

Tesis de Maestría - PEDECIBA Biología, Biología celular y molecular

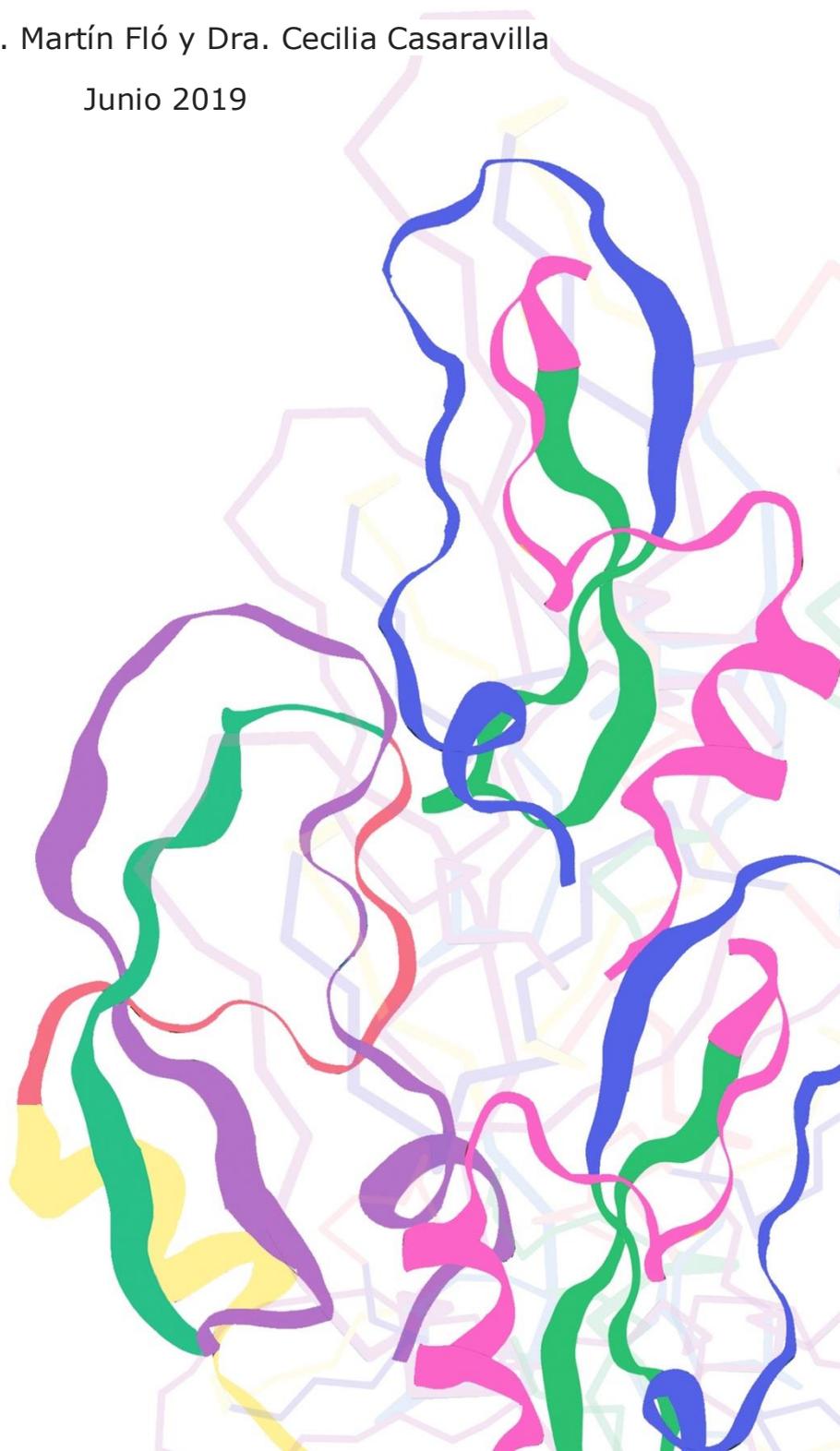
Inhibidores Kunitz de *Echinococcus granulosus*: producción y estudio de efectos sobre activación y proliferación de macrófagos

Lic. Camila Sagasti

Tutor: Dr. Álvaro Díaz

Co-tutores: Dr. Martín Fló y Dra. Cecilia Casaravilla

Junio 2019



Agradecimientos

En primer lugar quería agradecer a mis excelentes tutores, Álvaro, Martín y Ceci, por haber dedicado su tiempo a mi formación, siempre con tan buena disposición. Por motivarme siempre a dar lo mejor de mí. Gracias por las charlas y los consejos.

En segundo lugar me gustaría agradecer a la Dra. Cecilia Fernández, quien fue una guía muy importante durante el desarrollo de esta Tesis. Gracias por el tiempo y las enseñanzas.

Quería agradecer al Dr. Otto Pritsch, quien sin pedir nada a cambio me abrió las puertas de su laboratorio, el Laboratorio de Inmunovirología del Instituto Pasteur, y me permitió realizar gran parte de mi trabajo de Tesis allí, utilizar equipos y reactivos; y a los compañeros del laboratorio de Inmunovirología por haberme recibido como una integrante más y haberme dado un lugar en su laboratorio, así como a los integrantes de la Unidad de Biofísica de Proteínas, por ayudarme cuando lo necesitaba.

También quisiera agradecer al especialista en estadística, Carlos González, quien de manera totalmente desinteresada y con muchas ganas, nos enseñó sobre estadística, lo que fue de suma importancia para el análisis de los resultados de esta Tesis.

Quería agradecer a las agencias financiadoras que hicieron posible la realización de este trabajo: CSIC, por financiar el proyecto Grupos y el proyecto Iniciación, y CAP, por financiar mi beca de Maestría y de Finalización de la Maestría.

Gracias a mis compañeros del laboratorio de Inmunología, por crear un ambiente de trabajo tan lindo, por estar siempre cuando necesitaba el préstamo de un reactivo, instrucciones de cómo usar algún equipo, o simplemente unas palabras.

Finalmente, un agradecimiento muy especial a mis amigos de la casita del medio (y Diego), de quienes aprendí mucho, en todo sentido. Gracias por recibirme siempre con una sonrisa, por el apoyo y el cariño de todos los días y en particular gracias a Yami, por enseñarme sobre células, Elisa, citometría y más.

Resumen

La presente Tesis de maestría se centró en la producción y caracterización de efectos sobre la respuesta inflamatoria y proliferativa de macrófagos de inhibidores Kunitz de *Echinococcus granulosus* (EgKUs) con actividad sobre canales catiónicos o sobre proteasas de serina.

La fase larvaria de *E. granulosus* causa en sus hospederos (hospederos intermediarios) una respuesta inmune del tipo Th2 con un componente Th1, superpuestos con un fuerte componente regulador que le permite instalarse y luego desarrollar infecciones crónicas. Entre las moléculas potencialmente involucradas en esta inmuno-regulación están los miembros de la familia EgKU, probablemente secretados hacia los hospederos. En esta Tesis se trabajó con 5 proteínas EgKU: EgKU-1, EgKU-3, EgKU-4, EgKU-9 y EgKU-2, interesantes por sus actividades y/o por sus patrones de expresión en el ciclo de vida del parásito. EgKU-1 y EgKU-4, parálogos cercanos, bloquean canales de potasio activados por voltaje (K_v) y canales de sodio activados por pH ácido (ASIC), sin tener actividad significativa sobre proteasas. Al menos en *E. multilocularis*, una especie muy cercana, EgKU-1 y EgKU-4 se encuentran altamente expresados en la oncosfera, estadio que infecta al hospedero intermediario. EgKU-3 inhibe quimotripsina, no bloquea canales y se encuentra entre los transcritos más expresados en el gusano adulto de *E. granulosus*. EgKU-9 inhibe quimotripsina y elastasa y EgKU-2 inhibe quimotripsina, faltando para ambas proteínas una caracterización cinética más detallada, así como información sobre posible actividad sobre canales. EgKU-2 y EgKU-9 son los transcritos más expresados en la oncosfera de *E. granulosus*.

Los canales catiónicos, y en menor medida las proteasas de serina son blancos farmacológicos prometedores en enfermedades mediadas por el sistema inmune. En macrófagos y células dendríticas, K_v1.3 y K_v1.5 regulan la activación en respuesta a agonistas de TLR. Los K_v también son necesarios para la proliferación de macrófagos inducida por el M-CSF; este factor de crecimiento es responsable de la proliferación de macrófagos homeostática, y de parte de la proliferación inflamatoria de estas células observada en las infecciones por helmintos.

Este trabajo se basó en la hipótesis de que los EgKUs, y especialmente aquellos con actividad sobre canales catiónicos, tienen actividades inmuno-moduladoras que contribuyen a la evasión inmunológica por *E. granulosus*.

Se produjeron EgKU-1, EgKU-3, EgKU-4 y EgKU-9 recombinantes en *Escherichia coli* con niveles de endotoxinas suficientemente bajos para su uso en ensayos funcionales con macrófagos. EgKU-2 no se logró producir soluble en cantidades significativas en *E. coli* ni en células S2 de *Drosophila melanogaster*.

Se determinó que EgKU-9 es un inhibidor de alta afinidad de la quimotripsina-bovina y de la elastasa porcina, con constantes de inhibición del orden de 10⁻¹¹ M. EgKU-9 quedó disponible para determinar posible actividad sobre canales y para ensayos inmunológicos por parte del grupo. Por razones de tiempo no pudo ser incluido en los experimentos con macrófagos detallados a continuación.

EgKU-1 y EgKU-4 ejercieron, con diferencias entre sí, efectos inhibitorios sobre la producción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-12/23p40 en macrófagos derivados de médula ósea de ratón (BMDM) estimulados con LPS, empleado como

agonista de TLR modelo. Además, *EgKU-1* pero no *EgKU-4* tuvo efecto potenciador sobre la citoquina anti-inflamatoria IL-10 en el mismo sistema. En el rango de concentración de inhibidores empleado (10 nM - 1 μ M), los efectos no fueron imitados por *EgKU-3*, que como se dijo no posee actividad de bloqueo de canales. Sin embargo, los efectos de *EgKU-1* y/o *EgKU-4* observados tampoco fueron imitados por inhibidores sintéticos de $K_v1.3$, $K_v1.5$, ni de $K_{Ca3.1}$, otro canal catiónico inmunológicamente relevante.

EgKU-4, incluso a dosis bajas (10 nM), inhibió la proliferación de BMDM inducida por M-CSF. En cambio no se observó inhibición de la proliferación por *EgKU-1*, cuya principal diferencia con *EgKU-4* está en que carece de una corta extensión C-terminal fuertemente básica presente en su parólogo. Dado que esa extensión es similar a la presente en un inhibidor de tipo Kunitz conocido de $K_v1.3$, se abre la posibilidad que *EgKU-4* inhiba la proliferación al menos en parte por bloqueo de este canal. En concordancia, el efecto de *EgKU-4* sobre la proliferación fue imitado, a nivel cualitativo, por el bloqueante de $K_v1.3$ margatoxina. Finalmente, *EgKU-3* también inhibió la proliferación, pero solamente a una dosis alta (1 μ M).

Los resultados de esta Tesis sugieren que canales iónicos involucrados en la regulación de la respuesta inmune, potencialmente incluyendo $K_v1.3$ en el caso de *EgKU-4*, son blancos de los inhibidores Kunitz de *E. granulosus*. Los efectos anti-inflamatorios de los *EgKU* pueden ser relevantes en el contexto fisiopatológico de la infección, regulando tanto aspectos de la rama Th1 como la proliferación inflamatoria de macrófagos, que en principio es un mecanismo típico de la respuesta Th2. A su vez este trabajo sienta las bases para la producción de proteínas Kunitz recombinantes de forma que sea posible su utilización en ensayos funcionales con células inmunes.

Lista de abreviaturas

- 2YT: medio de cultivo (del inglés *2 x yeast extract and triptone*)
- AAM: macrófagos alternativamente activados (del inglés *alternative activated macrophages*)
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- ADNasa: desoxirribonucleasa
- AMC: 7-aminocumarina
- APC: alofocianina (del inglés *allophycocyanin*)
- APS: persulfato de amonio (del inglés *ammonium persulfate*)
- ARN: ácido ribonucleico
- ASIC: canales iónicos activados por pH ácido (del inglés *acid-sensing ion channels*)
- ATP: adenosina trifosfato (del inglés *Adenosine triphosphate*)
- BCR: receptor de célula B (del inglés *B cell receptor*).
- BMDC: células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón (del inglés *bone-marrow derived dendritic cells*)
- BMDM: macrófagos derivados de médula ósea de ratón (del inglés *bone-marrow derived macrophages*)
- BPTI: inhibidor de tripsina pancreática bovina (del inglés *bovine pancreatic trypsin inhibitor*).
- BrdU: 5-bromo-2'-desoxiuridina
- BSA: seroalbúmina bovina (del inglés *bovine serum albumin*)
- CCL- ligando de quimioquina con motivo C-C (del inglés *C-C motif chemokine ligand*)
- CD: cúmulo de diferenciación (del inglés *cluster of differentiation*)
- CDL: ligando del cúmulo de diferenciación (del inglés *cluster of differentiation ligand*)
- CHEA: Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la Universidad de la República)
- ChiL3: proteína de tipo quitinasa 3 (del inglés *chitinase-like protein 3*)
- CLEC4F: miembro F del dominio lectina tipo-C de la familia 4 (del inglés *C-type lectin domain family 4 member F*)
- CRAC: canales activados por liberación de calcio (del inglés *calcium release activated channels*)
- CXCL: ligando de quimioquina con motivo C-X-C (del inglés *C-X-C motif chemokine ligand*).
- DMEM: medio Eagle modificado por Dulbecco (del inglés *Dulbecco's Modified Eagle medium*).

DMSO: dimetilsulfóxido

dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato

DsbC: disulfuro isomerasa tipo C (del inglés *disulfide bond isomerase C*)

DTT: ditioneitol

DTx: dendrotoxinas

EDTA: ácido etilendiamino tetraacético (del inglés *ethylenediaminetetraacetic acid*)

ELISA: enzimo-inmuno-ensayo (del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*).

FcεRI: receptor fc de alta afinidad para IgE (del inglés *Fc ε receptor I*)

FITC: isotiocianato de fluoresceína (del inglés *fluorescein isothiocyanate*)

FoxP3: factor de transcripción (del inglés *forkhead box P3*)

FPLC: cromatografía líquida rápida de proteínas (del inglés *fast protein liquid chromatography*)

GFP: proteína verde fluorescente (del inglés *green fluorescent protein*).

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

HF: líquido hidático (del inglés *hidatid fluid*)

Hisx6: tandem de 6 histidinas

IC₅₀: La mitad de la concentración inhibitoria máxima

IFN-γ: interferon-γ

IgE: inmunoglobulina de clase E

IgG: inmunoglobulina de clase G

IgM: inmunoglobulina de clase M

IL: interleuquina

ILC: célula linfoide innata (del inglés *innate lymphoid cell*)

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible (del inglés *inducible nitric oxide synthase*)

IMAC: cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (del inglés *immobilized metal affinity chromatography*)

IP3: inositol 1,4,5,-trifosfato (del inglés *inositol 1,4,5,-trisphosphate*)

IPTG: isopropil β-D-1 tiogalactopiranosido

K_{2P}: canal de potasio de doble poro

K_{Ca}: canal de potasio activado por calcio

K_{ir}: canal de potasio de rectificación interna

KU: *EgKU*

K_v: canal de potasio activado por voltaje

LAL: test de determinación del nivel de endotoxinas en muestras (*Limulus amoebocyte lysate test*)

LB: medio de cultivo *Luria-Bertani*

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

LPS: lipopolisacárido (de *Escherichia coli*)

MALDI-TOF: ionización por laser asistida por matriz y detección por tiempo de vuelo (del inglés *matrix assisted light desorption ionization-time of flight*)

MBP: proteína de unión a maltosa (del inglés *maltose-binding protein*)

M-CSF: factor estimulador de colonias de macrófagos (del inglés *macrophage colony-stimulating factor*)

MgTx: margatoxina

MHCII: molécula del complejo mayor de histocompatibilidad tipo de II (del inglés *major histocompatibility complex II*).

Nav: canal de sodio activado por voltaje

NFAT: factor de transcripción (del inglés *nuclear factor of activated T-cells*)

NK: célula asesina natural (del inglés *natural killer cell*)

NLR: Dominio de unión a nucleótidos con repetidos ricos en leucina (del inglés *nucleotide-binding domain, leucine-rich repeats*)

NO: óxido nítrico (del inglés *nitric oxide*)

NOS2: óxido nítrico sintasa 2 (del inglés *nitric oxide synthase 2*)

P3: proteína con dominio pirina 3 (del inglés *pyrin domain containing 3*)

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida (del inglés *polyacrylamide gel electrophoresis*)

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés *pathogen associated molecular pattern*).

PAR: receptores activados por acción de proteasas (del inglés *protease-activated receptors*).

PBS: solución salina tamponada con fosfato (del inglés *phosphate-buffered saline*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *polymerase chain reaction*)

PD-L: ligando de los receptores de muerte programada (del inglés *programmed death ligand*)

PE: ficoeritrina (del inglés *phycoerythrin*)

PE-Cy7: conjugado en tándem de PE y la cianina Cy7.

PerCP: proteínas peridininina clorofila (del inglés *peridinin-chlorophyll proteins*)

PI: punto isoeléctrico

PLC: fosfolipasa-C (del inglés *phospholipase-C*)

PM: peso molecular

PMSF: fluoruro de fenil metil sulfonilo (del inglés *phenylmethylsulfonyl fluoride*)

PRR: Receptor de reconocimiento de patrones (del inglés *pattern recognition receptor*)

PSC: protoescólicas

RE: retículo endoplasmático

Relm-a: molécula de tipo resistina-a (del inglés *resistin-like molecule-a*)

RF: libre de enzimas de restricción (del inglés *restriction free*)
rpm: revoluciones por minuto
ROS: especies reactivas del oxígeno (del inglés *reactive oxygen species*)
S2: Schneider 2
SDS: dodecil sulfato de sodio (del inglés *sodium dodecylsulphate*)
Strep: estreptavidina (del inglés *streptavidin*)
TCR: receptor de célula T (del inglés *T cell receptor*).
TEV: proteasa (del inglés *Tobacco Etch Virus protease*)
TGF- β : Factor de crecimiento transformante β (del inglés *transforming growth factor β*)
Th: linfocito t colaboradores (del inglés *T helper lymphocyte*)
TLR: receptor de tipo toll (del inglés *toll-like receptor*)
TMB: tetrametilbencidina
TNF- α : factor de necrosis tumoral- α (del inglés *tumor necrosis factor- α*)
Tritón X-100: t-octil fenoxipolietoxietanol
 V_m : voltaje de la membrana plasmática

Abreviaturas y constantes utilizadas en los ensayos de cinética enzimática

E: enzima
EI: complejo enzima-inhibidor
ES: complejo enzima-sustrato
I: inhibidor
I*: inhibidor clivado
P: producto
S: sustrato
 k_1 : constante cinética de segundo orden de asociación del complejo enzima-inhibidor
 k_{-1} : constante de primer orden de disociación del complejo enzima-inhibidor
 k_2 : constante de primer orden de disociación del complejo enzima-inhibidor clivado
 k_{-2} : constante cinética de segundo orden de asociación del complejo enzima-inhibidor clivado
 K_i : constante de equilibrio de disociación enzima-inhibidor
 K_i^* : constante de equilibrio global de inhibición
 K_{iap}^* : constante de equilibrio global de inhibición aparente, es decir, la observada en presencia de sustrato
 K_M : constante de Michaelis-Menten

K_{Map} : constante de Michaelis-Menten aparente, es decir, la observada en presencia de inhibidor

k_{obs} : constante de velocidad aparente de primer orden de la formación del producto a partir de la catálisis de la enzima sobre el sustrato, en presencia de inhibidor.

