las cepas de ratones Balb/c y C57Bl/6 muestran diferente susceptibilidad a la infección (Mourglia-Ettlin *et al.* 2016b) y que además esta diferencia podría estar relacionada con diferencias en los anticuerpos naturales e inducidos, en este trabajo se analizó la presencia de anticuerpos séricos en ratones Balb/c y C57Bl/6 infectados, capaces de reconocer la rEgAxB18. Interesantemente, sólo se detectaron anticuerpos IgM e IgG contra la rEgAxB18 en la cepa de ratones más susceptible (Balb/c) a la infección secundaria por *E. granulosus*. En este sentido, los predictores bio-informáticos, indican que la EgAxB18 tiene potenciales epitopes T capaces de interactuar con moléculas del haplotipo H2-IAd (Balb/c), pero no a moléculas del haplotipo H2-IAb (C57Bl/6).

En suma, la anexina B18 de *E. granulosus* resulta una proteína con características bien interesantes, aunque deben realizarse varios estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, que permitan comprender mejor sus posibles funciones biológicas.

PERSPECTIVAS

Como perspectivas a futuro, relacionadas con este trabajo, sería bien interesante profundizar el análisis de la anexina B18 de *E. granulosus* en base a tres criterios: estructural, localización y funcionalidad. Desde el punto de vista estructural, habría que realizar estudios sistemáticos sobre los potenciales tipos de glicosilación. En relación a su localización se debería analizar si: i) la EgAxB18 es excretada/secretada mediante vesículas extracelulares; y ii) esta Anexina se localiza por ejemplo, en el tegumento del protoscolex. Finalmente, a nivel funcional, se debería profundizar en la interacción de la EgAxB18 con las células peritoneales y sus efectos sobre las mismas.

.

Referencias bibliográficas

- Aceti A, Celestino D, Teggi A, Caferro M, Pennica A, Grilli A, Sebastiani A, De Rosa F. **Histamine release test in the diagnosis of human hydatidosis.** *Clin Exp Allergy*. 1989. 19(3):335-9.
- Al-Qaoud, K. M. & Abdel-Hafez, S. K. **The induction of T helper type 1 response by cytokine gene transfection protects mice against secondary hydatidosis,** *Parasitology Research*. 2008, 102(6): 1151–1155.
- Allen, A. K., Neuberger, Sharon, N. **The purification, composition and specificity of wheat-germ agglutinin.,** *The Biochemical journal*. 1973, 131(1): 155–62.
- Ancarola, M. E., Marcilla, A., Herz, M., Macchiaroli, N., Pérez, M., Asurmendi, S., Brehm K., Poncini C., Rosenzvit M., Cucher M. **Cestode parasites release extracellular vesicles with microRNAs and immunodiagnostic protein cargo,** *International Journal for Parasitology*. 2017. 47(10–11): 675–686.
- Araj, G. F., Matossian, R. M. and Frayha, G. J. **The host response in secondary hydatidosis of mice,** *Z. Parasitenk*. 1977, 30(52): 23–30.
- Atochina, O., Daly-Engel, T., Piskorska, D., McGuire, E., Harn, D. A. **A Schistosome-expressed immunomodulatory glycoconjugate expands peritoneal Gr1+ macrophages that suppress naive CD4+ T cell proliferation via an IFN- γ and nitric oxide-dependent mechanism,** *The Journal of Immunology*. 2001, 167(8): 4293–4302.
- Aziz, A., Zhang, W., Li, J., Loukas, A., McManus, D. P. and Mulvenna, J. **Proteomic characterisation of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid from sheep, cattle and humans,** *Journal of Proteomics*. 2011, 74(9): 1560–1572.
- Baz, A., Carol, H., Fernández, V., Mourglia-Ettlin, G., Nieto, A., Örn, A. and Dematteis, S. ***Echinococcus granulosus*: Induction of T-independent antibody response against protoscolex glycoconjugates in early experimental infection,** *Experimental Parasitology*. 2008, 119(4): 460–466.
- Baz, A., Hernández, A., Dematteis, S., Carol, H. and Nieto, A. **Idiotypic modulation of the antibody response of mice to *Echinococcus granulosus* antigens.,** *Immunology*. 1995, 84(3): 350–354.
- Baz, A., Mourglia-Ettlin, G. and Dematteis, S. **Complexity and function of cytokine responses in experimental infection by *Echinococcus granulosus*,** *Immunobiology*. 2006, 211(1–2): 3–9.
- Baz, A., Richieri, A., Puglia, A., Nieto, A. and Dematteis, S. **Antibody response in CD4-depleted mice after immunization or during early infection with *Echinococcus granulosus*,** *Parasite Immunology*. 1999, 21(3): 141–150.
- Bendtsen, J. D., Jensen, L. J., Blom, N., von Heijne, G. and Brunak, S. **Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion,** *Protein Engineering, Design and Selection*. 2004, 17(4): 349–356.
- Bendtsen, J. D., Kierner, L., Fausbøll, A. and Brunak, S. **Non-classical protein secretion in bacteria,** *BMC Microbiology*. 2005, 5: 58.
- Brehm, K. and Koziol, U. ***Echinococcus*-host interactions at cellular and molecular levels,** *Advances in parasitology*. 2017, 95:147-212.

- Breijo, M., Isnardi, F., Brauer, M., Schenker, R., Ferrari, M. and Ferreira, A. M. **An insect growth inhibitor - lufenuron - enhances albendazole activity against hydatid cyst**, *Veterinary Parasitology*. 2011, 181(2–4): 341–344.
- Browne, E. P. **Regulation of B-cell responses by Toll-like receptors**, *Immunology*. 2012, 136(4): 370–379.
- Budke, C. M., Deplazes, P. and Torgerson, P. R. **Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis**, *Emerging Infectious Diseases*. 2006, 12(2): 296–303.
- Cantacessi, C., Seddon, J. M., Miller, T. L., Leow, C. Y., Thomas, L., Mason, L., Willis C., Walker G., Loukas A., Gasser R. B., Jones M. K., Hofmann A. **A genome-wide analysis of annexins from parasitic organisms and their vectors**, *Scientific Reports*. 2013, 3(1): 2893.
- Cardozo, G., Tucci, P. and Hernández, A. **Characterization of the immune response induced by a carbohydrate enriched fraction from *Echinococcus granulosus* protoscoleces in patients with cystic hydatid disease**, *Parasitology Research*. 2002, 88(11): 984–990.
- Casado, N., Urrea-París, M., Moreno, M. and Rodríguez-Caabeiro, F. **Combined praziquantel and albendazole chemoprophylaxis in experimental hydatidosis**, *Parasitology Research*. 2001, 87(9): 787–789.
- Ceballos, L., Elissondo, C., Sánchez Bruni, S., Confalonieri, A., Denegri, G., Alvarez, L. and Lanusse, C. **Chemoprophylactic activity of flubendazole in cystic echinococcosis**, *Chemotherapy*. 2010, 56(5): 386–392.
- Coffman, R. L., Sher, A. and Seder, R. A. **Vaccine adjuvants: Putting innate immunity to work**, *Immunity*. 2010. Elsevier Inc., 33(4): 492–503.
- Colombo, M., Raposo, G. and Théry, C. **Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles**, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2014, 30(1): 255–289.
- Cucher, M., Macchiaroli, N., Baldi, G., Camicia, F., Prada, L., Maldonado, L., *et al.* **Cystic echinococcosis in South America: systematic review of species and genotypes of *Echinococcus granulosus sensu lato* in humans and natural domestic hosts**, *Medline*. 2016, 21(2): 166–175.
- Cucher, M., Mourglia-Ettlin, G., Prada, L., Costa, H., Kamenetzky, L., Poncini, C., Dematteis, S. and Rosenzvit, M. C. ***Echinococcus granulosus* pig strain (G7 genotype) protoscoleces did not develop secondary hydatid cysts in mice**, *Veterinary Parasitology*. 2013. Elsevier B.V., 193(1–3): 185–192.
- Dematteis, S., Baz, A. and Nieto, A. **Antibody and Th1 / Th2-type responses in BALB / c mice inoculated with live or dead *Echinococcus granulosus* protoscoleces**, *Parasite Immunology*. 1999, 19–26.
- Dematteis, S., Piroto, F., Marqués, J., Nieto, A., Örn, A. and Baz, A. **Modulation of the cellular immune response by a carbohydrate rich fraction from *Echinococcus granulosus* protoscoleces in infected or immunized Balb/c mice**, *Parasite Immunology*. 2001, 23(1): 1–9.
- Dematteis, S., Rottenberg, M. and Baz, A. **Cytokine response and outcome of infection depends on the infective dose of parasites in experimental infection by**

Echinococcus granulosus, *Parasite Immunology*. 2003, 25(4): 189–197.

Denegri, G., Pérez-Serrano, J., Casado, N. and Rodriguez-Caabeiro, F. **[¹³C]-Nuclear magnetic resonance spectral profiles of serum from normal and *Echinococcus granulosus*-infected mice: a kinetic study**, *Parasitology research*. 1995. 81(2):170-172.

Díaz, A., Casaravilla, C., Irigoín, F., Lin, G., Previato, J. O. and Ferreira, F. **Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* I: structure**, *Trends in Parasitology*. 2011, 27(5): 204–213.

Ehrenstein, M. R. and Notley, C. A. **The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator**, *Nature Reviews Immunology*. 2010, 10: 778.