Índice de Contenidos

Agradecimientos.....	I
Resumen.....	II
Lista de abreviaturas.....	IV
1. Introducción.....	1
1.1. Respuesta inmune frente a infecciones por parásitos helmintos.....	2
1.1.1. Macrófagos.....	4
1.1.2. Macrófagos en la respuesta inmune a helmintos.....	5
1.1.2.1. Activación alternativa de macrófagos.....	5
1.1.2.2. Proliferación de macrófagos.....	5
1.2. <i>Echinococcus granulosus</i>	6
1.2.1. Ciclo de vida de <i>Echinococcus granulosus</i>	6
1.2.2. Respuesta inmune a <i>E. granulosus</i> en el hospedero intermediario.....	7
1.2.3. Respuesta inmune a <i>E. granulosus</i> en el hospedero definitivo.....	10
1.2.4. Interacción hospedero-parásito en la infección por <i>E. granulosus</i>	10
1.2.4.1. Contexto general.....	10
1.2.4.2. Moléculas y estructuras supra-moleculares posiblemente asociadas a respuestas inmunes reguladoras.....	13
1.3. Inhibidores tipo Kunitz.....	15
1.3.1. Peptidasas de serina.....	17
1.3.1.1. Proteasas en el sistema inmune.....	19
1.3.1.2. Inhibición de proteasas de serina por inhibidores tipo Kunitz.....	20
1.3.1.2.1. Mecanismo y cinética de la inhibición por inhibidores tipo Kunitz..	20
1.3.2. Canales de potasio.....	24
1.3.2.1. Canales de potasio activados por voltaje.....	24
1.3.2.2. Canales de potasio en el sistema inmune.....	25
1.3.3. Canales de sodio activados por pH ácido (ASIC).....	29
1.3.3.1. ASIC en el sistema inmune.....	29
1.3.4. Bloqueo de canales de potasio y ASIC por inhibidores tipo Kunitz.....	30
1.4. Proteínas tipo Kunitz de helmintos, con énfasis en <i>E. granulosus</i>	31
1.4.1. Proteínas tipo Kunitz de parásitos expuestas a los hospederos.....	31
1.4.2. Proteínas tipo Kunitz de <i>E. granulosus</i>	32
1.4.2.1. Antecedentes del grupo de trabajo.....	32
1.4.2.2. Otros antecedentes.....	35

1.4.2.3. Datos sobre patrones de expresión.....	36
Anexo: cinética enzimática clásica.....	39
2. Objetivos.....	41
2.1. Objetivo general.....	42
2.2. Objetivos específicos.....	42
3. Materiales y Métodos.....	43
3.1. Reactivos generales.....	44
3.2. Producción de proteínas Kunitz recombinantes.....	44
3.2.1. Técnicas generales.....	44
3.2.1.1. PCR.....	44
3.2.1.2. Electroforesis en gel de agarosa.....	45
3.2.1.3. SDS-PAGE.....	45
3.2.1.4. Determinación de la concentración de las proteínas.....	45
3.2.1.5. Identificación de las proteínas por MALDI-TOF-MS.....	45
3.2.2. Procedimientos generales.....	46
3.2.2.1. Transformación de <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pLysS por choque térmico.....	46
3.2.2.2. Protocolo general de purificación de proteínas con <i>tag</i> de polihistidina.....	46
3.2.2.3. Protocolo general para la purificación de proteínas por intercambio iónico.....	46
3.2.3. Producción de <i>EgKU-1</i> , <i>EgKU-3</i> y <i>EgKU-4</i> recombinantes.....	47
3.2.4. Producción de <i>EgKU-9</i> y <i>EgKU-2</i> recombinantes.....	49
3.2.4.1. Clonado de las secuencias en los vectores de expresión.....	49
3.2.4.2. Expresión y purificación de <i>EgKU-9</i> y <i>EgKU-2</i> en <i>E. coli</i>	54
3.2.4.3. Expresión y purificación de <i>EgKU-2</i> en la línea celular S2 de <i>D. melanogaster</i>	55
3.3. Ensayos cinéticos.....	56
3.3.1. Determinación de constantes de inhibición.....	57
3.3.2. Estudio del mecanismo de inhibición de la quimotripsina- α bovina por <i>EgKU-9</i>	58
3.4. Ensayos inmunológicos con BMDM.....	59
3.4.1. Procedimientos y técnicas generales.....	59
3.4.1.1. Cultivo celular de BMDM.....	59
3.4.1.2. Citometría de flujo.....	60
3.4.1.2.1. Marcado de componentes de superficie.....	60

3.4.1.2.2. Marcado de componentes nucleares.....	61
3.4.1.3. Cuantificación de citoquinas en sobrenadantes por ELISA (del inglés <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	62
3.4.1.4. Ensayo de Griess.....	63
3.4.2. Control de inhibidores Kunitz recombinantes, inhibidores comerciales y vehículos, en términos de inducción de citoquinas y nitritos en BMDM	63
3.4.3. Evaluación de los efectos de los inhibidores Kunitz sobre la respuesta de BMDM al LPS.....	63
3.4.4. Evaluación de los efectos de los inhibidores Kunitz sobre la proliferación de BMDM inducida por M-CSF	64
3.5. Análisis estadístico de los datos.....	64
4. Resultados y Discusión	65
4.1. Producción de <i>EgKU-9</i> y <i>EgKU-2</i> recombinantes.....	66
4.1.1. Clonado en los vectores de expresión.....	66
4.1.2. Expresión y purificación de <i>EgKU-9</i> y <i>EgKU-2</i> en <i>E. coli</i>	69
4.1.3. Producción de <i>EgKU-2</i> en la línea celular S2 de <i>D. melanogaster</i>	77
4.2. Caracterización de la actividad de inhibición de proteasas de serina pancreáticas por <i>EgKU-9</i>	83
4.2.1. Determinación de constantes globales de inhibición.....	83
4.2.2. Caracterización del mecanismo de inhibición de <i>EgKU-9</i> frente a la quimotripsina- α bovina.....	88
4.3. Control de las producciones de inhibidores Kunitz recombinantes, inhibidores comerciales y vehículos, en términos de inducción de citoquinas y nitritos en BMDM	91
4.4. Efectos sobre la respuesta de BMDM a agonista de TLR	96
4.5. Efectos sobre la respuesta proliferativa de BMDM inducida por M-CSF.....	103
4.6. Conclusiones finales y Perspectivas.....	106
5. Referencias.....	111

Índice de Figuras y Tablas

Figura 1. Ciclo de vida de <i>E. granulosus</i>	7
Figura 2. Microscopía de transmisión electrónica de una oncosfera activada.....	11
Figura 3. Resumen conceptual de las interacciones entre la hidátide de <i>E. granulosus</i> y el hospedero, y las posibilidades de transporte de moléculas solubles en la interfase parásito-hospedero.....	12
Figura 4. Representación de <i>E. granulosus</i> adulto insertado en la base de las vellosidades intestinales.....	13
Figura 5. Estructura del BPTI (PDB: 5PTI).....	16
Figura 6. Modelo estructural de tripsina humana.....	18
Figura 7. Características estructurales del bolsillo de especificidad en las hendiduras catalíticas de quimotripsina, tripsina y elastasa.....	18
Figura 8. Estructura de un canal de potasio activado por voltaje.....	25
Figura 9. Regulación del potencial de membrana durante la activación de receptores en células inmunes.....	26
Figura 10. Principales canales iónicos en macrófagos.....	28
Figura 11. Estructuras de proteínas tipo Kunitz bloqueantes de K_v	30
Figura 12. Filogenia de los 16 miembros de la familia <i>EgKU</i>	33
Figura 13. Alineamiento de secuencias de inhibidores Kunitz seleccionados.....	35
Tabla 1. Actividades de los <i>EgKUs</i> estudiados hasta el momento.....	36
Tabla 2. Datos de expresión de inhibidores Kunitz de <i>E. granulosus</i> que han sido estudiados, y sus ortólogos en <i>E. multilocularis</i>	37
Figura 14. Gráfico representativo de la ecuación de Michaelis-Menten.....	40
Figura 15. Secuencias de aminoácidos de los inhibidores Kunitz recombinantes producidos en <i>E. coli</i>	47
Figura 16. SDS-PAGE de las fracciones eluidas de la purificación de <i>EgKU-1</i> , <i>EgKU-3</i> y <i>EgKU-4</i> por cromatografía de afinidad.....	48
Figura 17. SDS-PAGE del perfil de purificación de <i>EgKU-1</i> , <i>EgKU-3</i> y <i>EgKU-4</i> por cromatografía de intercambio iónico.....	49
Figura 18. Secuencias de aminoácidos de <i>EgKU-9L</i> , <i>EgKU-9C</i> y <i>EgKU-2</i> recombinantes.....	50
Figura 19. Representación esquemática del vector proporcionado por <i>GenScript</i> ..	51
Figura 20. Representación esquemática de las construcciones utilizadas para la expresión de <i>EgKU-9/EgKU-2</i> en <i>E. coli</i>	51

Figura 21. Representación esquemática de la construcción empleada para la expresión de <i>EgKU-2</i> en <i>D. melanogaster</i>	52
Figura 22. Esquema explicativo de la primera PCR.....	52
Figura 23. Esquema explicativo de la segunda PCR.....	53
Tabla 3. Características de los anticuerpos utilizados durante el marcado para citometría de flujo.....	61
Tablas 4. Características de los anticuerpos y estándares utilizados en los ensayos de ELISA.....	62
Figura 24. Gel de agarosa 1% m/v correspondiente a PCR de bacterias transformadas con el producto de la segunda PCR.....	67
Figura 25. Representación esquemática de las construcciones de <i>EgKU-9</i> y <i>EgKU-2</i> recombinantes expresadas en <i>E. coli</i>	68
Figura 26. Representación esquemática de la construcción de <i>EgKU-2</i> recombinante expresado en en <i>D. melanogaster</i>	68
Tabla 5. Pesos moleculares de las construcciones recombinantes y sus componentes.....	69
Figura 27. SDS-PAGE y cromatograma del perfil de purificación de <i>EgKU-9</i> y <i>EgKU-2</i> recombinantes por IMAC.....	69
Figura 28. Cursos temporales de inhibición de la quimotripsina por las fracciones obtenidas por IMAC.....	73
Figura 29. SDS-PAGE del perfil de purificación de DsbC+ <i>EgKU-9</i> , MBP+ <i>EgKU-2</i> y DsbC+ <i>EgKU-2</i> tratadas con TEV y pasadas por IMAC.....	74
Figura 30. Cursos temporales de inhibición de la quimotripsina por las fracciones obtenidas de la segunda IMAC.....	75
Figura 31. SDS-PAGE y cromatograma del perfil de elución de <i>EgKU-9L</i> por intercambio aniónico.....	76
Figura 32. SDS-PAGE de la preparación final de <i>EgKU-9C</i>	77
Figura 33. Gel de agarosa 1% p/v de los productos de PCR de células S2 transfectadas.....	78
Figura 34. Análisis por SDS-PAGE y cromatograma de la purificación por cromatografía de afinidad por streptavidina.....	79
Figura 35. Cursos temporales de inhibición de la quimotripsina por las fracciones obtenidas de cromatografía de afinidad.....	80
Figura 36. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad.....	81

Figura 37. Cursos temporales de inhibición de la quimotripsina por las fracciones obtenidas de cromatografía de afinidad.....	82
Figura 38. SDS-PAGE de la purificación de <i>EgKU-2</i> por intercambio aniónico.....	82
Tabla 6. Rendimientos de las producciones de inhibidores Kunitz recombinantes..	83
Figura 39. Inhibición de quimotripsinas bovina y caninas, tripsina catiónica bovina y elastasa porcina por <i>EgKU-9</i>	85
Tabla 7. Constantes de inhibición globales (K_{Iap}^* y K_I^*) de <i>EgKU-9</i> recombinante frente a proteasas de serina digestivas.....	86
Figura 40. Alineamiento de secuencias de inhibidores Kunitz con distintas especificidades de inhibición.....	87
Figura 41. Gráfico representativo de los cursos temporales de la inhibición de la quimotripsina bovina por <i>EgKU-9L</i>	89
Figura 42. Efecto de la concentración de <i>EgKU-9</i> sobre la constante exponencial..	90
Tabla 8. Constantes cinéticas (k_2 y k_{-2}), constantes de equilibrio (K_I) de disociación del complejo enzima-inhibidor, y constantes globales de inhibición (K_I^*) de <i>EgKU-9</i> recombinante frente a la quimotripsina- α bovina.....	90
Figura 43. Inducción de citoquinas en BMDM estimulados con los inhibidores Kunitz recombinantes e inhibidores comerciales.....	93
Figura 44. Inducción de citoquinas en BMDM estimulados con <i>EgKU-9L</i> y <i>EgKU-9C</i> recombinantes.....	94
Figura 45. Producción de citoquinas en BMDM estimulados con LPS en presencia de inhibidores Kunitz recombinantes o inhibidores comerciales.....	98
Figura 46. Producción de nitrito en BMDM estimulados con LPS en presencia de inhibidores Kunitz recombinantes o inhibidores comerciales.....	99
Figura 47. Estrategia de <i>gating</i> utilizada en el análisis de los ensayos de expresión de moléculas de superficie.....	100
Figura 48. Expresión de marcadores de superficie de BMDM estimulados con LPS en presencia de inhibidores Kunitz recombinantes o inhibidores comerciales.....	101
Figura 49. Estrategia de <i>gating</i> utilizada para el análisis de los experimentos de proliferación de BMDM inducida por M-CSF.....	104
Figura 50. Proliferación de BMDM estimulados con M-CSF en presencia de inhibidores Kunitz recombinantes o inhibidores comerciales.....	105
Figura 51. Hipótesis explicativa de los efectos observados por <i>EgKU-1</i> y <i>EgKU-4</i>	108

1. Introducción

1.1. Respuesta inmune frente a infecciones por parásitos helmintos

Se conoce como helmintos a los endo-parásitos multicelulares de relevancia médica y/o veterinaria. El término helmintos agrupa a organismos filogenéticamente diversos, pertenecientes a los *phyla* platelmintos (trematodos y cestodos) y nematodos ¹.

La infección por helmintos típicamente induce respuestas inmunes del tipo Th2, caracterizadas en términos generales por la activación de eosinófilos, basófilos y mastocitos, células linfoides innatas tipo 2 (ILC2), así como células dendríticas y macrófagos con fenotipos semi-maduros o de activación alternativa, linfocitos B productores de IgE, y proliferación de células T secretoras de IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 ^{1, 2}.

Los mecanismos efectores inducidos por las citoquinas Th2 son muy variados, dependiendo del organismo en el que se producen y del tipo celular sobre el que actúan ^{1, 2}.

En el intestino, las citoquinas IL-4 e IL-13 inducen la producción de mucus, la contracción del músculo liso, y el recambio de células epiteliales, favoreciendo la expulsión de parásitos alojados en este órgano ¹. Las células epiteliales del intestino, frente a la presencia de un parásito multicelular, reconocen y responden al daño del tejido produciendo "alarminas": IL-25, IL-33 y TSLP (linfopoyetina del estroma tímico; del inglés *thymic stroma lymphopoeitin*). Las células ILC2 previamente mencionadas se localizan en las interfaces entre el hospedero y el medio externo (pulmones, intestino, piel) y responden a las "alarminas" produciendo IL-4, IL-5 e IL-13, promoviendo de esta manera un sesgo temprano hacia una respuesta Th2 ³.

En los sitios sistémicos del organismo, los parásitos deben ser destruídos o aislados en vez de expulsados; consecuentemente la respuesta Th2 es bastante distinta ⁴.

Los anticuerpos son particularmente importantes en mediar la protección contra los estadios extra-intestinales. La IgE es capaz inducir la muerte de larvas de parásitos helmintos a través de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos. Basófilos y mastocitos presentan el receptor Fc de alta afinidad para IgE (FcεRI) y el reconocimiento por parte del FcεRI de IgE unido a la superficie del parásito induce su degranulación ⁴.

En los sitios sistémicos, los granulomas son respuestas del hospedero comunes frente a infecciones por helmintos, dirigidas a la encapsulación y/o eliminación del parásito. Las fases iniciales de la formación del granuloma son tradicionalmente asociadas a respuestas locales tipo Th1 o Th1/Th2. Macrófagos especializados que adquieren el fenotipo de células epitelioides y células gigantes multinucleadas rodean al parásito formando un "semi-epitelio", y se observa infiltración de eosinófilos, neutrófilos y linfocitos. Generalmente la respuesta Th2 prevalece sobre

la Th1 y la inflamación disminuye, formándose una cápsula fibrosa de colágeno alrededor del parásito con alguna infiltración distal de células inmunes ^{5, 6}.

Una respuesta apropiada contra parásitos helmintos es la que es capaz de contener la infección, ya sea por expulsión o encapsulamiento, y paralelamente reparar los tejidos dañados por la presencia de un organismo multicelular y los eventos de migración que se dan durante el ciclo de vida de este tipo de parásitos. Los macrófagos alternativamente activados (AAM, del inglés *alternative activated macrophages*) además de contribuir directamente a la eliminación del parásito mediante la producción de moléculas efectoras, cumplen una función esencial en el mantenimiento de la homeostasis y la reparación de los tejidos (ver más adelante) ⁷.

Aunque el hospedero monta una respuesta especializada en la eliminación de parásitos helmintos, estos en general logran sobrevivir por largos períodos de tiempo sin ser expulsados por el sistema inmune de sus hospederos, dado que han desarrollado capacidades inmuno-moduladoras centradas en potenciar la respuesta reguladora del hospedero ¹. La respuesta Th2 del hospedero destinada a eliminar el parásito, junto con la respuesta reguladora que refleja la adaptación de los parásitos a la evasión del sistema inmune, da lugar a una respuesta tipo "Th2 modificada". La misma se caracteriza por altos niveles de IL-4 y de las citoquinas anti-inflamatorias IL-10 y/o TGF- β , una disminución en los niveles de IL-5 e IL-13 y en muchos casos, supresión inmune parásito-específica, con producción de células T y B reguladoras ^{3, 7-9}. Una consecuencia de este fenómeno es que los individuos infectados por helmintos presentan menor frecuencia de alergias y enfermedades autoinmunes ⁴.

En general las moléculas de helmintos expuestas a los hospederos inducen en células de la inmunidad innata respuestas débiles, con muy pocas o ninguna señal de activación. Además, son pocos los PRRs (del inglés *pattern recognition receptors*) identificados o al menos propuestos para motivos expresados en helmintos ^{1, 10}. Sin embargo, muchos productos de helmintos antagonizan la activación convencional inducida por agonistas de receptores de tipo *toll* (TLRs, del inglés *toll-like receptors*) ¹¹⁻¹⁴. De hecho, una característica de las infecciones por parásitos helmintos es la generación de un gran daño en los tejidos de los hospederos, consecuencia de los eventos de migración, crecimiento y ciertas formas de alimentación de estos gusanos de tamaño macroscópico como la hematofagia o la histofagia. Este daño origina señales de peligro endógenas, que son reconocidas por PRRs, incluyendo los TLRs. Es posible que las respuestas a infecciones por parásitos helmintos sea inducida por dos tipos de señales distintas: señales de peligro endógenas que activen de manera inflamatoria a la inmunidad innata, actuando sobre TLRs y otros PRRs, y señales derivadas de moléculas de helmintos propiamente, que actúen sobre receptores aún no identificados. ¹⁴⁻¹⁶. Las señales de peligro podrían ser responsables de la activación inicial de las células innatas, y del componente Th1 observado en algunas infecciones por helmintos, incluyendo la infección por *E. granulosus* ^{4, 10}. Otras señales que podrían contribuir al "priming" inicial de la inmunidad innata en estos contextos, son las provenientes de la interacción entre CD40, presente en células de la inmunidad innata, y CD40L, expresado sobre linfocitos T activados y otras células ¹⁷. En tanto, la detección de

moléculas de helmintos, por PRRs aún no identificados como se mencionó, sería responsable de modificar la activación previamente mencionada, hacia un perfil Th2/regulador. Además, la detección de actividad proteolítica extracorpórea (común en parásitos helmintos, ya que contribuye a su migración y alimentación) por receptores activados por proteasas, receptores PAR (PAR1-4) (del inglés *protease-activated receptors*), probablemente participa en la inducción del perfil de respuesta Th2 ¹⁸⁻²¹.

1.1.1. Macrófagos

El macrófago es una célula de la inmunidad innata particularmente plástica. En los tejidos se distinguen dos grandes poblaciones de macrófagos: los macrófagos derivados de monocitos circulantes en la sangre, que cumplen funciones principalmente en la defensa contra organismos externos, y los macrófagos residentes, que se encargan principalmente del mantenimiento de la homeostasis de los tejidos. Se conoce desde hace décadas que los monocitos de sangre derivan de progenitores en la médula ósea. En cuanto a los macrófagos residentes, observaciones de los últimos 10 años llevaron al concepto que estas células derivan de progenitores embrionarios del saco vitelino, que durante el desarrollo son sembrados en los tejidos y son luego mantenidos por proliferación y/o longevidad celular. Más recientemente, esta última conclusión ha sido matizada. En efecto, se descubrió que aunque la proliferación y la longevidad son importantes en las primeras etapas de vida, a medida que avanza la edad los macrófagos de origen embrionario comienzan a perder la capacidad proliferativa y/o a morir, y se vuelve esencial para repoblar los macrófagos en los tejidos el reclutamiento de monocitos de la sangre. En este contexto homeostático, los macrófagos derivados de monocitos adquieren fenotipo de macrófagos residentes ^{22, 23}. En suma, se considera hoy que los macrófagos residentes en un tejido comprenden células de linaje presente en el tejido desde la etapa embrionaria y células derivadas de la médula ósea. En términos de localización, fenotipo y función, los macrófagos poseen una marcada heterogeneidad. Además, en respuesta a una infección, pueden adquirir un abanico de fenotipos con funciones especializadas. Convencionalmente, estos fenotipos se clasifican en dos grandes grupos: macrófagos clásicamente activados o M1 y alternativamente activados o M2, si bien esto hoy se considera una sobre-simplificación ^{22, 24, 25}. Si bien se comprende aún parcialmente, el origen (embrionario o de médula ósea) y la condición de residente o reclutado afectan la capacidad de los macrófagos de diferenciarse a M1 o M2.

Los macrófagos M1 promueven respuestas inmunes del tipo Th1, mediante la producción de citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas (TNF- α , IL-1 β , IL-12, IL-18, CCL15, CCL20, CXCL8-11, CXCL13), especies reactivas del oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO). Estos macrófagos están especializados en combatir patógenos intracelulares, tienen una gran capacidad de fagocitosis mediada por complemento, y son buenos presentadores de antígenos. Los agonistas de TLRs, incluyendo los que califican como PAMPs (del inglés *pathogen-associated molecular pattern*) y como DAMPs (del inglés *damage-associated molecular pattern*), el IFN- γ producido por linfocitos T y por células *natural killers* (NK), y el CD40L expresado en una gama de células de la inmunidad innata y adaptativa, son ejemplos de señales capaces de inducir la activación M1 de macrófagos ²².

En 1992, Stein, Doyle y colaboradores identificaron un fenotipo de activación del macrófago distinto al macrófago clásicamente activado, inducido por IL-4 e IL-13, al que llamaron activación alternativa ^{26, 27}. Los fenotipos M2, por su importancia en el contexto de las infecciones helmínticas, se introducen en la siguiente sección.

1.1.2. Macrófagos en la respuesta inmune a helmintos.

1.1.2.1. Activación alternativa de macrófagos

Los macrófagos son una gran proporción de las células inflamatorias presentes en el sitio de infección por varios helmintos, incluyendo aquí el hecho de que son un componente principal de los granulomas que en algunos casos se forman alrededor de estos parásitos, como ya se mencionó. La importancia de estas células en las infecciones por helmintos se ha demostrado en estudios donde la sobrevida de los parásitos se ve aumentada cuando se bloquea la función de los macrófagos ²⁸.

Las infecciones por helmintos, como se mencionó previamente, se caracterizan por la inducción de fenotipos alternativos de macrófago. La fuente de IL-4/IL-13 que conduce a la diferenciación a AAM varía con el tejido y estado de la infección, y puede incluir mastocitos, eosinófilos, ILC2 y linfocitos Th2 CD4⁺. En muchos casos, la función principal de los AAM no es la eliminación del parásito, sino evitar la inflamación excesiva y mantener la homeostasis del tejido ^{28, 29}. Algunas moléculas características de los AAM con funciones reparadoras y efectoras en la infección por helmintos, son arginasa-1, ChiL3 (del inglés *chitinase-like protein 3*; también conocida como Ym1), y Relm- α ²⁹⁻³¹.

Ciertos productos de excreción-secreción de helmintos actúan sobre macrófagos induciendo fenotipos reguladores caracterizados por ejemplo por la expresión de moléculas inhibitoras de la activación de linfocitos T. Un ejemplo claro es la molécula ES-62 del nematodo *Acanthocheilonema viteae*, que inhibe la producción de IL-12 en macrófagos expuestos a LPS e IFN- γ ³². Otro ejemplo es un inhibidor de proteasas de cisteína de este parásito, que es capaz de inducir un fenotipo de macrófagos que se caracteriza por la expresión de las moléculas reguladoras PD-L1 y PD-L2, y producción de IL-10; la transferencia adoptiva de estos macrófagos mejora la patología en modelos de alergia y colitis ³³.

1.1.2.2. Proliferación de macrófagos

El mantenimiento en niveles homeostáticos del número de macrófagos residentes, que como se mencionó, en etapas tempranas son de origen embrionario y luego son reemplazados por macrófagos derivados de monocitos, así como el mantenimiento del número de monocitos en la sangre, depende de M-CSF (del inglés *macrophage colony-stimulating factor*). Este factor de crecimiento actúa promoviendo la sobrevida y el tráfico de monocitos, así como la sobrevida y proliferación de los macrófagos residentes. En los vasos sanguíneos, el M-CSF es sintetizado por células del endotelio vascular, y en los tejidos por células epiteliales y del estroma ^{34, 35}.

En los sitios de infección y en muchas condiciones de inflamación estéril, en general el número de macrófagos aumenta. Mientras que en contextos Th1 este aumento se da principalmente por reclutamiento de monocitos ³⁴, en contextos Th2 el número de macrófagos aumenta por proliferación de los macrófagos residentes del tejido, así como de macrófagos recientemente reclutados, derivados de monocitos ³⁶.

Estudios realizados con los nematodos *Heligmosomoides polygyrus bakeri* y *Litomosoides sigmodontis* indican que el aumento inicial en la proliferación de macrófagos residentes ante una infección por helmintos es dependiente de M-CSF, mientras que una vez establecida la respuesta Th2, existe un componente de proliferación inducida por aumento en los niveles de IL-4/IL-13, que es independiente de M-CSF, y que domina sobre la proliferación dependiente de M-CSF ³⁷.

1.2. *Echinococcus granulosus*

El parásito *Echinococcus granulosus* pertenece a la familia taeniidae de platelmintos cestodos. El género *Echinococcus* comprende 9 especies: *E. multilocularis*, *E. vogeli*, *E. oligarthra*, *E. granulosus (sensu stricto)*, *E. equinus*, *E. ortleppi*, *E. canadensis*, *E. shiquicus* y *E. felidis*. Se le llama *E. granulosus sensu lato* al grupo de especies cuyas larvas causan la echinococcosis quística: *E. granulosus (sensu stricto)*, *E. equinus*, *E. ortleppi* y *E. canadensis*; estas especies son distinguibles únicamente mediante análisis genómico. Dado que en la mayor parte de la bibliografía consultada no se realizó genotipado de las especies, de ahora en adelante cuando se haga referencia a *E. granulosus* se supondrá *E. granulosus sensu lato* ³⁸.

1.2.1. Ciclo de vida de *Echinococcus granulosus*

El ciclo de vida de *E. granulosus* involucra a dos hospederos. El hospedero intermediario ungulado (o accidentalmente, humano), aloja la larva o metacestodo, que se desarrolla como una estructura llena de líquido, denominada hidátide. El hospedero definitivo cánido alberga el gusano adulto ^{39, 40}.

El hospedero definitivo se infecta por ingestión de tejidos de hospederos intermediarios que albergan hidátides, las cuales contienen los llamados protoescólices (gusanos larvarios con capacidad de desarrollo a gusanos adultos). Una vez liberados de la hidátide, los protoescólices se adhieren a la superficie mucosa del intestino delgado mediante ventosas, y ganchos situados en una estructura apical denominada rostelo, que una vez instalado el parásito, se extiende hacia las criptas de Lieberkühn. El rostelo posee un grupo de células especializadas con actividad secretora (glándula rostelar). Los protoescólices se desarrollan a gusanos adultos, hermafroditas, que mediante reproducción sexual producen huevos, que son expulsados en las heces del huésped definitivo. Cada uno de los huevos contiene un embrión (oncosfera). Los huevos están rodeados por una cubierta externa gruesa que los hace resistentes a diversas condiciones ambientales, por lo que son capaces de sobrevivir fuera de un hospedero por períodos prolongados ^{39, 40}.

El hospedero intermediario se infecta por ingestión de alimentos o agua contaminados con huevos. Una vez en el intestino, el huevo eclosiona liberando la oncosfera. La oncosfera se activa por efecto de las sales biliares y penetra el epitelio del intestino, asistida por los ganchos, músculos y secreciones de las llamadas glándulas de penetración. La oncosfera es transportada por la sangre o linfa y alcanza órganos internos (principalmente hígado o pulmones), donde se desarrolla el metacestodo. Durante la formación de la hidátide, la oncosfera pierde los ganchos y músculos y forma una cavidad central llena de un líquido denominado líquido hidático (HF, del inglés *hidatid fluid*). Esta cavidad resulta rodeada por la llamada capa germinativa (GL, del inglés *germinal layer*), capaz de generar protoescólices mediante reproducción asexual hacia el interior de la cavidad. La GL además se rodea de una capa acelular externa, cuyo componente principal son mucinas altamente glicosiladas, llamada capa laminar (LL, del inglés *laminated layer*)^{39, 40}. En la Figura 1 se representa el ciclo de vida de *E. granulosus*.

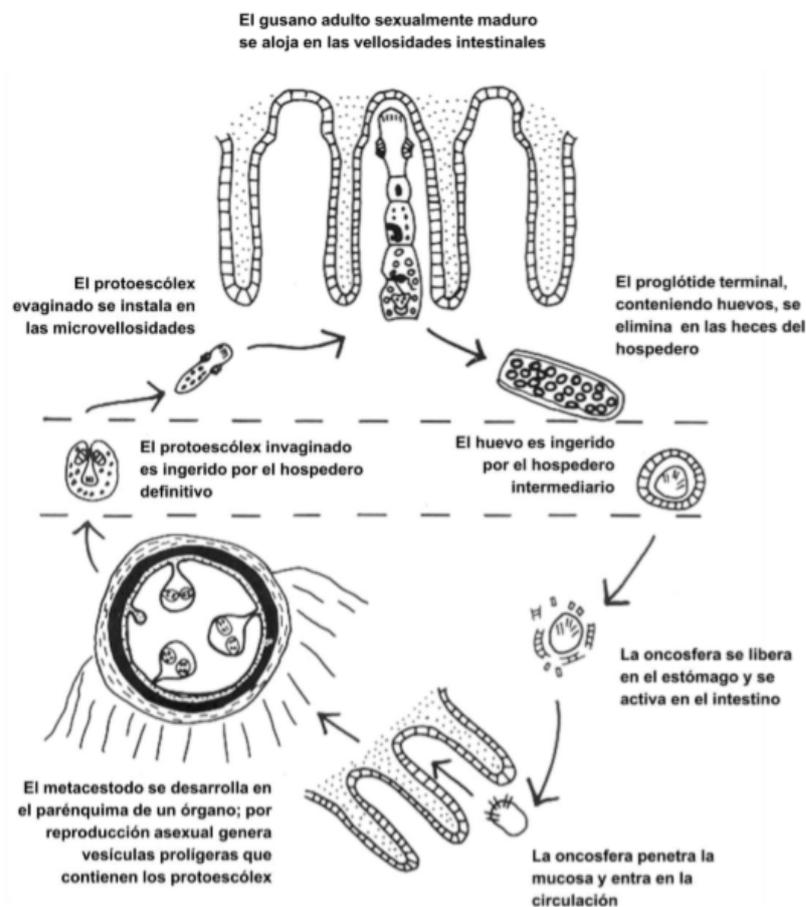


Figura 1. Ciclo de vida de *E. granulosus*. Figura obtenida de Thompson, 1995.

1.2.2. Respuesta inmune a *E. granulosus* en el hospedero intermediario

La larva de *E. granulosus* establece infecciones crónicas, logrando sobrevivir por años en los tejidos internos del hospedero intermediario, rodeada por una capa de colágeno del hospedero, casi sin inflamación local, pese a ser inmunogénica⁴¹.

La respuesta inmune a la infección por *E. granulosus* en el hospedero intermediario puede ser dividida en dos etapas: la etapa pre-enquistamiento (antes de la generación de la capa laminar), y la etapa pos-enquistamiento ⁴².

Para el estudio de la etapa pre-enquistamiento se utilizan dos modelos. La infección con oncosferas, las cuales se transforman naturalmente en hidátides una vez alcanzados los tejidos internos del hospedero, y la infección con protoescólices. Si bien los protoescólices están destinados a infectar el hospedero definitivo y dar lugar al gusano adulto, en caso de ruptura del quiste y liberación de los mismos al medio interno del hospedero intermediario, son capaces de dar lugar a hidátides por desarrollo reverso; este fenómeno, denominado infección secundaria puede ocurrir en contextos fisiopatológicos naturales ⁴².

Los estudios realizados con oncosferas son pocos debido a la dificultad de obtener y mantener el parásito en este estadio. Estos experimentos indican que la oncosfera provoca una fuerte respuesta inmune, que logra eliminar muchas de las oncosferas en pocos días y establecer protección ante una reinfección. Esta protección es mediada por anticuerpos y complemento, y potenciada por la presencia de neutrófilos ⁴².

En el modelo de infección con protoescólices, durante las primeras etapas se produce una fuerte respuesta inflamatoria de tipo granulomatosa capaz de eliminar a la mayoría de los parásitos. Para los parásitos que logran no ser dañados, esta respuesta inflamatoria en general se resuelve, lo que coincide con la aparición de la capa laminar. Luego el metacestodo establecido es rodeado por una cápsula de fibras de colágeno y fibroblastos derivada del hospedero, llamada capa adventicia, con algunos focos de infiltración distal de linfocitos, macrófagos y en algunos casos eosinófilos. En algunos casos, generalmente cuando hay una mala adaptación de la especie de parásito a la especie de hospedero, la inflamación temprana no se resuelve y se desarrolla un granuloma típico en el cual la capa laminar es rodeada de células epitelioides y gigantes multinucleadas, con infiltración de linfocitos, eosinófilos y neutrófilos, y activación del complemento. Mientras que la fibrosis se asocia con una mayor sobrevivencia del parásito, la infiltración de eosinófilos se asocia con su muerte ^{6, 42, 43}.

Una vez establecida la hidátide y resuelta la respuesta inflamatoria inicial, la fase crónica de la infección por *E. granulosus* se caracteriza por una respuesta del tipo Th2, con un leve componente Th1, y un fuerte componente regulador ^{42, 43}. En términos generales, a nivel de citoquinas la respuesta inmune se caracteriza por un aumento en la expresión de IL-4 e IL-13 ^{44, 45}, presencia de IFN- γ , y altos niveles de IL-10, que se mantienen en el tiempo ^{45, 46}. En cuanto a la respuesta humoral, se observan aumentos en los niveles de IgG1, IgE en ratones (asociados a la respuesta Th2) e IgG4 (asociado a la respuesta reguladora) e IgE en pacientes infectados ⁴⁷⁻⁴⁹.

La infección crónica se caracteriza también por la presencia de macrófagos alternativamente activados (expresión de ChiL3, Relm- α y arginasa-1) que además expresan niveles aumentados de la molécula reguladora PD-L1 (datos de la Dra. Cecilia Casaravilla, no publicados), y de células dendríticas que expresan niveles

aumentados de CD40, PD-L1 y PD-L2 (datos no publicados de la Lic. Yamila Martínez).

Mientras que una respuesta moderada del tipo Th2 se asocia a la presencia de una hidátide viable, diversos estudios sugieren que tanto una respuesta exacerbada del tipo Th2 como del tipo Th1 pueden provocar la muerte del parásito. El aumento en INF- γ , TNF- α e IL-12p40, citoquinas típicas de la respuesta Th1, en pacientes infectados sometidos a quimioterapia, se asocia a la muerte del parásito ^{50, 51}. Esto puede reflejar una relación bi-direccional entre la presencia del parásito vivo y el estado activo de inmunosupresión. La producción de NO por macrófagos activados con INF- γ es capaz de destruir tanto protoescolices como hidátides ^{11, 46}. Por otra parte, como se mencionó anteriormente, es probable que infiltraciones masivas de eosinófilos causen la muerte del parásito ⁶.

Varios estudios indican que las respuestas reguladoras inducidas por *E. granulosus*, modulan tanto la rama Th2, especializada en controlar infecciones por helmintos, como la rama Th1 (y probablemente la Th17), capaz también eliminar al parásito, garantizando así su permanencia en el hospedero intermediario. En modelos infección secundaria con protoescolices, una vez desarrollada la hidátide se observa una disminución en la expresión local de citoquinas tipo Th1: IL-6 y TNF- α , debido probablemente al aumento local en las citoquinas reguladoras IL-10 y TGF- β ^{45, 52}. Además, en un modelo de asma, la infección con protoescolices reduce la infiltración de eosinófilos, la producción de mucus y los niveles de IL-5 en pulmón, parámetros asociados a una respuesta Th2, y aumenta el número de células T reguladoras en bazo y los niveles de IL-4 e IL-10 en suero ⁵⁰. En un modelo de infección secundaria peritoneal y cáncer de mama, la infección potencia la metástasis en el hígado, reduce el número de células Th1 productoras de INF- γ , y aumenta el número de células T interpretadas por los autores como reguladoras en base a la expresión de CD25, en hígado y bazo ⁵³. En cuanto a estudios realizados sobre infecciones naturales, se observa infiltración de células T reguladoras alrededor de hidátides ovinas ⁵⁴.

Los pacientes con equinococosis quística presentan un aumento en el número de células T reguladoras y citoquinas relacionadas (IL-10 y TGF- β) y una disminución moderada en el nivel de células Th17 y citoquinas relacionadas (IL-17 e IL-23) en comparación con individuos no infectados ⁵⁵. Muestras de hígado de pacientes infectados muestran una disminución en la expresión de CD28 a nivel de ARN mensajero ⁵⁶.

A nivel de anticuerpos, el aumento en la producción de IgG4 en pacientes con infecciones crónicas podría contribuir con la evasión del sistema inmune por parte del parásito, ya que este subtipo no causa respuesta citotóxica ni fija complemento, además une receptores Fc activadores con baja afinidad, e inhibidores con alta afinidad ⁵²⁻⁵⁴.

1.2.3. Respuesta inmune a *E. granulosus* en el hospedero definitivo

El estudio de la respuesta inmune a *E. granulosus* en el hospedero definitivo presenta ciertos obstáculos, como las dificultades (prácticas y éticas) de trabajar con perros, y la falta de herramientas para estudios inmunológicos en esta especie.

Los escasos reportes de respuestas inmunes a la echinococcosis quística en perros se centran en el estudio de la respuesta sistémica de anticuerpos, con el objetivo de mejorar los métodos de diagnóstico y el desarrollo de vacunas. Estos estudios demuestran que la infección induce una respuesta inmune, evidenciada en términos de IgA e IgE específicas contra el parásito y sugieren que este aumento podría estar relacionado con la protección de los perros frente a una reinfección. Se propone que los anticuerpos del tipo IgA podrían unirse a la superficie de la glándula rostral e inhibir el desarrollo del parásito al interferir con la adquisición de nutrientes esenciales ^{57, 58}. En cuanto al perfil de respuesta de citoquinas, se observa una polarización hacia un fenotipo Th2, consistente con la detección de IgE, lo que se evidencia en un aumento de la IL-4 e IL-13 tanto a nivel local como sistémico ⁵⁹.

Al igual que en el hospedero intermediario, esta respuesta no parece interferir con la persistencia del parásito en el hospedero, lo que sugiere que *E. granulosus* induciría respuestas reguladoras también en el hospedero definitivo ⁶⁰.

1.2.4. Interacción hospedero-parásito en la infección por *E. granulosus*

Una vez que el sistema inmune innato detecta y decodifica la señal de peligro, induce una respuesta adaptada específicamente al tipo de peligro, a la vez que recluta e instruye a la respuesta adaptativa. La regulación del sistema inmune se da tanto por efectos sobre la inmunidad innata, a partir de la cual terminan teniendo efecto sobre la inmunidad adaptativa, como por acción directa sobre linfocitos ⁶¹. En el caso de la infección por *E. granulosus*, estas señales reguladoras sobre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa deben estar determinadas por moléculas y estructuras supramoleculares del parásito expuestas al hospedero, tanto por estar expresadas en superficie como por ser secretadas hacia el medio externo ⁴¹.

1.2.4.1. Contexto general

La superficie de los platelmintos está formada por una capa celular especializada llamada tegumento, que comprende un sincitio apical y cuerpos celulares basales ⁴¹. La oncosfera es el primer estadio del parásito que se encuentra con el sistema inmune del hospedero intermediario, y el único (a excepción del protoescólex en el contexto de la infección secundaria) en el cual el tegumento se encuentra totalmente expuesto al medio interno del hospedero intermediario ⁶²⁻⁶⁴. Es por esto que es un estadio sensible al ataque por el sistema inmune, y las vacunas destinadas a evitar la infección en el hospedero intermediario utilizan antígenos expresados en este estadio. La proteína *Eg95*, que es el antígeno en que se basa la vacuna que previene la infección en el hospedero intermediario, se expresa únicamente en la oncosfera. *Eg95*, cuya función biológica se desconoce, se expresa

principalmente en estructuras denominadas "glándulas de penetración"⁶⁵. Una vez activadas las oncosferas, los contenidos de las "glándulas de penetración", son secretados, por mecanismos pobremente comprendidos, que parecen involucrar liberación de materiales citoplasmáticos. No se conoce la naturaleza de estas secreciones, si bien se sabe que tienen actividad enzimática que causa lisis del tejido del hospedero. Por otra parte, luego de la activación de la oncosfera, la superficie del parásito pasa de exponer microvellosidades a exponer microtriquias truncadas, por un mecanismo que involucra desprendimiento del tegumento, por lo que es probable que se libere citoplasma del tegumento sincitial hacia el medio del hospedero. Los efectos de estas secreciones sobre el sistema inmune se desconocen⁶²⁻⁶⁴. En la Figura 2 se muestra una oncosfera activada.