Everts, B., Smits, H. H., Hokke, C. H. and Yazdanbakhsh, M. **Helminths and dendritic cells: Sensing and regulating via pattern recognition receptors, Th2 and Treg responses**, *European Journal of Immunology*. 2010, 40(6): 1525–1537.

Fairfax, K. A., Kallies, A., Nutt, S. L. and Tarlinton, D. M. **Plasma cell development: From B-cell subsets to long-term survival niches**, *Seminars in Immunology*. 2008, 20(1): 49–58.

Favoretto, B. C., Casabuono, A. A. C., Portes-Junior, J. A., Jacysyn, J. F., Couto, A. S. and Faquim-Mauro, E. L. **High molecular weight components containing N-linked oligosaccharides of *Ascaris suum* extract inhibit the dendritic cells activation through DC-SIGN and MR**, *Molecular Immunology*. 2017, 87: 33–46.

Fernandez, M. P. & Morgan, R. O. **Structure, Function and Evolution of the Annexins Gene Superfamily**. En: *Annexins: Biological importance and annexin-related pathologies*. pag. 21–37. Editado por: Bandorowicz-Pikula, J. 2003. Landes Bioscience.

Ferragut, G., Ljungström, I. and Nieto, A. **Relevance of circulating antigen detection to follow-up experimental and human cystic hydatid infections**, *Parasite Immunology*. 1998, 20(11): 541–549.

Ferragut, G. & Nieto, A. **Antibody response of *Echinococcus granulosus* infected mice: recognition of glucidic and peptidic epitopes and lack of avidity maturation**, *Parasite Immunol*. 1996, 18(8): 393–402.

Ferreira, A. M., Trecu, T. and Reisin, I. ***Echinococcus granulosus*: study of the *in vitro* complement activation by protoscoleces by measuring the electric potential difference across the tegumental membrane.**, *Experimental Parasitology*. 1992, 268(75): 259–268.

Fishman, M. A. & Perelson, A. S. **Th1/Th2 Cross Regulation**, *Journal of Theoretical Biology*. 1994, 170(1): 25–56.

Flower, R. J. & Perretti, M. **“Annexins” themed section**, *British Journal of Pharmacology*. 2015, 172(7): 1651–1652.

Gao, Y. J., Yan, H. L., Ding, F. X., Lu, Y. M. and Sun, S. H. **Annexin B1 at the host-parasite interface of the *Taenia solium* cysticercus: Secreted and associated with inflammatory reaction**, *Acta Tropica*. 2007, 101(3): 192–199.

Geijtenbeek, T. B. H. and Gringhuis, S. I. **Signalling through C-type lectin**

receptors: Shaping immune responses, *Nature Reviews Immunology*. 2009. Nature Publishing Group, 9(7): 465–479.

Gorg, A. **2-D Electrophoresis. Principles and Methods.**, *Handbook from GE Healthcare*. 2004.

Goulet, F., Moore, K. G. and Sartorelli, A. C. **Glycosylation of annexin I and annexin II**, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1992. Academic Press, 188(2): 554–558.

Gurri J. **Vitalidad y evolutividad de los escólices hidáticos *in vivo* e *in vitro***. *Anales de la Facultad de Medicina de Montevideo*. 1963. 48, 372–381.

Haralabidis, S., Karagouni, E., Frydas, S. and Dotsika, E. **Immunoglobulin and cytokine profile in murine secondary hydatidosis**, *Parasite Immunology*. 1995, 17(12): 625–630.

Hargreaves, D. C., Hyman, P. L., Lu, T. T., Ngo, V. N., Bidgol, A., Suzuki, G., Zou, Y. R., Littman, D. R. and Cyster, J. G. **A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements.**, *The Journal of experimental medicine*. 2001, 194(1): 45–56.

Harlow E., Lane D. **Labeling antibodies**. En: *Antibodies: a laboratory manual*, pag: 341. Editado por: Harlow E., Lane D. 1988. Cold Spring Harbor Laboratory.

Harlow E., Lane D. **Storing and purifying antibodies**. En: *Antibodies: a laboratory manual*, pag: 298-299. Editado por: Harlow E., Lane D. 1988. Cold Spring Harbor Laboratory.

Harn, D. A., McDonald, J., Atochina, O. and Da'Dara, A. A. **Modulation of host immune responses by helminth glycans**, *Immunological Reviews*. 2009, 230(1): 247–257.

Harris, N. & Gause, W. C. **To B or not to B: B cells and the Th2-type immune response to helminths**, *Trends in Immunology*. 2011, 32(2): 80–88.

Hashemitabar, G. R., Razmi, G. R. and Naghibi, A. **Trials to induce protective immunity in mice and sheep by application of protoscolex and hydatid fluid antigen or whole body antigen of *Echinococcus granulosus***, *Journal of Veterinary Medicine Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health*. 2005, 52(5): 243–245.