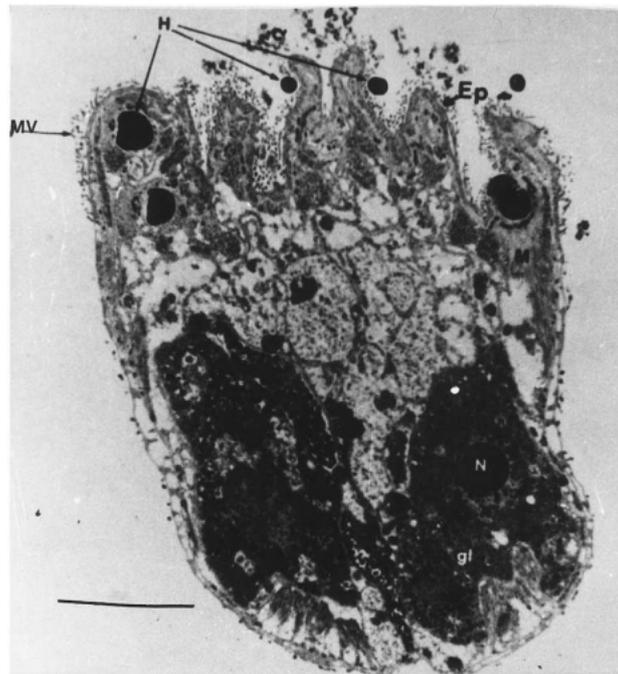


Figura 2. Microscopía de transmisión electrónica de una oncosfera activada. Ep. Epitelio plegado. MV, microvellosidades; H, ganchos; gl, glándulas de penetración. Obtenido de Holcman, 1997⁶³.

Una vez desarrollada la hidátide, la LL es la estructura del parásito que se encuentra directamente expuesta hacia el hospedero. La presencia de la LL protege el metacestodo de las células del hospedero. Así la LL constituye una barrera física que ayuda a evadir al sistema inmune. La LL sin embargo es permeable a macromoléculas hasta del tamaño de IgG inclusive, por lo que el tegumento se encuentra expuesto a ser atacado por factores solubles como el complemento. Así, la protección brindada por la LL es parcial^{66, 67}. Resultados recientes del grupo sugieren que la LL, por permeabilidad y por afinidad selectiva por C1q, protegería al tegumento de la activación de la vía clásica del complemento (resultados no publicados de la M.Sc. Anabella Barrios). Además existe desprendimiento de la LL hacia el medio interno del hospedero, por lo que partículas de la capa laminar pueden entrar en contacto con el sistema inmune del hospedero más allá del sitio de infección⁴¹.

El HF está compuesto por secreciones de protoescolices y de la GL, así como por moléculas del hospedero. Dentro de las últimas, algunas son componentes del sistema inmune como anticuerpos (IgG, IgM) y componentes del complemento⁶⁸⁻⁷⁰. Los anticuerpos del suero de pacientes infectados reconocen antígenos de proteínas expresadas en los protoescolices y en el HF, sugiriendo que estas proteínas son expuestas al hospedero; en otras palabras, es probable que también exista transporte de proteínas del parásito desde el HF hacia el medio interno del hospedero⁷¹⁻⁷⁶. La Figura 3 resume los posibles intercambios de moléculas entre la hidátide y el hospedero.

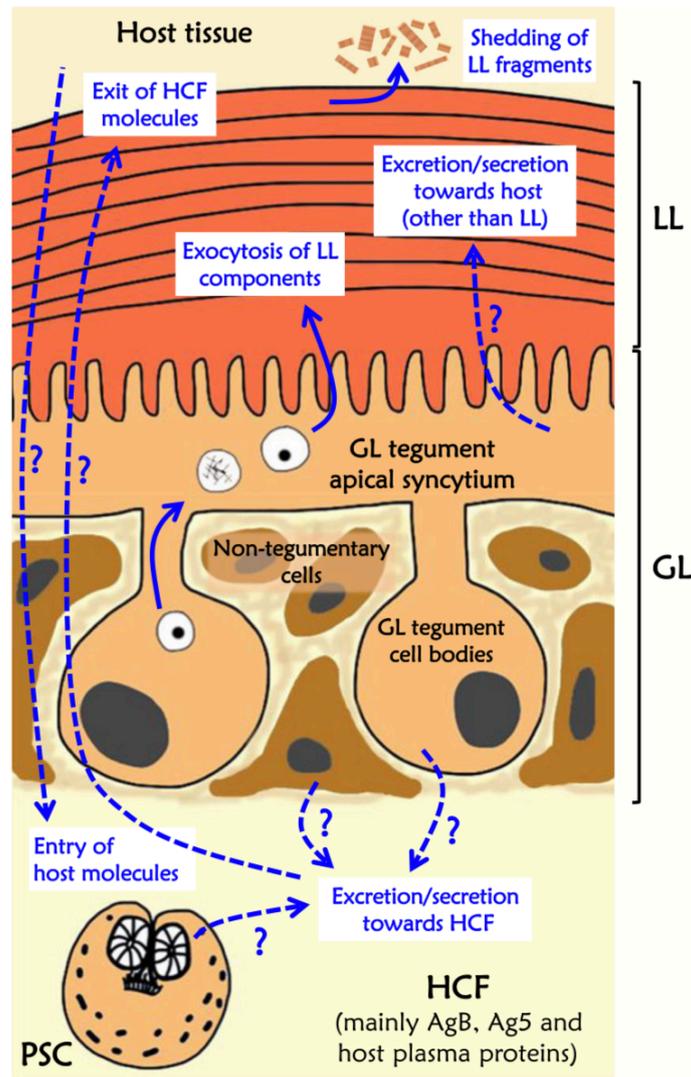


Figura 3. Resumen conceptual de las interacciones entre la hidátide de *E. granulosus* y el hospedero, y las posibilidades de transporte de moléculas solubles en la interfase parásito-hospedero. Las flechas punteadas representan transporte cuyo mecanismo se desconoce. LL, capa laminar; GL, capa germinal; HCF, líquido hidático; PSC, protoescolices; Ag5, antígeno 5; AgB, antígeno B. Obtenido de Díaz, 2016⁴¹.

Además, ante una ruptura de la hidátide y la consiguiente infección secundaria, proteínas presentes en el HF y secretadas por protoescolices podrían establecer contacto directo con el hospedero. Si bien es posible que estas moléculas influyan

sobre el comienzo de la infección secundaria, es importante tener en cuenta que seguramente la superficie de los protoescólices y sus secreciones extracorpóreas estén optimizadas para facilitar la instalación en el hospedero definitivo ⁴¹.

A nivel del gusano adulto existen secreciones por parte de la glándula rostelar, que se encuentra en íntimo contacto con la mucosa intestinal del hospedero definitivo, aunque no se conoce claramente su función ⁷⁷. En la Figura 4 se muestra un gusano adulto insertado en una cripta de Lieberkuhn. Se han encontrado proteínas expresadas en la glándula rostelar, secretadas al medio externo, que producen respuesta de anticuerpos en perros infectados ⁷⁸.

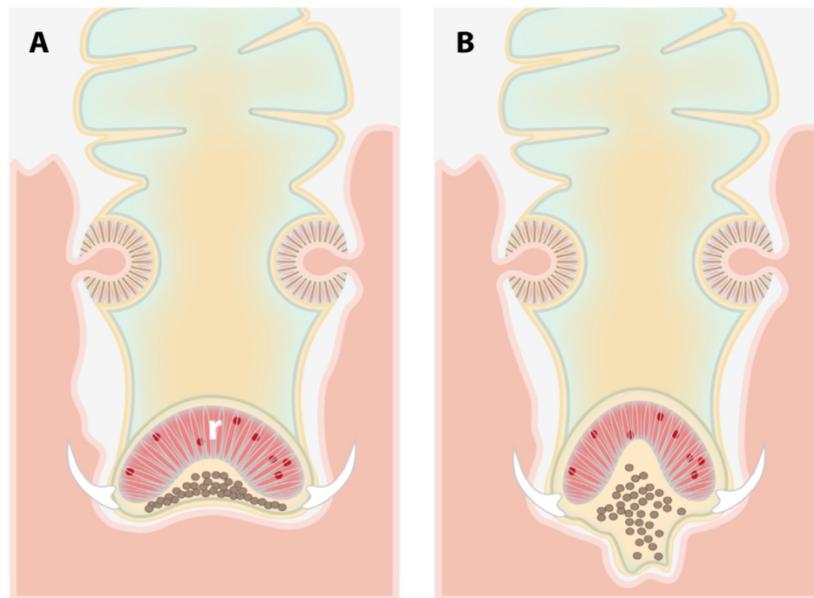


Figura 4. Representación de *E. granulosus* adulto insertado en la base de las vellosidades intestinales. A, B. Se observa la íntima interacción del gusano con el hospedero mediante el uso de ventosas y ganchos. El rostelo (r) está profundamente insertado en una cripta de Lieberkuhn. En la figura B se muestra como la parte apical del rostelo se extiende hacia la cripta acercando el contenido de la glándula rostelar, que está a punto de ser liberado. Obtenido de Thompson y Jenkins, 2014.

1.2.4.2. Moléculas y estructuras supra-moleculares posiblemente asociadas a respuestas inmunes reguladoras.

Echinococcus granulosus utiliza distintos mecanismos para subvertir el sistema inmune del hospedero. Los principales mecanismos propuestos de este tipo se resumen en los párrafos siguientes.

La LL se encarga de la evasión pasiva al funcionar como barrera física. En cuanto a los efectos inmunomoduladores de la LL, la misma se asocia al inhibidor del hospedero factor H, lo que resulta en una muy pobre activación del complemento sobre su superficie ⁷⁹. Además, como ya se mencionó, la LL podría proteger al tegumento de la activación de la vía clásica del complemento. El receptor CLEC4F de las células de Kupffer (macrófagos del hígado), reconoce componentes de la LL ⁸⁰, y se ha sugerido que esta interacción podría estar implicada en la inducción de

tolerancia en este órgano ^{41, 81}. Las células dendríticas responden a partículas de la LL (pLL) adoptando un fenotipo "semi-maduro", que implica un aumento en CD86, pero no en CD40 o en la secreción de citoquinas (IL-12, IL-10, TNF- α e IL-6). Además en células dendríticas co-estimuladas con agonistas TLR, tanto *in vitro* como *in vivo*, pLL potencia la expresión de CD86 e inhibe la de CD40; además, *in vitro* aumenta la secreción de IL-10 e inhibe la de IL-12. La relevancia inmunológica de estos efectos no ha sido determinada ⁸². Asimismo, pLL inhibe la proliferación de macrófagos ⁸³. También se ha observado que extractos crudos de la LL inhiben la producción de NO, capaz de destruir a la hidátide, en macrófagos activados con IFN- γ ¹¹.

Diferentes miembros de la familia de la apolipoproteína conocida como antígeno B (*EgAgB*) se expresan en distintos estadios del ciclo y estructuras del parásito. La inmunogenicidad del *EgAgB* sugiere que este alcanza tejidos del hospedero, por mecanismos desconocidos. Algunos estudios apuntan a una función de transporte de lípidos del huésped hacia el parásito para funciones anabólicas. El *EgAgB* induce predominantemente anticuerpos asociados con la respuesta reguladora, del isotipo IgG4, en humanos. Los efectos del *EgAgB* sobre células dendríticas incluyen inducción de fenotipos capaces de secretar IL-10 y conducir a la diferenciación de células T hacia un perfil secretor de IL-4. También disminuye la quimiotaxis de neutrófilos y monocitos ^{41, 84}. En macrófagos, genera una leve expresión de arginasa-1, y una inhibición en la producción de las citoquinas IL-1 β y TNF- α inducida por ésteres de forbol o LPS ¹².

El antígeno 5 (*EgAg5*), junto con *EgAgB*, es la principal proteína antigénica en la infección por *E. granulosus*. A nivel de ARN mensajero, el *EgAg5* se expresa en todos los estadios del ciclo. El *EgAg5* tiene un péptido señal hacia el retículo endoplasmático y se expresa asociado al sistema vesicular; sin embargo no hay información disponible sobre efectos del *EgAg5* sobre células del sistema inmune ⁴¹.

Ciertas fracciones del HF inducen apoptosis de macrófagos. Otras fracciones, con actividad proteolítica, cortan las moléculas de MHCII de los macrófagos, alterando su capacidad de presentación de antígenos. Sin embargo, no se sabe si las moléculas presentes en estas fracciones están expuestas al hospedero ⁸⁵.

Los exosomas liberados de protoescolices y de hidátides *in vitro* son internalizados por células dendríticas induciendo su maduración, con un aumento en CD86 y una disminución en la expresión de MHCII, sugiriendo que el contenido de los exosomas interfiere con la presentación antigénica ⁸⁶.

Las células dendríticas condicionadas por productos de excreción-secreción de gusanos adultos, co-estimuladas con CpG, presentan una disminución en la expresión de moléculas co-estimuladoras; estas células dendríticas inducen la generación de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ ⁸⁷.

E. granulosus posee una familia de proteínas tipo Kunitz, potencialmente secretadas hacia los hospederos, con posibles funciones inmuno-moduladoras. Algunos miembros de esta familia son el objeto principal de estudio de esta Tesis ⁸⁸. Las proteínas Kunitz de *E. granulosus* presentan actividad de inhibición de

peptidasas de serina y/o bloqueo de canales catiónicos, específicamente canales de potasio y canales de sodio activados por pH ácido (ASIC) ⁸⁹. Es por esto que en las siguientes secciones se van a introducir los inhibidores Kunitz en general, y luego sus blancos, es decir las peptidasas de serina, los canales de potasio y los ASIC. Finalmente, en la sección 1.4.2 se introducirá la información disponible sobre los inhibidores de tipo Kunitz de *E. granulosus*.

1.3. Inhibidores tipo Kunitz

Las proteínas de la familia Kunitz están distribuidas en todos los animales. La proteína Kunitz prototipo es el inhibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI, del inglés *bovine pancreatic trypsin inhibitor*); perteneciente a la familia I2 en la base de datos MEROPS) ⁹⁰.

Las proteínas Kunitz pueden contener uno o más dominios tipo Kunitz, asociados entre sí y/o a dominios de otros tipos. El dominio Kunitz está formado por una cadena peptídica de unos 60 residuos aminoacídicos aproximadamente, estabilizada por puentes disulfuros. La estructura básica del BPTI puede ser generalizada para todos los integrantes de la familia. El BPTI presenta un núcleo hidrofóbico formado por dos hebras beta anti-paralelas, un extremo amino-terminal con una hélice corta y el extremo carboxilo-terminal formando una hélice más larga y regular. La estructura es compacta y está estabilizada por 3 puentes disulfuro, que siguen el patrón C₁-C₆, C₂-C₄ y C₃-C₅. El segmento responsable de la inhibición, llamado bucle anti-peptidasa, está expuesto al solvente, y en él se encuentra el residuo "P1", responsable de la especificidad de la inhibición de proteasas de serina (Figura 5) ^{89, 90}.

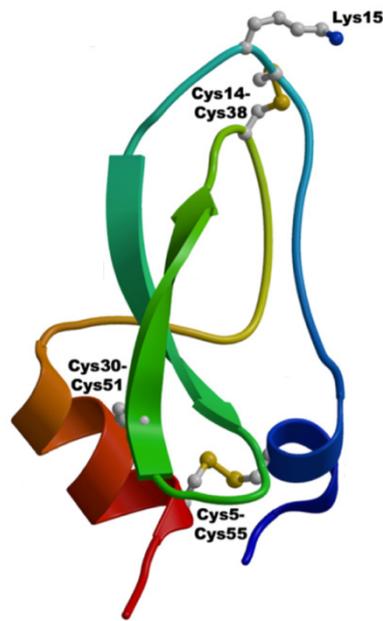


Figura 5. Estructura del BPTI (PDB: 5PTI). Se muestran elementos de la estructura secundaria en azul (amino-terminal), rojo (carboxilo-terminal) y verde (hebras de hoja beta). Se indican los 3 puentes disulfuro y el residuo P1 en el bucle anti-peptidasa (Lys₁₅ en el caso del BPTI). Obtenido de Ranasinghe y McManus, 2013 ⁸⁹.

Como ya se mencionó, si bien las proteínas Kunitz se conocen principalmente por su actividad inhibidora de proteasas de serina, algunas de ellas bloquean canales catiónicos. Además, unos pocos miembros de la familia son capaces de bloquear proteasas de cisteína y de aspártico ⁸⁹.

En los mamíferos, taxón más estudiado, las proteínas Kunitz en general son secretadas, y controlan la activación de proteasas de serina que se producen en forma de zimógenos, así como su actividad una vez activadas. Esto incluye la activación de cascadas proteolíticas como la de la coagulación y del sistema complemento. Se les ha atribuido algunas funciones anti-inflamatorias, por inhibición de la activación de receptores PAR presentes en células inmunes involucrados en la inflamación ^{91, 92}.

Muchos inhibidores Kunitz se han encontrado en secreciones extracorpóreas de animales, como saliva de artrópodos hematófagos, venenos de serpientes, escorpiones, anémonas y arañas, y más recientemente, en secreciones de parásitos helmintos y artrópodos. En estos contextos, los inhibidores Kunitz cumplen importantes funciones en la interacción predador-presa o parásito-hospedero, como la inhibición de la cascada de coagulación, inhibición de proteasas digestivas, modulación de la inflamación y del sistema nervioso del organismo invadido, entre otros ^{89, 93, 94}.

Las proteínas tipos Kunitz presentes en venenos reciben, junto con las otras proteínas presentes, la denominación de toxinas. Las toxinas tipo Kunitz más estudiadas han sido las dendrotoxinas (DTx), de las serpientes del género

Dendroaspis. Las DTx son bloqueantes de canales de potasio activados por voltaje (K_v), y no tienen efectos sobre proteasas ⁹⁵. El veneno de serpientes también presenta Kunitz inhibidores de proteasas, y algunos con doble función de inhibición de K_v y proteasas ⁹⁶.

Se cree que, así como sucedió para los inhibidores Kunitz presentes en el veneno de serpientes, a lo largo de la evolución, la composición de las secreciones de parásitos también fue sometida a un ajuste continuo para cumplir conjuntos de funciones necesarias para la supervivencia de estos organismos. Así, la diversificación de funciones de la familia Kunitz se habría dado por duplicaciones génicas y selección natural actuando sobre estos genes, permitiendo el surgimiento de integrantes con nuevas funciones asociadas a un mismo andamiaje molecular ⁹⁷.

1.3.1. Peptidasas de serina

Las peptidasas catalizan la hidrólisis de uniones peptídicas. Según los residuos aminoácidos (o iones metálicos coordinados) involucrados en la catálisis, se pueden distinguir cuatro tipos de peptidasas: de serina, de aspártico, de cisteína, y metaloproteasas. No obstante su utilidad, esta clasificación es insuficiente para un conjunto tan numeroso y diverso de proteínas. En este contexto, en la década de los 90, Rawlings y Barrett propusieron una clasificación basada en la estructura de las proteínas. Así surgió la base de datos MEROPS, que agrupa las peptidasas en familias de acuerdo a similitud en su secuencia y clanes de acuerdo a su similitud en estructura. Un clan es un grupo de familias que pertenecen a una misma línea evolutiva ⁹⁸⁻¹⁰⁰.

Casi un tercio de todas las peptidasas son peptidasas de serina. La enorme mayoría de estas enzimas se caracterizan por la presencia de tres aminoácidos esenciales para la catálisis, Asp, His y Ser, que forman la "tríada catalítica". Esta tríada se localiza en la "hendidura catalítica", la estructura cóncava donde el sustrato se une a la enzima ¹⁰¹.

La tripsina, quimotripsina y elastasa, secretadas por el páncreas en los mamíferos, integran la familia S1A de la quimotripsina, que se encuentra dentro del clan PA de la quimotripsina ⁹⁸.

La estructura primaria de los miembros del clan de la quimotripsina es de aproximadamente 240 residuos, plegados en dos dominios, con hebras- β -antiparalelas que forman un barril en cada dominio; el arreglo incluye, además, α -hélices. La hendidura catalítica se ubica entre los dos barriles (Figura 6) ⁹⁸.



Figura 6. Modelo estructural de tripsina humana. Las hebras- β -antiparalelas que forman los dos barriles β se muestran en verde, y los dos segmentos de hélice- α en rojo. Se indican los residuos de la tríada catalítica: histidina (violeta), serina (amarillo) y ácido aspártico (rosado). Tomado de <http://merops.sanger.ac.uk/index.htm>.

En el sustrato, se designa como P1-P1' a los residuos que forman la unión peptídica escindible. Los residuos adyacentes se numeran de manera creciente al alejarse del enlace escindible, y se designan como S1, S1', etc. a los correspondientes sitios de unión de la enzima. La especificidad de sustrato en el clan de la quimotripsina está determinada esencialmente por la interacción P1-S1, que usualmente establecen los residuos en las posiciones 189, 216 y 226. Los sustratos que poseen Lys y Arg en P1 suelen ser hidrolizados por la tripsina; aquellos que contienen Tyr, Phe, Trp, Leu y Met, por la quimotripsina; y aquellos que tienen Ala y Ser, por la elastasa (Figura 7) ⁹⁸.

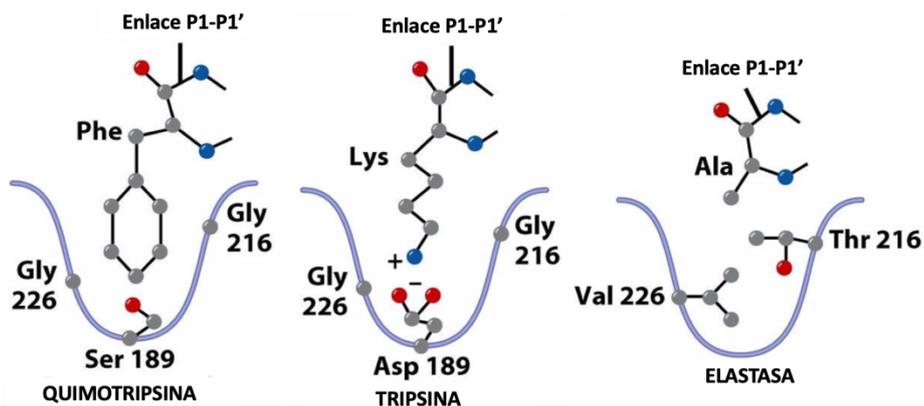


Figura 7. Características estructurales del bolsillo de especificidad en las hendiduras catalíticas de quimotripsina, tripsina y elastasa. Obtenido de Voet "Fundamentals of Biochemistry", 2006.

1.3.1.1. Proteasas en el sistema inmune

Los procesos inflamatorios promueven la secreción de peptidasas por distintas células del sistema inmune, y por células epiteliales, endoteliales y hepatocitos. A continuación se listan distintas proteasas y cascadas proteolíticas importantes en la función del sistema inmune ¹⁰¹.

El sistema complemento es un grupo de proteínas que interactúan para reconocer, opsonizar y destruir patógenos invasores o células del organismo dañadas, a la vez que generan una señal inflamatoria. Actúa mediante el reconocimiento del patógeno a lo que le sigue una cascada de activación de proteasas de serina que se encuentran en forma de pro-enzimas y se activan por clivaje ¹⁰².

Por otra parte, ciertas proteasas entre las que se encuentran las de la cascada de la coagulación, tienen efectos sobre receptores específicos modulando la respuesta inflamatoria. El principal mecanismo por el que las proteasas afectan la respuesta inflamatoria es mediante el clivaje y activación de los receptores PAR. Estos son receptores acoplados a proteína G, que se activan por clivaje del dominio extracelular por acción de proteasas, principalmente de serina. Su activación conduce a la producción de una variedad de citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas y factores de crecimiento. Los receptores PAR se expresan en plaquetas, células endoteliales, neuronas y células inmunes y pueden ser clivados por tripsina, trombina, factor Xa, metaloproteinasa-1, entre otras ^{101, 103-106}. Además, como se mencionó al comienzo de la Introducción, la activación de estos receptores ha sido asociada a la inducción de respuestas tipo Th2 ¹⁸⁻²¹.

Ciertas proteasas presentes en el sistema vesicular en células del sistema inmune participan en la inflamación, remodelación del tejido, eliminación de patógenos y apoptosis. Entre ellas se destacan las granzimas en linfocitos y células *natural killer* (NK), proteasas de neutrófilos, y triptasa y quimasa en mastocitos ¹⁰⁷; estas proteasas se introducen brevemente en los párrafos siguientes.

Las granzimas son liberadas por células NK y linfocitos T citotóxicos ante la presencia de células infectadas con virus y mediante el clivaje de caspasas intracelulares activan vías de señalización pro-apoptóticas. Además se les ha atribuido funciones de remodelado de la matriz extracelular y estimulación de la producción de citoquinas pro-inflamatorias en células mieloides ¹⁰⁷.

Los neutrófilos son una de las primeras células en llegar al sitio de infección. Sus gránulos contienen 3 tipos de proteasas de serina: elastasa de neutrófilo, catepsina G, y proteinasa 3. Las proteasas median la destrucción proteolítica de microorganismos, tanto dentro de los fagolisosomas como fuera de las células. Los macrófagos producen quimioquinas en respuesta a la elastasa de neutrófilos, como IL-8. La proteinasa 3 modula la proliferación y diferenciación de células mieloides, y la catepsina G participa en el procesamiento antigénico para su presentación en moléculas de MHC de clase II, en la superficie de células presentadoras de antígeno ¹⁰⁷.

La triptasa y la quimasa son liberadas por degranulación de mastocitos, junto con histamina y citoquinas. Participan en la degradación de la matriz extracelular, vasoconstricción, coagulación e inflamación, facilitando la eliminación de patógenos, principalmente parásitos. En cuanto a sus efectos pro-inflamatorios, la quimasa cliva y activa moléculas pro-inflamatorias incluyendo la IL-1 β , IL-18 y CXCL7. La triptasa activa PAR2 ¹⁰⁷.

1.3.1.2. Inhibición de proteasas de serina por inhibidores tipo Kunitz

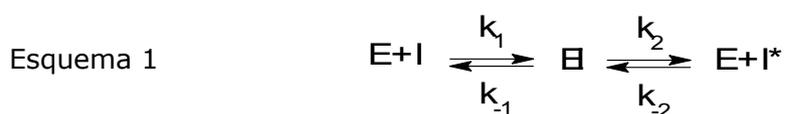
Las enzimas proteolíticas son esenciales para la supervivencia de organismos de todos los tipos. Sin embargo, la ruptura de proteínas puede llegar a ser dañina para los organismos, por lo que la actividad de las proteasas debe ser mantenida bajo un control estricto. Un mecanismo de control es mediante inhibidores. La mayoría de los inhibidores naturales de proteasas son de naturaleza proteica, y entre estos se destacan los inhibidores Kunitz, previamente introducidos ¹⁰⁸.

1.3.1.2.1. Mecanismo y cinética de la inhibición por inhibidores Kunitz

En base a su mecanismo de acción, pueden distinguirse tres tipos de inhibidores de peptidasas: canónicos, no-canónicos y serpinas ¹⁰⁸.

Los inhibidores no canónicos interactúan con sus enzimas blanco a través de su extremo amino-terminal y establecen interacciones secundarias importantes fuera del sitio activo que afectan significativamente la fuerza, velocidad y especificidad de las interacciones entre la enzima y el sustrato. Las serpinas interactúan con su enzima blanco de una manera similar al sustrato; forman un complejo covalente que provoca grandes cambios conformacionales en la enzima, lo que determina que la inhibición sea irreversible. Los inhibidores canónicos interactúan con la enzima mediante un mecanismo que se denomina "estándar". Los inhibidores canónicos, entre los que se encuentran los Kunitz, se unen a la enzima de manera análoga al sustrato, pero, contrariamente al caso de las serpinas, la inhibición es reversible ¹⁰⁸. El segmento del inhibidor responsable de la inhibición se denomina bucle anti-peptidasa y se compone de los residuos P3-P2-P1-P1'-P2'-P3'. En los inhibidores canónicos, este bucle se encuentra expuesto en la superficie (ver Figura 5) ¹⁰⁹.

La inhibición implica una reacción de hidrólisis/resíntesis:

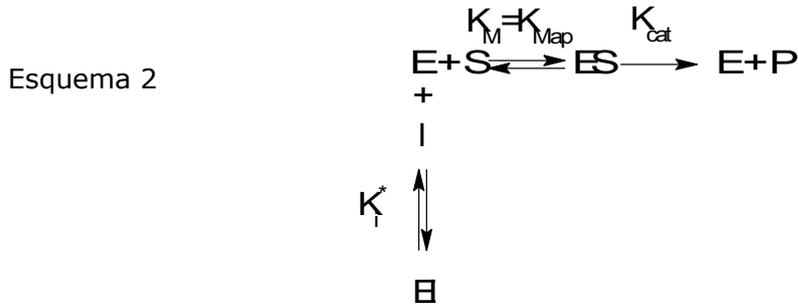


Donde E es la proteasa, I el inhibidor, I* el inhibidor clivado, EI el complejo estable, k_1 y k_{-2} son las constantes de segundo orden de asociación y k_{-1} y k_2 son las constantes de primer orden de disociación del complejo ¹⁰⁹.

Aunque el enlace P1-P1' generalmente es hidrolizado por la enzima, esta hidrólisis ocurre muy lentamente en comparación con la hidrólisis de un sustrato, es decir que k_2 es muy pequeña. Además, el inhibidor escindido puede formar el mismo complejo con la enzima que el inhibidor intacto, y durante la formación de este

complejo ocurre la reacción de re-síntesis. Por todo lo anterior, el sistema se comporta básicamente como un equilibrio simple entre la enzima y el inhibidor libre ¹⁰⁹.

Los inhibidores Kunitz, además de ser irreversibles, son competitivos, ya que la unión a la enzima del inhibidor y del sustrato son mutuamente excluyentes (Esquema 2) ¹¹⁰.



La potencia o efectividad de un inhibidor reversible se mide por su capacidad de unirse a su enzima blanco, la que está definida por una constante de equilibrio global, K_i^* . Esta constante, que es una medida de la afinidad global de la interacción enzima-inhibidor, es igual a la constante de disociación enzima-inhibidor, K_i , en los casos en que la formación del complejo ocurre en un solo paso ¹¹⁰.

La manera más común de determinar la K_i^* consiste en cuantificar el efecto que tiene el inhibidor sobre la actividad catalítica de la enzima, es decir, en presencia de sustrato. Para los inhibidores competitivos que no son de alta afinidad, la concentración necesaria para producir una inhibición significativa es mucho mayor que la de enzima. Por lo tanto, en el contexto experimental, se trabaja con concentraciones de inhibidor en exceso, lo que resulta en una concentración de inhibidor unido a la enzima que es despreciable con respecto a la de inhibidor total. En otras palabras, la concentración de inhibidor libre ($[I_L]$) es igual a la de inhibidor total ($[I_T]$). Esta consideración, que es análoga a la realizada acerca de la concentración de sustrato en la cinética enzimática clásica (ver anexo de cinética enzimática clásica), se tiene en cuenta en los cálculos para la determinación de K_i^* ¹¹⁰.

En presencia del inhibidor, el valor aparente de la K_M resulta aumentado, es decir, la afinidad de la enzima por el sustrato aparece como menor. Se trabaja entonces con la K_M aparente (K_{Map}), que es mayor a la K_M en un factor de $(1+[I]/K_i^*)$ ¹¹⁰, es decir,

Ecuación 1

$$K_{Map} = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i^*} \right)$$

Así como el valor aparente de la K_M resulta aumentado en presencia de inhibidor, el valor de K_i^* se ve aumentado en presencia de sustrato, y se trabaja con K_{iap}^* , que

es la constante global de inhibición aparente, que es mayor al K_i^* en un factor de $(1+[S]/K_M)^{111, 112}$, es decir,

$$\text{Ecuación 2} \quad K_{iap}^* = K_i^* \left(1 + \frac{[S]}{K_M} \right)$$

La velocidad máxima de la reacción no se ve afectada por la presencia del inhibidor, ya que el equilibrio enzima-inhibidor es desplazado a concentraciones altas de sustrato, si bien en presencia del inhibidor se necesitan concentraciones más altas de sustrato para alcanzar esa velocidad ¹¹⁰.

La ecuación de Michaelis-Menten entonces se modifica de la siguiente manera:

$$\text{Ecuación 3} \quad v_i = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{[S] + K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i^*} \right)}$$

Para determinar la K_i^* de una interacción enzima-inhibidor se utiliza una concentración fija de enzima y de sustrato (éste en exceso), y distintas concentraciones de inhibidor, también en exceso. Se determina $V_{m\acute{a}x}$ y distintas K_{Map} según la ecuación 3. Luego se grafican K_{Map} en función de $[I]$ según la ecuación 1, y se obtiene K_i^* . Esto es análogo al tratamiento realizado para determinar $V_{m\acute{a}x}$ y K_M de un sustrato para una determinada enzima, como se explica en el anexo de cinética enzimática clásica ¹¹⁰.

En el caso de los inhibidores de alta afinidad, los efectos de la inhibición se observan a concentraciones de enzima e inhibidor del mismo orden. En este caso no es posible suponer que $[I_L]=[I_T]$, y no son válidas las suposiciones del tratamiento clásico para el cálculo de K_i^* . Por lo tanto, se utiliza en cambio la ecuación de Morrison para inhibidores de alta afinidad (Ecuación 4), la cual se basa en las mismas ecuaciones que la cinética enzimática clásica, pero al no poder suponer $[I_L]=[I_T]$, las derivaciones son más complejas ^{111, 112}.

$$\text{Ecuación 4} \quad v_i = \frac{v_o}{2[E]} \left\{ ([E] - [I] - K_{iap}^*) + \sqrt{([I] + K_{iap}^* - [E])^2 + 4K_{iap}^*[E]} \right\}$$

donde K_{iap}^* es la constante global de inhibición aparente, v_i es la velocidad inicial de la reacción de hidrólisis una vez alcanzado el equilibrio entre la enzima y el inhibidor, v_o es la velocidad inicial en ausencia de inhibidor, $[I]$ es la concentración total del inhibidor y $[E]$ es la concentración total de enzima activa ^{111, 112}.

Para determinar la K_i^* de una interacción enzima-inhibidor de alta afinidad, se utiliza una concentración fija de enzima y de sustrato (éste en exceso), y distintas concentraciones de inhibidor, también en exceso. Se determina la K_{iap}^* según la Ecuación 4. Luego se determina la K_i^* según la Ecuación 2 ^{111, 112}.

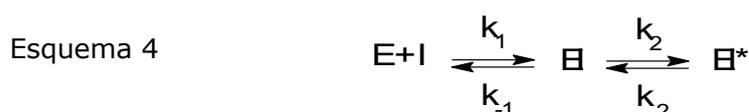
Una característica que presentan frecuentemente los inhibidores de alta afinidad es que además de ser de alta afinidad, son inhibidores lentos. Es decir, a una concentración fija de inhibidor, la inhibición aumenta en el tiempo, en una escala de minutos u horas, hasta que se alcanza un equilibrio entre el inhibidor, la enzima libre y el complejo EI. Para la determinación de K_i^* de inhibidores lentos, se incuba la enzima con el inhibidor el tiempo suficiente para asegurar que la unión haya llegado a un equilibrio, antes del agregado de sustrato ^{111, 112}.

Si en cambio se quieren determinar constantes cinéticas de la asociación enzima-inhibidor, debe seguirse el curso temporal de la reacción (formación de producto vs tiempo), antes de que la reacción de asociación-disociación llegue a un equilibrio. En ausencia de inhibidor se observa un comportamiento lineal, pero en presencia de inhibidor la velocidad de formación de producto disminuye progresivamente con el tiempo con una constante exponencial k_{obs} , que es una constante de velocidad aparente de primer orden, hasta alcanzar una fase lineal cuando se establece el equilibrio ¹¹⁰.

Una inhibición lenta puede darse por un equilibrio reversible simple entre la enzima y el inhibidor, gobernado por las tasas de asociación y disociación dadas por las constantes k_1 y k_{-1} respectivas (Esquema 3). Este es el comportamiento esperado para cualquier inhibidor reversible competitivo, exceptuando que, en el caso de una inhibición lenta, los valores de k_1 y k_{-1} son pequeños ¹¹⁰.



Un segundo mecanismo involucra que el inhibidor se encuentre con la enzima en una conformación inicial que lleva a la formación de un complejo binario de baja afinidad. Generalmente se supone que este complejo inicial se forma en condiciones de equilibrio rápido y, por lo tanto, la afinidad del complejo inicial EI está definida por la relación de las constantes k_1 y k_{-1} (k_{-1}/k_1), que es igual al K_i de formación del complejo. Luego se genera el complejo EI^* , a través de un paso de isomerización (k_2), mucho más lento que el primer paso de asociación reversible que lleva a la formación del complejo de encuentro EI (Esquema 4). Esta isomerización da como resultado una unión de mucho mayor afinidad entre el inhibidor y la nueva conformación de la enzima. El paso para revertir la isomerización, es decir para pasar de EI^* a EI, está gobernado por la constante de pseudo primer orden k_{-2} y la formación del complejo final EI^* por la constante de formación k_2 ¹¹⁰.



Como se describe en Materiales y Métodos, se puede discernir qué mecanismo de inhibición presenta un inhibidor lento a partir de la gráfica de las constantes aparentes de velocidad k_{obs} vs $[I]$. Ésta muestra un comportamiento lineal si se

trata de un inhibidor como el del mecanismo 3, y un comportamiento hiperbólico si el inhibidor sigue el mecanismo 4. En Materiales y Métodos, se explica cómo analizar estos datos para poder determinar el valor de K_i y las constantes involucradas ¹¹⁰.

1.3.2. Canales de potasio

Los canales de potasio están presentes en todos los seres vivos, y en todos los tipos celulares. En general, permiten el pasaje de K^+ desde el interior celular hacia el exterior, a favor del gradiente electroquímico. Cumplen papeles diferentes en distintas células. Son altamente selectivos y conducen el K^+ a una velocidad cercana a la de difusión. Los canales de potasio pueden presentar tres estados: abierto, cerrado e inactivo. Estos canales acoplan cambios en el ambiente con movimientos estructurales de dominios que controlan la apertura del canal y el flujo de los iones ^{113, 114}.

1.3.2.1. Canales de potasio activados por voltaje

Los K_v detectan cambios en el potencial transmembrana (V_m) y lo acoplan a la apertura o cierre del canal. Su función más conocida es la de repolarización de la membrana luego de la despolarización por entrada de sodio, y en algunos casos calcio, durante el potencial de acción. Sin embargo también regulan la señalización por calcio, el volumen celular, y participan en fenómenos como la proliferación y la migración celular ¹¹⁵. Se dividen en doce subfamilias (K_v1 a K_v12). Los K_v son tetraméricos; si se coexpresan subunidades de una misma subfamilia, éstas pueden coensamblarse y formar un canal funcional heterotetramérico ¹¹⁴.

En los K_v , cambios en el potencial de membrana pueden hacer que el canal pase rápidamente del estado cerrado al abierto (disparo). Por otro lado, si este estímulo persiste, el canal puede pasar al estado de inactivación, no pudiendo luego volver al estado abierto ¹¹³.

Cada subunidad de K_v contiene 6 hélices transmembrana. Cuatro de estas hélices (H1-H4) forman un dominio sensor de voltaje, mientras que las dos restantes (H5 y H6) forman el poro del canal. La hélice H4 presenta una región rica en aminoácidos básicos (lisinas o argininas). Cambios en el V_m provocan movimiento de esta hélice en la membrana. Puesto que H4 interactúa con las otras hélices y con lípidos de membrana, los movimientos en H4 causan cambios conformacionales en las hélices TM1 y TM2, que dan como resultado la apertura o cierre del canal (Figura 8) ^{113, 114}.