He, K.-L., Deora, A. B., Xiong, H., Ling, Q., Weksler, B. B., Niesvizky, R. and Hajjar, K. A. **Endothelial Cell Annexin A2 Regulates Polyubiquitination and Degradation of Its Binding Partner S100A10/p11**, *The Journal of Biological Chemistry*. 2008, 283(28): 19192–19200.

Heath, D. D. **The development of *Echinococcus granulosus* larvae in laboratory animals.**, *Parasitology*. 1970, 60(3): 449–456.

Hernández, A. & Nieto, A. **Induction of protective immunity against murine secondary hydatidosis**, *Parasite Immunology*. 1994, 16(10): 537–544.

Hotez, P. J., Brindley, P. J., Bethony, J. M., King, C. H., Pearce, E. J. and Jacobson, J. **Helminth infections: the great neglected tropical diseases**, *The Journal of clinical investigation*. 2008, 118(4): 1311–1321.

- Kallies, A., Hasbold, J., Fairfax, K., Pridans, C., Emslie, D., McKenzie, B. S., *et al.* **Initiation of plasma-cell differentiation is independent of the Transcription Factor *Blimp-1***, *Immunity*. 2007, 26(5): 555–566.
- Khoo, K. H., Nieto, A., Morris, H. R. and Dell, A. **Structural characterization of the N-glycans from *Echinococcus granulosus* hydatid cyst membrane and protoscoleces**, *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1997, 86(2): 237–248.
- Ko, a I., Dräger, U. C. and Harn, D. a **A *Schistosoma mansoni* epitope recognized by a protective monoclonal antibody is identical to the stage-specific embryonic antigen 1.**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990, 87(11): 4159–63.
- Kronewitter, S. R., Marginean, I., Cox, J. T., Zhao, R., Hagler, C. D., Shukla, A. K., *et al.* **Polysialylated N-Glycans Identified in Human Serum Through Combined Developments in Sample Preparation, Separations, and Electrospray Ionization-Mass Spectrometry**, *Analytical Chemistry*. 2014. American Chemical Society, 86(17): 8700–8710.
- Kuchler, K., Rubartelli, A. and Holland, B. **Unusual Secretory Pathways: From Bacteria to Man**. 1997.
- Laemmli, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**, *Nature*. 1970, 227(5259): 680–685.
- Leow, C. Y., Willis, C., Hofmann, A. and Jones, M. K. **Structure-function analysis of apical membrane-associated molecules of the tegument of *Schistosoma* parasites of humans: Prospects for identification of novel targets for parasite control**, *British Journal of Pharmacology*. 2015, 172(7): 1653–1663.
- Lin, G., Todeschini, A. R., Koizumi, A., Neves, J. L., González, H., Dematteis, S., *et al.* **Further structural characterization of the *Echinococcus granulosus* laminated layer carbohydrates: The blood-antigen P1-motif gives rise to branches at different points of the O-glycan chains**, *Glycobiology*. 2013, 23(4): 438–452.
- Liu, D., Lightowers, M. W. and Rickard, M. D. **Examination of murine antibody response to secondary hydatidosis using ELISA and immunoelectrophoresis**, *Parasite Immunology*. 1992, 14(3): 239–248.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. **Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method**, *Methods*. 2001, 25(4): 402–408.
- Lodge, R. and Descoteaux, A. **Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania***, *Clinical Immunology*. 2005, 114(2005): 256–265.
- Lorenzatto, K. R., Monteiro, K. M., Paredes, R., Paludo, G. P., Da Fonsêca, M. M., Galanti, N., Zaha, A. and Ferreira, H. B. **Fructose-bisphosphate aldolase and enolase from *Echinococcus granulosus*: Genes, expression patterns and protein interactions of two potential moonlighting proteins**, *Gene*. 2012, 506(1): 76–84.
- Macdonald, A. S., Araujo, M. I., Edward, J. and Pearce, E. J. **Immunology of parasitic helminth infections**, *Infection and immunity*. 2002, 70(2): 427–433.