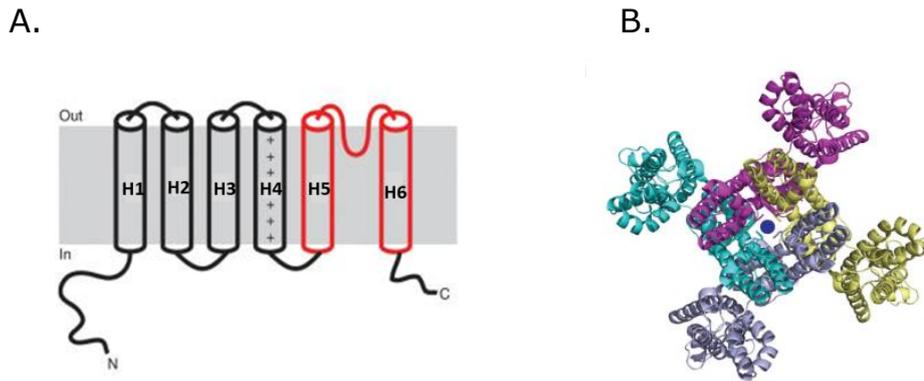


Figura 8. Estructura de un canal de potasio activado por voltaje. A. Topología de la membrana. Se muestran las 6 hélices transmembrana. Los extremos N- y C- terminales son citosólicos. Las hélices H1-H4 conforman los sensores de voltaje, mientras que las H5-H6 dan lugar al canal del poro. La hélice H4 es densa en residuos básicos, críticos para el mecanismo de sensado de voltaje. B. Tetrámero visto desde arriba. Cada subunidad se representa con un color. Los dominios sensores de voltaje se localizan por fuera del poro del canal. En azul se muestra un átomo de K^+ . Obtenida de Kim y Nimigean, 2016 ¹¹⁴.

1.3.2.2. Canales de potasio en el sistema inmune

La activación de una gama de receptores de células inmunes causa cascadas de fosforilaciones que están acopladas al influjo de calcio. Estos cambios regulan la función de muchas enzimas y factores de transcripción, que finalmente dan lugar a la activación de la célula ¹¹⁶⁻¹¹⁸.

La señalización que conlleva al aumento en el calcio intracelular fue ampliamente caracterizada en la estimulación del receptor de linfocitos T (TCR, del inglés *T cell receptor*). Sin embargo, la estimulación del receptor de linfocitos B (BCR, del inglés *B cell receptor*), de receptores Fc, receptores de quimioquinas acoplados a proteínas G, y TLRs disparan cascadas de señalización muy similares. La estimulación de los receptores mencionados da lugar a la activación de la fosfolipasa C (isoformas PLC- γ o PLC- β), que produce inositol 1,4,5,-trifosfato (IP3) y diacilglicerol a partir de fosfatidil-inositol 4,5,-bisfosfato. El IP3 se une a su receptor IP3R, acoplado a canales, lo que causa la liberación de Ca^{2+} de los almacenes del retículo endoplasmático (RE). A su vez, el vaciamiento de los almacenes de Ca^{2+} del RE activa los canales CRAC (del inglés *calcium release activated channels*) en la membrana plasmática, lo que permite la entrada de calcio al citosol desde el exterior celular ¹¹⁶⁻¹¹⁸.

El Ca^{2+} regula la activación de las células inmunes a través de factores de transcripción sensibles al Ca^{2+} como NFAT ¹¹⁸.

El aumento de Ca^{2+} citosólico causa la despolarización de la membrana plasmática. El cambio en el V_m activa los K_v , mientras que el Ca^{2+} intracelular activa canales de potasio activados por calcio (K_{Ca}). Ambos tipos de canales permiten el eflujo de K^+ , contrarrestando la despolarización causada por la entrada de Ca^{2+} y sosteniendo el gradiente electroquímico que favorece la entrada de Ca^{2+} a la célula. Los canales de K^+ más estudiados en el sistema inmune son $K_v1.3$ y $K_{Ca}3.1$ (Figura 9) ^{116, 117, 119}.

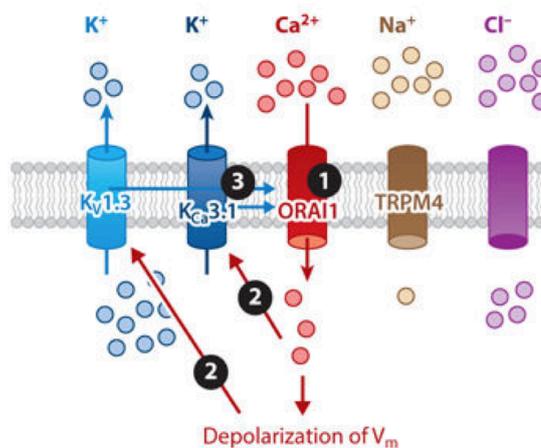


Figura 9. Regulación del potencial de membrana durante la activación de receptores en células inmunes. 1. La activación de ORAI1 (canal tipo CRAC expresado en humanos), da lugar a un influjo de Ca^{2+} y la consiguiente despolarización de la membrana plasmática. 2. En consecuencia se abren los canales $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ y $\text{K}_{\text{v}1.3}$. 3. La activación de $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ y $\text{K}_{\text{v}1.3}$ media el eflujo de K^{+} y la hiperpolarización de la membrana, sosteniendo la entrada de Ca^{2+} . Obtenida de Feske, 2015 ¹¹⁹.

El patrón de expresión y la función de $\text{K}_{\text{v}1.3}$ y $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ en el sistema inmune varía entre especies, tipos celulares y estado de diferenciación y activación de la célula, lo que hace difícil tener una idea clara del rol que cumplen.

Sistema inmune adaptativo

Linfocitos T

Las funciones de los canales de K^{+} han sido ampliamente estudiadas en linfocitos T. Las células T vírgenes humanas expresan principalmente $\text{K}_{\text{v}1.3}$, mientras que una vez activadas aumentan la expresión de $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$. El bloqueo de estos canales inhibe la señalización por Ca^{2+} , y consecuentemente la proliferación y la producción de IL-2. En linfocitos T de ratones, $\text{K}_{\text{v}1.3}$ y $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ parecen expresarse principalmente luego de la activación de las células. Los linfocitos CD4^{+} Th1 y Th2 de ratón dependen de $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ para la producción de citoquinas luego de estimulación por TCR, mientras que los Th17 dependen de $\text{K}_{\text{v}1.3}$ para la activación y producción de IL-17 ¹¹⁹.

Las funciones de los canales de K^{+} en células T de memoria han sido más estudiadas en humanos, donde se ha visto que los $\text{K}_{\text{v}1.3}$ son esenciales para la producción citoquinas, migración y proliferación en células T de memoria efectora. En cambio, las células T de memoria central dependen de $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ para sus funciones ¹¹⁹.

Linfocitos B

En células B, en general, el bloqueo de los canales de K^{+} causa inhibición en la proliferación de distintas poblaciones ¹¹⁹.

Sistema inmune innato

Como ya se introdujo, en el sistema inmune innato la señalización por Ca^{2+} participa en muchos procesos importantes para la activación y función de las células, y así como en los linfocitos, el eflujo de K^+ es esencial para que exista esta señalización ¹¹⁹. Sin embargo el panorama es aún menos claro que para los linfocitos T.

Células dendríticas

Las células dendríticas humanas y de ratón expresan $\text{K}_v1.3$, $\text{K}_v1.5$ y $\text{K}_{Ca}3.1$. $\text{K}_v1.5$ es un canal que no se expresa en linfocitos, pero sí en células dendríticas y macrófagos. El bloqueo de $\text{K}_v1.3$ y $\text{K}_v1.5$, tanto en células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón (BMDC), como en células dendríticas humanas, da lugar a inhibición en la expresión de moléculas co-estimuladoras y citoquinas pro-inflamatorias, reducción en la capacidad de presentación antigénica, y disminución de la capacidad migratoria ^{120, 121}. En cuanto a $\text{K}_{Ca}3.1$, los estudios se restringen a células dendríticas humanas, en las que se ha visto participación de este canal principalmente en migración ^{122, 123}.

Macrófagos

Una gran proporción de los estudios sobre canales de potasio en macrófagos se han realizado utilizando macrófagos derivados de médula ósea de ratón (BMDM) o la línea de ratón Raw 264.7. Las corrientes de potasio en estos modelos de macrófagos están reguladas por tres canales: $\text{K}_v1.3$, $\text{K}_v1.5$ y $\text{K}_{ir}2.1$ ¹²⁴. En macrófagos, $\text{K}_v1.5$ se asocia con $\text{K}_v1.3$ para generar canales heterotetraméricos $\text{K}_v1.3/\text{K}_v1.5$, que son sensibles a los bloqueantes de $\text{K}_v1.3$. Los macrófagos Raw 264.7 y BMDM activados con LPS aumentan la expresión de $\text{K}_v1.3$, pero no la de $\text{K}_v1.5$; como resultado aumenta la proporción de subunidades $\text{K}_v1.3$ en los canales híbridos $\text{K}_v1.3/\text{K}_v1.5$, alterando propiedades electrofisiológicas de los canales ^{124, 125}. $\text{K}_{ir}2.1$, un miembro de la subfamilia K_{ir} (canales de potasio de rectificación interna), es otro canal importante para la función de algunos tipos de macrófagos. A diferencia de los K_v , los K_{ir} permiten el pasaje de K^+ más fácilmente hacia el interior de la célula que hacia el exterior. Por lo tanto, en condiciones de potenciales de membrana más negativos que el potencial de reposo (hiperpolarización), la activación de estos canales genera una gran corriente de K^+ hacia dentro de la célula, mientras en condiciones de potenciales más positivos que el V_m (despolarización), estos canales permiten un pequeño pasaje de K^+ hacia fuera de la célula. La actividad de K_{ir} de es modulada por iones, como Mg^{2+} y Ba^{2+} , fosfolípidos y ligandos proteicos ¹²⁶.

En general, el bloqueo de los canales de K^+ causa inhibición tanto en la respuesta proliferativa como en la respuesta inflamatoria de los macrófagos. La estimulación de BMDM con M-CSF aumenta 3 veces la expresión de $\text{K}_v1.3$ y $\text{K}_{ir}2.1$ e induce corrientes de K^+ hacia dentro y hacia fuera de la célula. La margatoxina (MgTx) (bloqueante de $\text{K}_v1.3$), inhibe completamente el eflujo de K^+ , y parcialmente la proliferación inducida por M-CSF. Esta inhibición es mayor en presencia además de Ba^{2+} , que inhibe el influjo de K^+ , sugiriendo que ambos canales contribuyen a la proliferación. La estimulación de BMDM con LPS induce expresión de $\text{K}_v1.3$ e inhibe

la de $K_{ir}2.1$, aumentando las corrientes de eflujo de K^+ . El TNF- α imita parcialmente los efectos del LPS. La MgTx también inhibe la expresión de iNOS inducida por LPS o TNF α ¹²⁴.

El bloqueo de $K_v1.3$ en macrófagos RAW 264.7 en reposo inhibe la migración ¹²⁷ y aumenta la capacidad fagocítica ¹²⁸. En RAW 264.7 activados, inhibe la producción de IL-1 β , y al contrario que en BMDM, aumenta la producción de NO ¹²⁸.

El K^+ participa además en la activación del inflammasoma NLRP3 en macrófagos. El inflammasoma NLRP3 es un complejo multi-proteico intracelular que integra señales de PAMPs y DAMPs, y activa proteasas específicas llamadas caspasas conduciendo a la producción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β e IL-18 ¹²⁹. Los receptores purinérgicos reconocen como ligandos al ATP y sus metabolitos, lo que resulta en un aumento en el Ca^{2+} intracelular, paso esencial para la activación del inflammasoma NLRP3. El eflujo de potasio es otro fenómeno esencial para que ocurra la activación del inflammasoma NLRP3. Recientemente se identificó el canal de K^+ de doble poro (K_{2p}), TWIK2, como el responsable del elujo de K^+ durante la activación del inflammasoma NLRP3 por ATP en BMDM ¹³⁰. En cambio, en BMDC y en macrófagos humanos de la línea THP-1, la activación del inflammasoma NLRP3 por ATP, depende del canal $K_{Ca}1.1$ y posiblemente el $K_{Ca}3.1$ ¹³¹. Esto refleja una vez más las diferencias en expresión y función de canales en distintos tipos celulares.

En la Figura 10 se resumen los canales iónicos más importantes en macrófagos y sus interacciones.

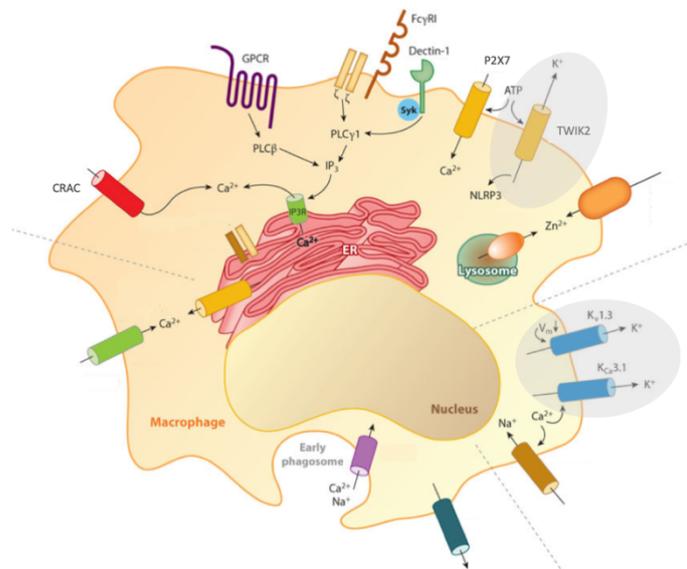


Figura 10. Principales canales iónicos en macrófagos. Los macrófagos expresan una variedad de receptores que activan canales iónicos. Entre ellos se encuentran receptores Fc, receptores de quimioquinas acoplados a proteína G (GPCR), Dectina 1/2, y TLRs. La activación de estos receptores resulta en la activación de la PLC y la apertura de canales de Ca^{2+} en el RE, y la consecuente apertura de canales CRAC en la membrana. El V_m requerido para este proceso es establecido por los canales $K_v1.3$ y $K_{Ca}3.1$. Los canales de Na^+ también participan en este proceso. TWIK2 y P2X7 participan en la activación del inflammasoma NLRP3 inducida por ATP. Figura tomada y modificada de Feske, 2015 ¹¹⁹.

Recientemente, los canales de potasio han adquirido importancia en patologías asociadas a estados de inflamación y estrés oxidativo, principalmente por su función en macrófagos y linfocitos T.

K_{Ca}3.1 y K_v1.3 están altamente expresados en macrófagos de pacientes con aterosclerosis, así como en el modelo de aterosclerosis de ratones ApoE^{-/-}. El bloqueo de estos canales promueve un fenotipo de macrófagos anti-inflamatorio, reduce la migración de los macrófagos a la placa y el estrés oxidativo, contribuyendo a la estabilización de la placa ^{127, 132, 133}.

Se ha observado aumento en la expresión de K_v1.3, K_{Ca}3.1 y K_{ir}2.1 en microglía activada en modelos de isquemia cerebral, Alzheimer, y otras patologías asociadas a neuro-inflamación. El bloqueo de estos canales mejora la inflamación y el estrés oxidativo, y consecuentemente la patología en estas enfermedades ¹³⁴⁻¹³⁷.

En enfermedades autoinmunes como esclerosis múltiple, artritis reumatoidea y diabetes tipo-1, la estimulación repetida de linfocitos T con auto-antígenos resulta en su diferenciación hacia células T de memoria efectora, que, como se mencionó anteriormente, expresan principalmente K_v1.3 y dependen de este canal para su función. Las células T vírgenes o de memoria central, en cambio, expresan K_{Ca}3.1, lo que permite que el bloqueo de K_v1.3 no comprometa la respuesta inmune protectora provista por estas células ¹³⁸. El bloqueo de K_v1.3 reduce la severidad de distintas enfermedades autoinmunes ¹³⁹.

1.3.3. Canales de sodio activados por pH ácido (ASIC)

Los ASIC (del inglés *acid-sensing ion channels*) son canales catiónicos abiertos por ligando, el protón, que en un principio se encontraron ampliamente expresados en el sistema nervioso central y periférico, y más tarde también en células no neuronales. Son miembros de la familia de canales de sodio degenerina/ENaC, específicos de vertebrados. Son permeables al Na⁺, 10 veces más que al K⁺, y algunos son levemente permeables al Ca²⁺. En células de mamífero, pueden ensamblarse de forma homomérica y heteromérica; tres subunidades forman un canal funcional ¹⁴⁰⁻¹⁴².

Los ASIC participan en la detección de protones liberados en las sinapsis. La activación de estos canales en células excitables provoca una despolarización que puede ocasionar un potencial de acción ¹⁴².

1.3.3.1. ASIC en el sistema inmune

Los ASIC también se activan por acidosis producida en contextos fisiopatológicos como inflamación, isquemia y en microambientes tumorales, y algunos estudios apuntan a un papel de los ASIC en la respuesta inflamatoria ¹⁴³⁻¹⁴⁵.

En ratón, se ha encontrado expresión de ASIC en células dendríticas (BMDC) y macrófagos (BMDM, RAW 264.7) y estudios relacionan los ASIC con la activación de estas células por acidosis extracelular ¹⁴⁶⁻¹⁴⁸.

Los inhibidores más potentes y selectivos de ASIC y principalmente de $K_v1.3$ hasta el momento son toxinas peptídicas provenientes de venenos animales, que bloquean estos canales en rangos de pico a nano molar, entre las que se destacan los integrantes de la familia Kunitz ^{139, 149}.

1.3.4. Bloqueo de canales de potasio y de ASIC por inhibidores tipo Kunitz

Tanto los K_v como los ASIC son blancos de inhibidores Kunitz presentes en toxinas animales. De estos dos tipos de blanco, existe mucha más información sobre el bloqueo de K_v . Ciertos residuos básicos e hidrofóbicos presentes en los inhibidores son claves para la actividad de bloqueo de canales de potasio. Estos residuos bloquean directamente el pasaje de K^+ estableciendo interacciones con residuos ácidos presentes en, o próximos, a la cara extracelular del canal. En particular, interaccionan con residuos presentes en las asas que unen las hélices transmembrana H5 y H6, y con residuos que forman el filtro de selectividad dentro del poro del canal (ver Figura 8) ^{150, 151}.

En el caso de inhibidores tipo Kunitz presentes en venenos, experimentos de mutagénesis por alaninas y modelado computacional sugieren que residuos localizados en el extremo amino-terminal y en el asa que une las dos hebras- β antiparalelas serían responsables de la actividad del bloqueo de K_v ¹⁵²⁻¹⁵⁴. La mayoría de estos estudios han sido realizados con las DTx. Los residuos de la α -DTx implicados en bloqueo de K_v se señalan en rojo en la Figura 13 (y se detallan más adelante en la sección 1.4.2.3). A diferencia de las DTx, el inhibidor tipo Kunitz llamado Hg1, presente en el veneno de un escorpión y particularmente específico para $K_v1.3$, interacciona con los K_v por su región C-terminal ¹⁵⁵. En la Figura 11 se muestran las estructuras de δ -DTx y Hg1, indicándose los residuos aminoacídicos necesarios para el bloqueo K_v en cada caso.

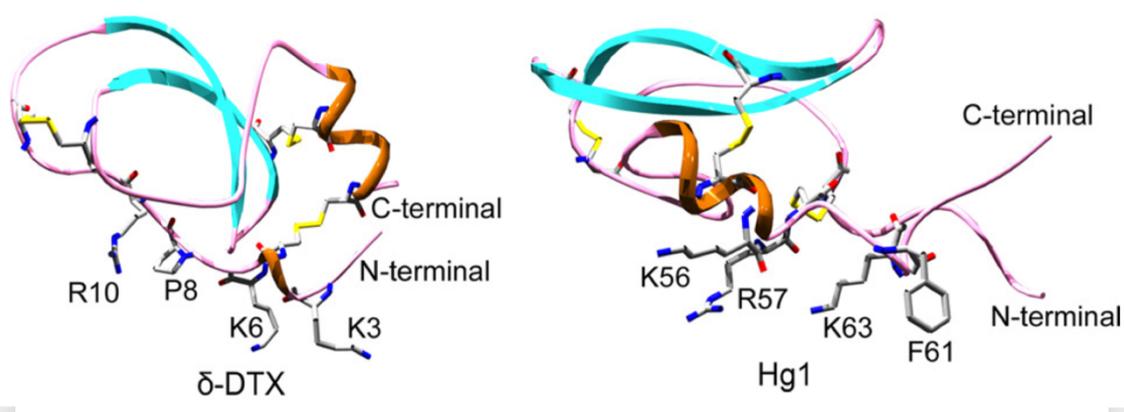


Figura 11. Estructuras de proteínas tipo Kunitz bloqueantes de K_v . A la izquierda se muestra la estructura de la δ -DTx modelada a partir de la estructura de la DTx-K (PDB: 1DTK) interaccionando con el canal $K_v1.1$. A la derecha se muestra la estructura del Hg1 modelado a partir de la estructura del BPTI (PDB: 6PTI). Se muestran de manera detallada los principales residuos que participan en las actividades de bloqueo de canales. Obtenida de Chen, 2012 ¹⁵⁵.

Cabe destacar que, si bien algunas de estas toxinas tipo Kunitz bloqueantes de K_v poseen además actividad de inhibición de proteasas de serina, las regiones involucradas en una y otra actividad son distintas e independientes ^{153, 155}.