- MacDonald, A. S., Straw, A. D., Bauman, B. Pearce, E. J. **CD8- Dendritic Cell Activation Status Plays an Integral Role in Influencing Th2 Response Development**, *Journal of Immunology*. 2001, 167(4): 1982–1988.
- Machado M. **Caracterización de antígenos de *Echinococcus granulosus* mediante una visión integrada de varios enfoques**. Tesis Lic. Bioquímica. Facultad de Ciencias, 2007.
- Maizels, R. M., Blaxter, M. L. and Scott, A. L. **Immunological genomics of *Brugia malayi*: Filarial genes implicated in immune evasion and protective immunity**, *Parasite Immunology*. 2001, 23(7): 327–344.
- Makni, S., Ayed, K. H., Dalix, A. M. and Oriol, R. **Immunological localization of blood pI antigen in tissues of *Echinococcus granulosus***, *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 1992, 86(1): 87–88.
- Mamuti, W., Yamasaki, H., Sako, Y., Nakaya, K., Nakao, M., Lightowers, M. W. and Ito, A. **Usefulness of Hydatid Cyst fluid of *Echinococcus granulosus* developed in mice with secondary infection for serodiagnosis of cystic Echinococcosis in humans**, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2002, 9(3): 573–576.
- Marcilla, A., Martin-Jaular, L., Trelis, M., de Menezes-Neto, A., Osuna, A., Bernal, D., Fernandez-Becerra, C., Almeida, I. C. and del Portillo, H. A. **Extracellular vesicles in parasitic diseases**, *Journal of Extracellular Vesicles*. 2014, 3(1).
- McManus, D. P. **Current status of the genetics and molecular taxonomy of *Echinococcus* species.**, *Parasitology*. 2013, 140(13): 1617–23.
- Míguez, M., Baz, A. and Nieto, A. **Carbohydrates on the surface of *Echinococcus granulosus* protoscoleces are immunodominant in mice.**, *Parasite immunology*. 1996, 18(11): 559–569.
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. and O'Garra, A. **Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor**, *Annual Review of Immunology*. 2001, 19(1): 683–765.
- Moreau, E. and Chauvin, A. **Immunity against helminths: Interactions with the host and the intercurrent infections**, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010;2010:428593.
- Moro, P. and Schantz, P. M. **Echinococcosis: a review**, *International Journal of Infectious Diseases*. 2009, 13(2): 125–133.
- Mosmann, T. R. and Moore, K. W. **The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses**, *Immunology Today*. 1991, 12(3): A49–A53.
- Moss, S. E. and Morgan, R. O. **The annexins**, *Genome Biology*. 2004, 5(4): 219.
- Mourglia-Ettlin, G., Marqués, J. M., Chabalgoity, J. A. and Dematteis, S. **Early peritoneal immune response during *Echinococcus granulosus* establishment displays a biphasic behavior**, *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2011a, 5(8): 1–11.
- Mourglia-Ettlin, G., Amezcua Vesely, M. C., Fraga, R., Baz, A., Merino, M. C., Gruppi, A. and Dematteis, S. ***Echinococcus granulosus* glycoconjugates induce peritoneal B cell differentiation into antibody-secreting cells and cytokine production**, *Parasite Immunology*. 2011b, 33(11): 621–631.

- Mourglia-Ettlin, G., Merlino, A., Capurro, R. and Dematteis, S. **Susceptibility and resistance to *Echinococcus granulosus* infection: Associations between mouse strains and early peritoneal immune responses**, *Immunobiology*. 2016a, 221(3): 418–426.
- Mourglia-Ettlin, G., Cucher, M., Arbildi, P., Rosenzvit, M. and Dematteis, S. **Natural and induced antibodies contribute to differential susceptibility to secondary cystic echinococcosis of Balb/c and C57Bl/6 mice**, *Immunobiology*. 2016b, 221(1): 103–115.
- Nickel, W. **Unconventional secretory routes: Direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells**, *Traffic*. 2005, 6(8): 607–614.
- Nickel, W. **Pathways of unconventional protein secretion**, *Current Opinion in Biotechnology*. 2010, 21(5): 621–626.
- Nielsen, M. and Lund, O. **NN-align. An artificial neural network-based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction**, *BMC Bioinformatics*. 2009, 10(1): 296.
- Okano, M., Satoskar, A. R., Nishizaki, K. and Harn, D. A. **Lacto-N-fucopentaose III Found on *Schistosoma mansoni* Egg Antigens Functions as Adjuvant for Proteins by Inducing Th2-Type Response**, *The Journal of Immunology*. 2001, 167(1): 442–450.
- Okano, M., Satoskar, a R., Nishizaki, K., Abe, M. and Harn, D. **a Induction of Th2 responses and IgE is largely due to carbohydrates functioning as adjuvants on *Schistosoma mansoni* egg antigens.**, *The Journal of immunology*. 1999, 163(12): 6712–7.
- Pakala, T., Molina, M. and Wu, G. Y. **Hepatic Echinococcal Cysts: A Review**, *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. 2016, 4(1): 39–46.
- Panda, S. and Ding, J. L. **Natural Antibodies Bridge Innate and Adaptive Immunity**, *The Journal of Immunology*. 2015, 194(1): 13 LP-20.
- Pearce, E. J., Caspar, P., Grzych, J. M., Lewis, F. A. and Sher, A. **Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*.**, *J Exp Med*. 1991, 173(1): 159–66.
- Pearce, E. J., M. Kane, C., Sun, J., J. Taylor, J., McKee, A. S. and Cervi, L. **Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni***, *Immunological Reviews*. 2004, 201(1): 117–126.
- Pennoit-De Cooman, E., De Rycke, P. H. and Van Outryve, E. J. **Experimental secondary echinococcosis of *Echinococcus granulosus*. V. Quantitative aspects of the infection rate.**, *Tropenmedizin und Parasitologie*. 1974, 25(3): 338–344.
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. and Nielsen, H. **SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions**, *Nature Methods*. 2011, 8: 785.
- Piani, A., Ilg, T., Elefanty, A. G., Curtis, J. and Handman, E. ***Leishmania major* proteophosphoglycan is expressed by amastigotes and has an immunomodulatory effect on macrophage function**, *Microbes and Infection*. 1999, 1(8): 589–599.