En cuanto al bloqueo de ASIC, toxinas presentes en secreciones de animales con esta actividad se caracterizan por tener una fuerte carga positiva a pH fisiológico ¹⁵⁶⁻¹⁵⁸. De manera similar que para los K_v , las toxinas bloqueantes de ASICs interaccionan mediante agrupaciones de residuos básicos e hidrofóbicos, pero no existen estudios estructurales detallados en esta área ¹⁵⁹.

1.4. Proteínas tipo Kunitz de helmintos, con énfasis en *E. granulosus*

1.4.1. Proteínas tipo Kunitz de parásitos expuestas a los hospederos

A continuación se describen proteínas Kunitz de parásitos helmintos secretadas o de alguna forma expuestas a los hospederos. La glicoproteína GP300, que se expresa en los nemátodos *Dictyocaulus viviparus*, *Haemonchus contortus* y *Cooperia oncophora* presenta varios dominios Kunitz en su secuencia, y tiene actividad inhibidora de tripsina. Estos parásitos infectan a los hospederos por vía oral y en algunos casos cumplen una etapa de su ciclo en el intestino, por lo que este inhibidor podría tener como blanco las proteasas digestivas de los hospederos ¹⁶⁰. El inhibidor tipo Kunitz AceKI-1 del nemátodo *Ancylostoma ceylanicum* inhibe quimotripsina, elastasa pancreática, tripsina y elastasa de neutrófilos, sugiriendo una función en la protección contra proteasas digestivas y contra la respuesta inmune del hospedero ¹⁶¹. El tremátodo *Fasciola hepatica* expresa la proteína tipo Kunitz Fh-KTM, que inhibe tripsina ¹⁶², y tiene funciones inmuno-moduladoras sobre células dendríticas ¹⁶³. *F. hepática* además expresa FhKT1, que carece de actividad inhibidora de proteasas de serina, y en cambio inhibe proteasas de cisteína, específicamente las catepsinas L de *F. hepatica* y la catepsina L y K humanas. Las catepsinas L son secretadas por el parásito para romper los tejidos del hospedero durante la migración, y entonces la secreción de FhKT1 podría ser una forma de regulación de la actividad de sus propias proteasas ¹⁶⁴. Las formas adultas de los trematodos del género *Schistosoma* viven en el sistema circulatorio de sus hospederos. *Schistosoma japonicum* expresa la proteína tipo Kunitz SJKI-1 ¹⁶⁵, mientras que *Schistosoma mansoni* expresa SmKI-1 ¹⁶⁶. Ambas inhiben elastasa de neutrófilo y el factor Xa de la cascada de coagulación ^{165, 166}. *E. granulosus* expresa inhibidores Kunitz, algunos de los cuales se sabe que son secretados al medio interno de los hospederos ⁸⁸. Los inhibidores Kunitz de *E. granulosus* fueron los primeros inhibidores Kunitz con funciones bloqueantes de canales descritos en helmintos ¹⁶⁷. Los inhibidores Kunitz de *E. granulosus* se describen en la sección siguiente.

1.4.2. Proteínas tipo Kunitz de *E. granulosus*

1.4.2.1. Antecedentes del grupo de trabajo

El análisis del transcriptoma de protoesclólices por miembros de nuestro grupo reveló la existencia de una familia de inhibidores Kunitz (*EgKU*), monodominio y con señal para el sistema vesicular. Los 8 miembros de la familia inicialmente detectados (*EgKU-1* - *EgKU-8*) se expresaban a nivel de ARNm principalmente en protoesclólices tratados con pepsina/H⁺, condiciones que encuentra el parásito en el intestino del hospedero definitivo ⁸⁸. Estos inhibidores fueron caracterizados a nivel de sus actividades de inhibición de proteasas de serina y de bloqueo de canales catiónicos ^{88, 167}.

Más tarde, datos de proyectos genoma revelaron la existencia de 8 proteínas Kunitz monodominio adicionales, que son expresadas de manera diferencial en distintas etapas del ciclo de vida del *E. granulosus*. Esto lleva a 16 en total el número de proteínas que componen la familia *EgKU* ^{168, 169}. Adicionalmente, en el genoma de *E. granulosus* se detectaron dominios Kunitz en proteínas multi-dominio, que no son relevantes para la presente Tesis.

La familia *EgKU* se compone de 7 pares de parálogos cercanos, que serían productos de duplicaciones génicas recientes, y dos miembros que parecen no presentar parálogos cercanos (Figura 12).

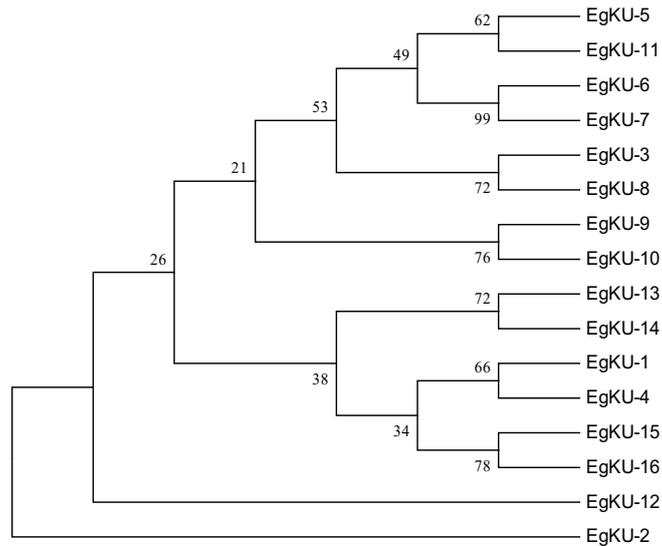


Figura 12. Filogenia de los 16 miembros de la familia *EgKU*. La nomenclatura que se muestra en la figura y que se utiliza en esta tesis fue asignada por nuestro grupo. La nomenclatura asignada por el *Chinese National Human Genome Center* es: *EgKU-2*, Egr_09268; *EgKU-3*, Egr_07244; *EgKU-5*, Egr_09269; *EgKU-6*, Egr_04958; *EgKU-7*, Egr_10096; *EgKU-8*, Egr_07243; *EgKU-9*, Egr_08721; *EgKU-11*, Egr_07242; *EgKU-12*, Egr_09006; *EgKU-14*, Egr_09007; *EgKU-15*, Egr_08720; *EgKU-16*, Egr_08716. La nomenclatura asignada por el Sanger Centre (sitio web *WormBase ParaSite*; <http://parasite.wormbase.org/>) es: *EgKU-1*, EgrG_001136700; *EgKU-2*, EgrG_00419100; *EgKU-3*, EgrG_534900; *EgKU-4*, EgrG_001137100; *EgKU-5*, EgrG_00419200; *EgKU-6*, EgrG_549400; *EgKU-7*, EgrG_548800; *EgKU-8*, EgrG_534700; *EgKU-9*, EgrG_001136500; *EgKU-10*, EgrG_001138000; *EgKU-12*, EgrG_001137200; *EgKU-13*, EgrG_001137300; *EgKU-14*, EgrG_001137400; *EgKU-15*, EgrG_001136600; *EgKU-16*, EgrG_001137000. El mapa fue construido mediante el método *Neighbor-Joining*, verificado por *Bootstrap*, utilizando el programa Mega 4.

Los miembros de la familia *EgKU* presentan altos niveles de similitud con proteínas homólogas fuera del género *Echinococcus*⁸⁸. La excepción es *EgKU-2*, que fuera del género *Echinococcus* solo presenta un ortólogo conocido en *T. solium*¹⁶⁷. *EgKU-2* es inusual en cuanto a que los residuos Gly₁₂, Phe₃₃, Gly₃₇ y Gly₄₀, altamente conservados en la familia Kunitz/I2, se encuentran sustituidos por alaninas y serinas. Además difiere del resto de la familia *EgKU* por tener una extensión larga carboxilo-terminal (ver Figura 13). Esta extensión aparentemente contribuye a que *EgKU-2* expresado en bacterias tienda a formar agregados y precipitar, probablemente debido a un mal plegamiento. En suma, *EgKU-2* resulta ser un inhibidor Kunitz atípico^{88, 170}.

Los ensayos cinéticos con los 8 primeros miembros de la familia *EgKU* expresados en forma recombinante, así como con *EgKU-1* y *EgKU-8* nativos, demostraron que *EgKU-3* inhibe quimotripsina, mientras que *EgKU-5*, *EgKU-6*, *EgKU-7* y *EgKU-8* inhiben tripsina. Además mostraron que *EgKU-4* tiene actividad solo marginal de inhibición de tripsina¹⁶⁷, y que *EgKU-1* no tiene actividad detectable de inhibición de proteasas⁸⁸. Para *EgKU-2*, si bien no se logró realizar un estudio cinético detallado, los ensayos preliminares realizados con pequeñas cantidades de la

proteína renaturalizada a partir de cuerpos de inclusión sugirieron que era un inhibidor de alta afinidad de la quimotripsina ¹⁶⁷.

Los análisis detallados de las cinéticas de inhibición de *EgKU-3* ¹⁶⁷ y *EgKU-8* ⁸⁸ demostraron que estos miembros de la familia se comportan como inhibidores Kunitz típicos: son inhibidores competitivos de alta afinidad. La formación del complejo enzima-inhibidor sucede en la escala de minutos, lo que indica que son inhibidores lentos. El mecanismo de inhibición involucra dos pasos reversibles: uno de unión del inhibidor a la enzima y otro de cambio conformacional del complejo enzima-inhibidor hacia un complejo más estable ^{88, 167}.

EgKU-8 inhibe los dos tipos de tripsinas existentes en el perro (catiónica y aniónica), con K_i^* del orden de 10^{-11} M, en ambos casos. Además inhibe la tripsina bovina, pero con una K_i^* 3 veces mayor, lo que sugiere que sus blancos biológicos podrían ser efectivamente las enzimas digestivas del perro ⁸⁸. *EgKU-3* inhibe la quimotripsina canina con la misma afinidad que la bovina (K_i^* 10^{-11} M), e inhibe elastasa porcina, aunque para esta enzima no es un inhibidor tan potente (K_i^* 10^{-9} M) ¹⁶⁷.

EgKU-1 y *EgKU-4*, que como se mencionó no mostraron actividad significativa de inhibición de proteasas, comparten con la DTx motivos de secuencia que han sido implicados en el bloqueo de canales por dicha proteína (Figura 13) ^{152, 154}. Por ello, se evaluó su actividad como bloqueantes de canales mediante ensayos de *whole-cell patch-clamp* en neuronas de ganglio dorsal de rata. Estos estudios revelaron que *EgKU-1* y *EgKU-4* bloquean K_v y ASIC, y en cambio no bloquean canales de sodio activados por voltaje (Na_v). *EgKU-1* inhibe las corrientes de K_v con un IC_{50} de 200 nM y las de ASIC con un IC_{50} de aproximadamente 8 nM, es decir que es 25 veces más potente sobre ASIC que sobre K_v . *EgKU-4* se comporta de manera similar a *EgKU-1* en relación a K_v y ASIC presentes en neuronas de ganglio dorsal de rata ¹⁶⁷.

Finalmente se debe señalar que tanto *EgKU-4* como *EgKU-2* (pero no *EgKU-1*) presentan motivos básicos en sus regiones C-terminales que podrían estar emparentados con un motivo presente en Hg1 e involucrado en el bloqueo de K_v por este inhibidor (Figura 13) ¹⁵⁵. Esto sugiere las posibilidades que *EgKU-2* sea un bloqueante de K_v y que para al menos ciertos K_v , *EgKU-4* pueda tener actividades diferenciales en relación a *EgKU-1*.

En la Figura 13 se muestra un alineamiento de las secuencias de los inhibidores Kunitz estudiados en esta Tesis. Se incluyen además, a modo de comparación, las secuencias de la δ -DTx y el Hg1, que si bien no fueron estudiadas en esta Tesis son referencias de inhibidores de K_v de familia Kunitz.

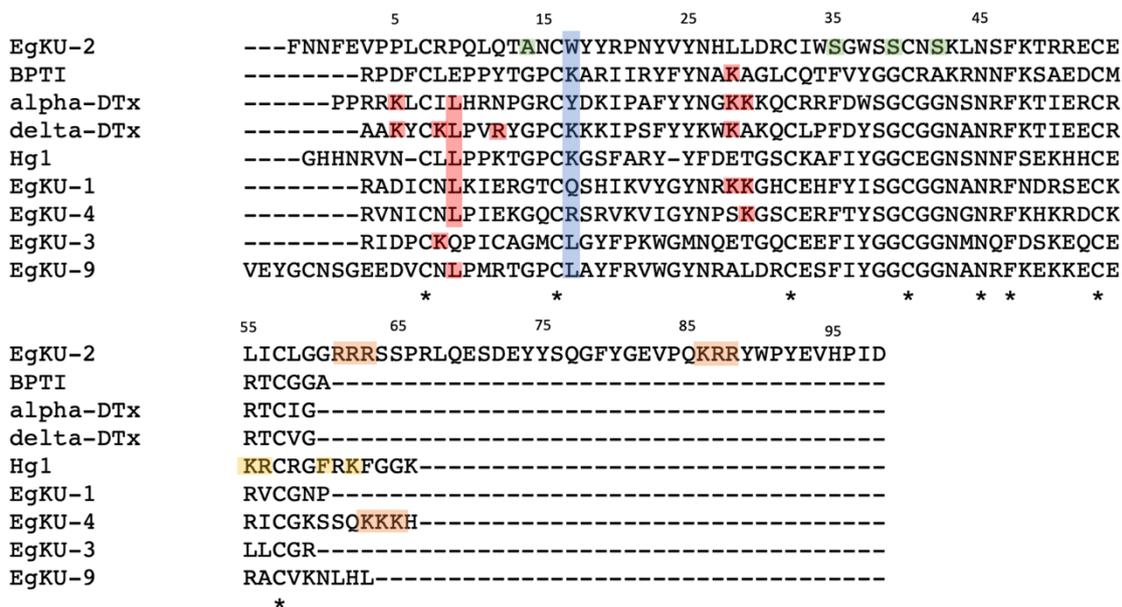


Figura 13. Alineamiento de secuencias de inhibidores Kunitz. Se muestran las secuencias de los inhibidores tipo Kunitz BPTI, α -DTx, δ -DTx, Hg1, y los siguientes EgKUs: EgKU-1, EgKU-3, EgKU-4, EgKU-2 y EgKU-9. Para EgKU-9 se representa la variante EgKU-9L (ver más adelante). Se utiliza la numeración de la α -DTX. Se señalan con asteriscos los residuos conservados en todas las secuencias, entre los que se encuentran las cisteínas que forman los puentes disulfuro. En azul se señala el residuo que correspondería al P1 si todas las proteínas alineadas interaccionaran con proteasas de serina. En rojo se señalan los residuos que han sido asociados con la actividad de las DTx (K₅, K₈, L₉, R₁₂, K₂₈, K₂₉)^{152, 154}; notar que 3 de ellos se encuentran presentes en posiciones equivalentes en EgKU-1, dos en EgKU-4, y uno en EgKU-9, EgKU-3 y en el BPTI. En amarillo se señalan los residuos asociados a la actividad de bloqueo de K_v por Hg1 (K₅₅, R₅₆, F₆₀, K₆₂)¹⁵⁵. En naranja se señalan sub-secuencias de 3 residuos básicos próximos a los extremos C-terminales de EgKU-2 y EgKU-4. Se señalan en verde los residuos conservados GFGG, sustituidos por ASSS en EgKU-2, respectivamente. El alineamiento se realizó utilizando la herramienta Muscle 3.8 del programa Clustal.

1.4.2.2. Otros antecedentes

McManus y colaboradores estudiaron otros dos miembros de la familia EgKU, (EgKU-9 y EgKU-11), a los que llamaron EgKI-1 y EgKI-2 respectivamente. Produjeron estas proteínas de manera recombinante y caracterizaron su actividad como inhibidores de proteasas. EgKU-9 resultó ser un inhibidor potente de la elastasa de neutrófilos ($K_i^* 10^{-11}$ M) y de la catepsina G ($K_i^* 10^{-10}$ M), también una proteasa de serina de neutrófilos. EgKU-9 además inhibió quimotripsina bovina ($K_i^* 10^{-9}$ M) y elastasa pancreática ($K_i^* 10^{-9}$ M). En un modelo de inflamación local, EgKU-9 redujo la infiltración de neutrófilos. De EgKU-11 se informó solo que inhibió tripsina bovina con una K_i^* de 10^{-8} M¹⁷¹.

En otro trabajo, el mismo grupo observó que EgKU-9 es internalizado por células tumorales, en las que inhibe la migración e induce apoptosis *in vitro*, así como inhibe su crecimiento *in vivo*¹⁷².

En la Tabla 1 se resumen las actividades de los inhibidores Kunitz de *E. granulosus* que se han estudiado hasta el momento: EgKU-1 - EgKU-9, y EgKU-11.

Kunitz	Residuo en P1	Inhibición de proteasas	Bloqueo de canales
EgKU-1	Gln	no inhibe	K _v , ASIC
EgKU-2	Trp	quimotripsina	no determinada
EgKU-3	Leu	quimotripsina	no inhibe K _v ni ASIC
EgKU-4	Arg	tripsina (actividad marginal)	K _v , ASIC
EgKU-5	Arg	tripsina	no determinada
EgKU-6	Arg	tripsina	no determinada
EgKU-7	Arg	tripsina	no determinada
EgKU-8	Arg	tripsina	no inhibe K _v ni ASIC
EgKU-9	Leu	quimotripsina, elastasa, catepsina G	no determinada
EgKU-11	Arg	tripsina	no determinada

Tabla 1. Actividades de los EgKUs estudiados hasta el momento. Las proteínas Kunitz estudiadas en esta tesis se señalan en gris. Los datos para EgKU-1-EgKU-7 fueron obtenidos de Fló, 2017 ¹⁶⁷. Los datos de EgKU-8 fueron obtenidos de González, 2009 ⁸⁸. Los datos de EgKU-9 y EgKU-11 fueron obtenidos de Ranasinghe, 2009 ¹⁷¹.

1.4.2.3. Datos sobre patrones de expresión

El *Chinese National Human Genome Center* ¹⁶⁸ y el *Wellcome Trust Sanger Centre* ¹⁶⁹ secuenciaron en forma independiente el genoma de *E. granulosus sensu stricto*. El *Chinese National Human Genome Center* además obtuvo transcriptomas de distintos estadios del ciclo de vida del parásito. Estos datos transcriptómicos están disponibles solamente para aquellos genes que el grupo chino predijo a nivel genómico, que en el caso de la familia EgKU incluye a todos los miembros excepto a EgKU-1, EgKU-4, EgKU-10 y EgKU-13 ¹⁶⁸. Estos datos de ARNm se complementan con datos a nivel de proteína obtenidos por nuestro grupo analizando protoescolices, líquido hidático y secreciones de gusanos adultos ^{88, 167}. Si bien no hay datos transcriptómicos del *Wellcome Trust Sanger Centre* de *E. granulosus*, sí hay datos disponibles de ARNm de los distintos estadios de *E. multilocularis*, especie muy cercana.

A continuación se resumen en forma integrada los datos sobre expresión de los miembros de la familia EgKU en el ciclo de vida de *Echinococcus* provenientes de las tres fuentes mencionadas.

Según datos transcriptómicos, EgKU-3, EgKU-7, EgKU-8, EgKU-11 y EgKU-16 son los más expresados en el adulto ¹⁶⁸. Además, a nivel proteómico EgKU-3 y EgKU-8 se encuentran en secreciones de protoescolices ⁸⁸ y de gusanos adultos inmaduros ¹⁶⁷, lo que sugiere que estas proteínas podrían participar en el comienzo y mantenimiento de la infección en el hospedero definitivo. EgKU-3 y EgKU-8 también están presentes en el líquido hidático ¹⁶⁷, probablemente como consecuencia de la liberación por protoescolices; igualmente no se puede descartar que EgKU-3 y EgKU-8 tengan funciones durante la infección crónica en el hospedero intermediario. Como se mencionó, EgKU-1 y EgKU-4 no fueron predichos como

genes por el grupo chino, por lo que no hay datos de su patrón de expresión. Sin embargo, sus ortólogos en *E. multilocularis* están altamente expresados en adultos grávidos (es decir, con huevos) y no en pre-grávidos, lo que sugiere expresión en la oncosfera, y por lo tanto función en la instalación en el hospedero intermediario ¹⁶⁹. A nivel proteómico, *EgKU-1* se encontró en protoescólex ⁸⁸. *EgKU-9* y *EgKU-2* en este orden son los transcriptos más expresados en la oncosfera de *E. granulosus* ¹⁶⁸. Además, experimentos de hibridación *in situ* revelaron la presencia de *EgKU-2* en protoescólices, particularmente en la glándula rostellar ¹⁷⁰, que en la infección en el hospedero definitivo se encuentra en íntimo contacto con la mucosa del hospedero. *EgKU-5* y *EgKU-6* se expresan principalmente en el adulto, aunque su expresión parece ser baja durante todo el ciclo de vida del parásito ¹⁶⁸.