- Pone EJ, Zan H, Zhang J, Al-Qahtani A, Xu Z and Casali P **Toll-like receptors and B-cell receptors synergize to induce immunoglobulin class-switch DNA recombination: relevance to microbial antibody responses.**, *Critical Reviews in Immunology*. 2010, 30(1): 1–29.
- Redpath, S. A., Fonseca, N. M. and Perona-Wright, G. **Protection and pathology during parasite infection: IL-10 strikes the balance**, *Parasite Immunology*. 2014, 36(6): 233–252.
- Richards, K. S., Arme, C. and Bridges, J. F. ***Echinococcus granulosus equinus*: an ultrastructural study of murine tissue response to hydatid cysts.**, *Parasitology*. 1983, 86: 407–417.
- Rogan, M. T. **T-cell activity associated with secondary infections and implanted cysts of *Echinococcus granulosus* in BALB/c mice**, *Parasite Immunol.* 1998, 20(11): 527–533.
- Rosenzvit, M. C., Camicia, F., Kamenetzky, L., Muzulin, P. M. and Gutierrez, A. M. **Identification and intra-specific variability analysis of secreted and membrane-bound proteins from *Echinococcus granulosus***, *Parasitology International*. 2006, 55(SUPPL.): 63–67.
- Roth, K., Oehme, L., Zehentmeier, S., Zhang, Y., Niesner, R. and Hauser, A. E. **Tracking plasma cell differentiation and survival**, *Cytometry Part A*. 2014, 85(1): 15–24.
- Sambrook, J., Russell, D.W. **Extraction, purification and analysis of mRNA from eukaryotic cells**. En: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (tercera edición), vol 1, pág 7.9. Editado por: Sambrook, J., Russell, D.W. 2001. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J., Russell, D.W. **Plasmids and their usefulness in molecular cloning**. En: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (tercera edición), vol 1, pág 1.1-1.162. Editado por: Sambrook, J., Russell, D.W. 2001. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saraiva, M. and O'Garra, A. **The regulation of IL-10 production by immune cells**, *Nature Reviews Immunology*. 2010. Nature Publishing Group, 10(3): 170–181.
- Seaton, B. A. and Dedman, J. R. **Annexins**, *BioMetals*. 1998, 11: 399–404.
- Seo, B. S., Park, H. Y., Yoon, H. K., Yoo, Y. C., Lee, J. and Park, S. R. **Dectin-1 agonist selectively induces IgG1 class switching by LPS-activated mouse B cells**, *Immunology Letters*. 2016. Elsevier B.V., 178: 114–121.
- Severi, M. A., Ferragut, G. and Nieto, A. **Antibody response of *Echinococcus granulosus* infected mice: protoscolex specific response during infection is associated with decreasing specific IgG1/IgG3 ratio as well as decreasing avidity.**, *Parasite immunology*. 1997, 19(12): 545–552.
- Shapiro-Shelef, M. and Calame, K. **Regulation of plasma-cell development**, *Nature Reviews Immunology*. 2005, 5(3): 230–242.

Siles-Lucas, M. and Hemphill, A. **Cestode parasites: Application of *in vivo* and *in vitro* models for studies on the host-parasite relationship**, *Advances in Parasitology*. 2002, 51: 133–230.

Siles-Lucas, M., Sánchez-Ovejero, C., González-Sánchez, M., González, E., Falcón-Pérez, J. M., Boufana, B., Fratini, F., Casulli, A. and Manzano-Román, R. **Isolation and characterization of exosomes derived from fertile sheep hydatid cysts**, *Veterinary Parasitology*. 2017. Elsevier B.V., 236: 22–33.

Siracusano, A., Riganò, R., Ortona, E., Profumo, E., Margutti, P., Buttari, B., Delunardo, F. and Teggi, A. **Immunomodulatory mechanisms during *Echinococcus granulosus* infection**, *Experimental Parasitology*. 2008, 119(4): 483–489.

Siracusano, A., Teggi, A. and Ortona, E. **Human Cystic Echinococcosis: Old problems and new perspectives**, *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2009, 2009: 474368.

Smyth J.D., Davies Z. **Occurrence of physiological strains of *Echinococcus granulosus* demonstrated by *in vitro* culture of protoscoleces from sheep and horse hydatid cysts**. *Int J Parasitol*. 1974; 4(4):443-5.

Solito, E., Nuti, S. and Parente, L. **Dexamethasone-induced translocation of lipocortin (annexin) 1 to the cell membrane of U-937 cells.**, *British Journal of Pharmacology*. 1994, 112(2): 347–348.

Song, X., Hu, D., Zhong, X., Wang, N., Gu, X., Wang, T., Peng, X. and Yang, G. **Characterization of a secretory annexin in *Echinococcus granulosus***, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2016, 94(3): 626–633.

Soro, P. G., Morales-A, P., Martínez-M, J. A., Morales-A, S., Copín, S. G., Marcos, M. A. and Gaspar, M. L. **Differential involvement of the transcription factor *Blimp-1* in T cell-independent and -dependent B cell differentiation to plasma cells.**, *Journal of immunology*. 1999, 163(2): 611–7.

Sterla, S., Sato, H. and Nieto, A. ***Echinococcus granulosus* human infection stimulates low avidity anticarbohydrate IgG2 and high avidity anti-peptide IgG4 antibodies**, *Parasite Immunology*. 1999, 21(1): 27–34.

Suchitra, S., Anbu, K. A., Rathore, D. K., Mahawar, M., Singh, B. P. and Joshi, P. ***Haemonchus contortus* calreticulin binds to C-reactive protein of its host, a novel survival strategy of the parasite**, *Parasite Immunology*. 2008, 30(6–7): 371–374.

Tamarozzi, F., Mariconti, M., Neumayr, A. and Brunetti, E. **The intermediate host immune response in cystic echinococcosis**, *Parasite Immunology*. 2016, 38(3): 170–181.

Tanudji, M., Hevi, S. and Chuck, S. L. **Improperly folded green fluorescent protein is secreted via a non-classical pathway**, *Journal of Cell Science*. 2002, 115(19): 3849 LP-3857.

Tararam, C. A., Farias, L. P., Wilson, R. A. and Leite, L. C. de C. ***Schistosoma mansoni* Annexin 2: Molecular characterization and immunolocalization**, *Experimental Parasitology*. 2010, 126(2): 146–155.

Tawill, S., Le Goff, L., Ali, F., Blaxter, M. and Allen, J. E. **Both Free-Living and Parasitic Nematodes Induce a Characteristic Th2 Response That Is Dependent on the Presence of Intact Glycans**, *Infection and Immunity*. 2004, 72(1): 398–407.

Thomas, P. G. and Harn, D. A. **Immune biasing by helminth glycans**, *Cellular Microbiology*. 2004, 6(1): 13–22.

Thompson, R. C. A. ***Echinococcus* and Hydatid Disease**. 1995. Oxford: CAB International.

Thompson, R. C. A. **The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus***, *Experimental Parasitology*. 2008, 119(4): 439–446.

Thompson, R. C. A. and Jenkins, D. J. ***Echinococcus* as a model system: Biology and epidemiology**, *International Journal for Parasitology*. 2014. Australian Society for Parasitology Inc., 44(12): 865–877.

Tsai, T.-H., Wang, M., Di Poto, C., Hu, Y., Zhou, S., Zhao, Y., *et al.* **LC–MS Profiling of N-Glycans Derived from Human Serum Samples for Biomarker Discovery in Hepatocellular Carcinoma**, *Journal of Proteome Research*. 2014. American Chemical Society, 13(11): 4859–4868.

Urrea-París, M. A., Moreno, M. J., Rodríguez-Caabeiro, F. and Casado, N. **Chemoprophylactic praziquantel treatment in experimental hydatidosis**, *Parasitology Research*. 2001, 87(6): 510–512.

Vale, A. M., Kearney, J. F., Nobrega, A. and Schroeder, H. W. **Development and Function of B Cell Subsets**, En: *Molecular Biology of B Cells*, (Second Edition), pág 100. Editado por: Alt F. W., Honjo T., Radbruch A. and Reth M. 2015. Academic Press in imprint of ELSEVIER.

van Die, I. and Cummings, R. D. **Glycans modulate immune responses in helminth infections and allergy.**, *Chemical immunology and allergy*. 2006, 90: 91–112.

van Die, I. and Cummings, R. D. **Glycan gimmickry by parasitic helminths: A strategy for modulating the host immune response?**, *Glycobiology*. 2010, 20(1): 2–12.

van Genderen, H. O., Kenis, H., Hofstra, L., Narula, J. and Reutelingsperger, C. P. M. **Extracellular annexin A5: Functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization**, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2008, 1783(6): 953–963.

Velupillai, P. and Harn, D. A. **Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220+ cells from *Schistosoma*-infected mice: a mechanism for regulation of CD4+ T-cell subsets.**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994, 91(1): 18–22.

Velupillai, P., Secor, W. E., Horauf, A. M. and Harn, D. A. **B-1 cell (CD5+B220+) outgrowth in murine schistosomiasis is genetically restricted and is largely due to activation by polylectosamine sugars.**, *The Journal of Immunology*. 1997, 158(1): 338 LP-344.

Virginio, V. G., Monteiro, K. M., Drumond, F., De Carvalho, M. O., Vargas, D. M., Zaha, A. and Ferreira, H. B. **Excretory/secretory products from in vitro-cultured *Echinococcus granulosus* protoscoleces**, *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2012, 183(1): 15–22.

Virginio, V. G., Taroco, L., Ramos, A. L., Ferreira, A. M., Zaha, A., Ferreira, H. B. and Hernández, A. **Effects of protoscoleces and AgB from *Echinococcus granulosus* on human neutrophils: Possible implications on the parasite's immune evasion mechanisms**, *Parasitology Research*. 2007, 100(5): 935–942.

Vuitton, D. A. **The ambiguous role of immunity in echinococcosis: Protection of the host or of the parasite?**, *Acta Tropica*. 2003, 85(2): 119–132.

Walker, M., Baz, A., Dematteis, S., Stettler, M., Gottstein, B., Schaller, J. and Hemphill, A. **Isolation and Characterization of a Secretory Component of *Echinococcus multilocularis* Metacestodes Potentially Involved in Modulating the Host-Parasite Interface**, *Infection and Immunity*. 2004, 72(1): 527–536.

Wang, K. H., Guo, Y. J., Li, K., Lu, Y. M., Zhang, Y., Sun, S. H., Yan, H. L. and Zhang, S. **Molecular characterization and anticoagulant activity of a novel annexin derived from the *Taenia solium***, *Acta Tropica*. 2006, 99(2–3): 165–172.

White C.A. & Kennedy J.F. **Oligosaccharides**. En: Carbohydrate Analysis a practical approach, pag: 37-53. Editado por: Chaplin M.F. & Kennedy, J.F. 1986. IRL Press

World Health Organization. **Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases**, *Second WHO report on neglected tropical diseases*. 2013.

Wiria, A. E., Djuardi, Y., Supali, T., Sartono, E. and Yazdanbakhsh, M. **Helminth infection in populations undergoing epidemiological transition: a friend or foe?**, *Seminars in Immunopathology*. 2012, 34(6): 889–901.

Wu, C., Hou, N., Piao, X., Liu, S., Cai, P., Xiao, Y. and Chen, Q. **Non-immune immunoglobulins shield *Schistosoma japonicum* from host immunorecognition**, *Scientific Reports*. 2015, 5(1): 13434.

Yan, H. li, Xue, G., Mei, Q., Ding, F. xiang, Wang, Y. zhao and Sun, S. han **Calcium-dependent proapoptotic effect of *Taenia solium* metacestodes annexin B1 on human eosinophils: A novel strategy to prevent host immune response**, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2008, 40(10): 2151–2163.

Yang, Y. Y. M., Li, X. H., Brzezicka, K., Reichardt, N. C., Wilson, R. A., van Diepen, A. and Hokke, C. H. **Specific anti-glycan antibodies are sustained during and after parasite clearance in *Schistosoma japonicum*-infected rhesus macaques**, *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2017, 11(2).

Yazid, S., Sinniah, A., Solito, E., Calder, V. and Flower, R. J. **Anti-Allergic Cromones Inhibit Histamine and Eicosanoid Release from Activated Human and Murine Mast Cells by Releasing Annexin A1**, *PLOS ONE*. 2013, 8(3): e58963.

Zaccone, P., Feheérvári, Z., Jones, F. M., Sidobre, S., Kronenberg, M., Dunne, D. W. and Cooke, A. ***Schistosoma mansoni* antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes**, *European Journal of Immunology*. 2003, 33(5): 1439–1449.

Zehentmeier, S., Roth, K., Cseresnyes, Z., Sercan, Ö., Horn, K., Niesner, R. A., Chang, H. D., Radbruch, A. and Hauser, A. E. **Static and dynamic components synergize to form a stable survival niche for bone marrow plasma cells**, *European Journal of Immunology*. 2014, 44(8): 2306–2317.

Zheng, Y., Guo, X., Su, M., Guo, A., Ding, J., Yang, J., *et al.* **Regulatory effects of *Echinococcus multilocularis* extracellular vesicles on RAW264.7 macrophages**, *Veterinary Parasitology*. 2017, 235: 29–36.