En la Tabla 2 se resumen los datos transcriptómicos de los inhibidores Kunitz de *E. granulosus* que se han estudiado hasta el momento (*EgKU-1* - *EgKU-9*, y *EgKU-11*), y sus ortólogos en *E. multilocularis*.

Gen	Datos de <i>E. granulosus sensu stricto</i>				Datos de ortólogos en <i>E. multilocularis</i>		
	Onc. act.	Hidátide	PSC	Adulto	Vesícula	Adulto pre-grávido	Adulto grávido
<i>KU-1</i>	NP ^a	NP ^a	NP ^a	NP ^a	0	195	10085
<i>KU-2</i>	509	266	228	31	444	22	26
<i>KU-3</i>	0	237	34	4500	137	662	457
<i>KU-4</i>	NP ^a	NP ^a	NP ^a	NP ^a	91	1543	5612
<i>KU-5</i>	0	191	0	191	0	31	32
<i>KU-6</i>	0	37	27	82	0	53	44
<i>KU-7</i>	0	103	110	1569	18	223	110
<i>KU-8</i>	0	167	95	1022	0	473	435
<i>KU-9</i>	9823	0	0	166	25	50	83
<i>KU-11</i>	0	151	43	1215	NP ^a	NP ^a	NP ^a

Tabla 2. Datos de expresión de inhibidores Kunitz de *E. granulosus* que han sido estudiados, y sus ortólogos en *E. multilocularis*. Se muestran datos de expresión expresados en RPKM (del inglés *reads per kilobase million*; número de lecturas por millón de kilobases) en distintos estadios del ciclo de vida de los parásitos. En rojo se señalan los RPKM mayores a 500, que se consideran valores altos. Las proteínas Kunitz de *E. granulosus* estudiadas en esta tesis se señalan en gris. ^a NP, gen no predicho; PSC, protoescólices. La vesícula es el estadio de *E. multilocularis* equivalente a la hidátide en *E. granulosus*, con la diferencia de que las vesículas proliferan e invaden los tejidos ³⁹. Los datos de *E. granulosus* fueron obtenidos de Zheng, 2013 ¹⁶⁸. Los datos de los ortólogos en *E. multilocularis* fueron obtenidos de Tsai, 2013 ¹⁶⁹.

A partir de lo que se explicó a lo largo de la introducción de esta Tesis, surgió la hipótesis que los *EgKUs* participaran en los mecanismos inmuno-evasivos que permiten a *E. granulosus* sobrevivir en el hospedero intermediario y posiblemente también en el definitivo. Dada la relevancia de los macrófagos en las infecciones por helmintos ^{6, 28, 36, 37} (ver Sección 1.1.2), nos interesaba estudiar efectos sobre la respuesta inmune de estas células. En un principio se planteó trabajar con *EgKU-1*, *EgKU-3* y *EgKU-4*, los cuales habían sido previamente clonados y expresados por el grupo ¹⁶⁷. Esta elección privilegió a dos inhibidores con funciones bloqueantes de canales, *EgKU-1* y *EgKU-4*, dado que nuestra hipótesis hacía énfasis en posibles efectos a través del bloqueo de canales. *EgKU-3*, que no bloquea canales, fue incluido en principio como punto de comparación, pero no se descartó la posibilidad

de observar efectos sobre los macrófagos debidos a su actividad de inhibición de proteasas. En una segunda instancia nos propusimos trabajar con dos inhibidores Kunitz adicionales, *EgKU-9* y *EgKU-2*, que no habían sido producidos por el grupo. *EgKU-1*, *EgKU-4*, *EgKU-2* y *EgKU-9* nos interesaban porque su patrón de expresión sugiere funciones durante la infección en el hospedero intermediario ^{88, 168, 169}. Sumado a esto, *EgKU-2* era un miembro de la familia que nos llamaba la atención por sus características estructurales peculiares ¹⁶⁷.

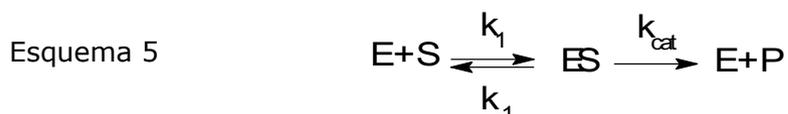
En el caso de *EgKU-9* se da la particularidad de que la proteína fue predicha por el *Wellcome Trust Sanger Centre* ¹⁶⁹ con 8 residuos adicionales en su extremo N-terminal en comparación la predicción del *Chinese National Human Genome Center* ¹⁶⁸. Si bien probablemente exista un error en una de las predicciones, no es posible deducir cuál es la predicción correcta. Por esta razón, en esta Tesis se trabajó con las dos variantes posibles de *EgKU-9*, a las cuales llamamos *EgKU-9* largo (*EgKU-9L*) y *EgKU-9* corto (*EgKU-9C*).

En la Tesis se trabajó además con otros dos inhibidores de tipo Kunitz de origen no parasitario, usados como puntos de comparación: el BPTI (utilizado como modelo de Kunitz inhibidor de proteasas), y la α -DTx (utilizada como modelo de Kunitz bloqueante de canales). Finalmente, se trabajó también con una serie de inhibidores comerciales de K_v y K_{Ca} relevantes en el sistema inmune, como se retomará en la Sección Resultados y Discusión.

Anexo: cinética enzimática clásica

El modelo clásico para el análisis de la cinética enzimática fue descrito por Henri a fines del siglo XIX y continuado a principios del XX por Michaelis y Menten, en términos del modelo de equilibrios rápidos. Más adelante, Briggs y Haldane (1925) demostraron que un tratamiento similar podría ser utilizado para describir la velocidad enzimática en condiciones de estado estacionario ¹⁷³.

Las reacciones enzimáticas son estudiadas bajo condiciones de estado estacionario. El término estado estacionario se refiere al periodo de tiempo en el cual la concentración del complejo *ES* se mantiene constante, por un balance entre su velocidad de formación (por asociación del sustrato libre a la enzima libre) y su velocidad de desaparición (por disociación a la enzima y sustrato libre y por formación del producto). Experimentalmente, esto se logra trabajando con un exceso de sustrato en comparación con la concentración de enzima; de esta manera existe una cantidad de sustrato disponible para unirse a la enzima libre que puede considerarse constante ¹⁷³.



k_{cat} es una constante de primer orden relativa que hace referencia a la serie de eventos rápidos que van a dar lugar al producto a partir de *ES*. En el caso más simple de un solo paso, k_{cat} va a ser igual a la constante de velocidad primer orden k_2 . En condiciones de estado estacionario, k_{cat} es mucho mayor que k_{-1} , y la velocidad de una reacción enzimática, que puede medirse como la aparición de producto o la desaparición de sustrato, es proporcional a la concentración del complejo *ES* ¹⁷³.

Ecuación 5

$$v = \frac{-d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k_{cat}[ES]$$

Por lo tanto, mientras que $[ES]$ se mantenga constante, por ejemplo bajo condiciones de estado estacionario, la velocidad de la reacción también va a ser constante, y puede definirse como la pendiente del gráfico lineal de $[P]$ o $[S]$ en función del tiempo ¹⁷³.

La fase de velocidad inicial de la reacción, donde la concentración de sustrato libre puede considerarse constante, generalmente dura hasta que un 10% del sustrato fue consumido. Luego de este tiempo, la velocidad de la reacción comienza a disminuir, hasta que se establece un equilibrio entre la reacción de formación de producto y la reacción reversa ¹⁷³.

Si se fija la concentración de enzima, y la concentración de sustrato en exceso varía, la velocidad inicial de la reacción varía con la concentración de sustrato según la Ecuación 6, denominada ecuación de Michaelis-Menten.

Ecuación 6

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_M + [S]}$$

A concentraciones bajas de sustrato, la velocidad inicial varía linealmente con la concentración de sustrato. A concentraciones muy altas de sustrato la velocidad inicial alcanza un valor máximo ($V_{m\acute{a}x}$), que indica que los sitios activos de todas las moléculas de enzima están saturadas con sustrato (Figura 14) ¹⁷³.

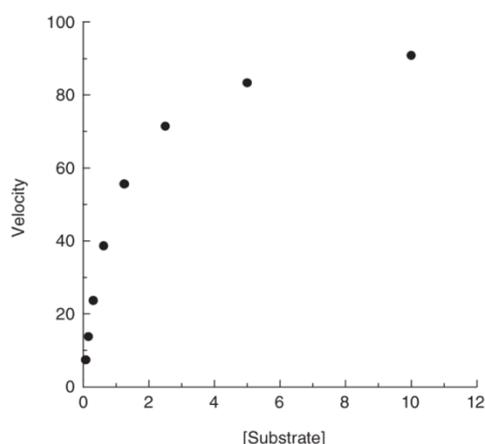


Figura 14. Gráfico representativo de la ecuación de Michaelis-Menten. Se observa un comportamiento hiperbólico de la velocidad inicial con respecto al aumento en la concentración de sustrato, de una reacción enzimática en condiciones de estado estacionario. Obtenida de Copeland, 2000 ¹⁷³.

En esta nueva ecuación, como no se pueden suponer equilibrios rápidos, la constante de equilibrio de disociación enzima-sustrato, K_S , se sustituye por la constante cinética K_M . K_M no es una constante de equilibrio, pero puede ser considerada como una medida de la afinidad relativa del complejo ES en condiciones de estado estacionario. Experimentalmente, K_M es la concentración de sustrato que produce una velocidad inicial igual a la mitad de la velocidad máxima ¹⁷³.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Como objetivo general de esta Tesis de Maestría se planteó la producción de proteínas Kunitz del parásito *Echinococcus granulosus* y el estudio de sus posibles efectos de sobre respuestas de macrófagos.

2.2. Objetivos específicos

1. Producir *EgKU-1*, *EgKU-3*, *EgKU-4* (previamente clonados por el grupo ¹⁶⁷) en *Escherichia coli*, puros y lo suficientemente libres de endotoxinas para su uso en ensayos funcionales con macrófagos.
2. Producir *EgKU-9* y *EgKU-2*, en *Escherichia coli* y/o *Drosophila melanogaster*, puros y lo suficientemente libres de endotoxinas para su uso en ensayos funcionales con macrófagos.
3. Caracterizar la actividad de inhibición de *EgKU-9* y *EgKU-2* producidos de manera recombinante sobre distintas proteasas de serina.
4. Evaluar los efectos de inhibidores Kunitz recombinantes con actividades de bloqueo de canales o de inhibición de proteasas sobre la activación por agonistas de TLR y la proliferación inducida por M-CSF de macrófagos; comparar con efectos de inhibidores comerciales de canales catiónicos relevantes en el sistema inmune y de proteasas, a fin de procurar información mecanística.

3. Materiales y Métodos

3.1. Reactivos generales

Las sales inorgánicas, etanol 95% (v/v), ácido clorhídrico (HCl) y ácido acético, se obtuvieron de droguerías en plaza.

Los reactivos que se detallan a continuación se adquirieron en Sigma o en Merck: ditioneitol (DTT), fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF), lauril sulfato de sodio (SDS), acrilamida, N,N'-metilen-bis-acrilamida, N,N,N',N'- tetrametiletilendiamina (Temed), azul de Coomassie R250, azul de bromofenol, glutaraldehído, dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, persulfato de amonio (APS), agarosa, seroalbúmina bovina (BSA), biotina, 7-amido-4-metilcumarina (AMC), N-succinil-alanil-alanil-prolil-fenilalanil-7-amido-4-metilcumarina (N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC), N-succinil-alanil-alanil-alanil-7-amido-4-metilcumarina (N-Suc-Ala-Ala-Ala-AMC), N-*tert*-butiloxicarbonil-isoleucil-glutamil-glicil-arginil-7-amido-4-metilcumarina (N-BOC-Ile-Glu-Gly-Arg-AMC), elastasa porcina, tripsina bovina, quimotripsina- α bovina, ampicilina, kanamicina, puromicina, streptomycin, penicilina.

Los siguientes reactivos se adquirieron en Applichem: bicarbonato de sodio, D(+) glucosa, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), t-octil fenoxipolietoxietanol (Tritón X-100).

Los reactivos que se detallan a continuación se obtuvieron de Thermo: MgCl₂, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), ADN polimerasa Taq y amortiguador 10x *Phusion HF*, empleados en las reacciones de PCR, amortiguador de muestra 6x y marcador de peso molecular, empleados en las electroforesis en gel de agarosa y marcador de peso molecular utilizado en las SDS-PAGE.

La quimotripsina canina había sido purificada a partir de páncreas de perro por miembros del grupo. Esta preparación constituye una mezcla de las dos isoformas de quimotripsina- β canina¹⁶⁷.

3.2. Producción de proteínas Kunitz recombinantes

3.2.1. Técnicas generales

3.2.1.1. PCR

La mezcla de reacción para las PCR se preparó con MgCl₂ 50 mM, dNTPs 200 nM, cebador directo 0.5 μ M y cebador reverso 0.5 μ M, ADN polimerasa Taq 50 U/mL y entre 0.5 y 20 ng de molde, en amortiguador 10x *Phusion HF*.

El ciclo de amplificación consistió en una separación inicial de las hebras de ADN a 98°C durante 30 minutos, luego de lo cual se realizaron 30 ciclos de: desnaturalización de 10 segundos a 98°C, hibridación durante 30 segundos a 65°C y extensión o replicación durante 1 minuto a 72°C para la primera y tercera PCR, y 4 minutos para la segunda PCR. Para la replicación final se mantuvo la temperatura a 72°C durante 5 minutos.

3.2.1.2. Electroforesis en gel de agarosa

Se prepararon geles de 1% p/v de agarosa. Las electroforesis se realizaron en una cuba horizontal HE 99x (Amersham Biosciences), a 150 V, en amortiguador TAE (Tris-base 40 mM, ácido acético 19 mM, EDTA 1 mM, pH 7.5) y a temperatura ambiente. Las muestras fueron preparadas con amortiguador de muestra 6x y el ADN se tiñó con bromuro de etidio. Una vez finalizada la corrida el gel se visualizó en un transiluminador UV (Gel Logic). Se estimó el peso molecular de los componentes de las muestras comparando con un marcador de peso molecular de rango 100 a 2000 pares de bases, que se corrió junto a las muestras.

3.2.1.3. SDS-PAGE

Se realizó siguiendo el protocolo de Laemmli ¹⁷⁴ utilizando un gel concentrador de acrilamida al 5% p/v y un gel separador de 10, 12 o 15% p/v de acrilamida, dependiendo de la muestra. Los geles, de 1.5 mm de espesor, se corrieron en el sistema Mini PROTEAN II (BioRad, EUA). Las muestras fueron preparadas con amortiguador de muestra reductor 5x (Tris-HCl 1 M pH 6.8, glicerol 50% v/v, SDS 10% p/v, azul de bromofenol 0.05% v/v, DTT 0.5 M). Todas las muestras fueron mantenidas a 98°C por 10 minutos. La electroforesis se realizó a 30 mA/gel, en un amortiguador Tris-glicina (Tris 0.3% p/v, glicina 1.44% p/v, SDS 0.1% p/v), a temperatura ambiente. Se estimó el peso molecular de los componentes de las muestras comparando con un marcador de peso molecular pre-teñido de rango 10 a 180 KDa, que se corrió junto a las muestras. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250 por inmersión en una solución del colorante (0.1% p/v en solución fijadora: 40% v/v metanol, 10% v/v ácido acético) durante toda la noche y se destiñeron con una solución de 7% v/v ácido acético y 5% v/v etanol, durante todo el día.

3.2.1.4. Determinación de la concentración de las proteínas

La concentración de las preparaciones de proteínas con alto grado de pureza se determinó a partir de la absorbancia a 280 nM. Se midió por triplicado en un espectrofotómetro de gotas NanoDrop 1000 (Thermo), luego se determinó la concentración dividiendo el promedio de los triplicados por el ϵ teórico determinado a partir de la secuencia de la proteína en el sitio ProtParam de Expasy (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>).

3.2.1.5. Identificación de las proteínas por MALDI-TOF-MS

Se verificó la identidad de las proteínas recombinantes por espectrometría de masas con ionización por láser asistida por matriz y detección por tiempo de vuelo (MALDI-TOF, del inglés *matrix-assisted light desorption ionization-time of flight*). Los análisis fueron realizados por Madelón Portela (Unidad de Bioquímica Analítica, Instituto Pasteur de Montevideo), utilizando un instrumento Voyager DE-PRO (Applied Biosystems, MA, EUA), con un láser de nitrógeno ($\lambda = 337$ nm).

3.2.2. Procedimientos generales

3.2.2.1. Transformación de bacterias *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS por choque térmico

En el laboratorio contábamos con células quimio-competentes, almacenadas en viales de tipo *ependorf* a -80°C . Para comenzar con el proceso de transformación las bacterias se retiraron del *freezer* y se descongelaron en baño de agua con hielo. Una vez descongeladas las células se les agregó $2\ \mu\text{L}$ de plásmido y se mantuvieron en hielo por 30 minutos. Luego se colocaron a 42°C durante 2 minutos y se llevaron nuevamente a hielo durante 2 minutos más. Luego se agregaron $400\ \mu\text{L}$ de medio de cultivo 2YT y se mantuvieron a 37°C durante 1 hora (periodo de recuperación). Finalmente se plaquearon $100\ \mu\text{L}$ del precultivo en placas de LB agar con antibióticos selectivos y se incubó durante toda la noche a 37°C .

3.2.2.2. Protocolo general de purificación de proteínas con tag de poli-histidina

Una vez expresada la proteína, se cosecharon las bacterias mediante centrifugación del cultivo, y se re-suspendieron en amortiguador Tris 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, a un pH al menos una unidad por debajo o por encima del punto isoeléctrico de la proteína recombinante, en presencia de 0.01 U/mL de ADNasa y 1 mg/mL de lisozima, en una relación 5 mL de amortiguador por gramo de bacterias. La pared de las bacterias se rompió con un homogeneizador a presión Emulsiflex C5 (Avestin). Para la purificación se realizó una cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC, del inglés *immobilized metal affinity chromatography*) en columnas de níquel *His-trap HP* de 1 mL (GE Healthcare), en un equipo de FPLC (del inglés *fast protein liquid chromatography*) (AKTA purifier), y se recuperó la proteína con un gradiente de 0 a 500 mM de imidazol de 10 minutos, a un flujo de 1 mL/min. Durante la elución, la presencia de proteína se siguió mediante la medida de la absorbancia a 280 nm y a 220 nm.

3.2.2.3. Protocolo general para la purificación de proteínas por intercambio iónico

Previo al intercambio iónico se realizó una diálisis o una gel filtración con columna PD10 para cambiar el amortiguador en el que se encontraba la proteína a un amortiguador de baja fuerza iónica: Tris 50 mM, NaCl 10 mM, pH al menos una unidad por debajo del punto isoeléctrico de la proteína recombinante, preparado en agua para inyectables y filtrado por $0.22\ \mu\text{m}$. Para la purificación de *EgKU-1*, *EgKU-4*, *EgKU-2* y *EgKU-9C*, proteínas básicas, se realizaron intercambios catiónicos con columnas Resource S o Mono S, mientras que para *EgKU-3* y *EgKU-9L*, proteínas ácidas, se realizaron intercambios aniónicos con columnas Resource Q o Mono Q, de 1 mL (GE Healthcare). Las cromatografías se realizaron en un equipo de FPLC. La elución se realizó aumentando la fuerza iónica de manera lineal, de 0 a 0.5 M de NaCl en el mismo amortiguador, en 20 min, a un flujo de 1 mL/min. Durante la elución, la presencia de proteína se siguió mediante el registro de la absorbancia a 280 nm.

3.2.3. Producción de *EgKU-1*, *EgKU-3* y *EgKU-4* recombinantes

EgKU-1, *EgKU-3* y *EgKU-4* fueron expresados como proteínas recombinantes en la cepa BL21 (DE3) pLysS de *E. coli*, transformada con el plásmido pET28a+ con el inserto de interés. Este plásmido permite la expresión de la proteína bajo el control del promotor T7 y confiere resistencia a la kanamicina. Las construcciones para las proteínas recombinantes presentan fusionada a la secuencia del dominio Kunitz, una secuencia que codifica para una extensión amino-terminal de 30 aminoácidos correspondiente a un tándem de 6 histidinas (Hisx6) que se utiliza luego para la purificación. Entre la secuencia de la proteína recombinante y el Hisx6 se expresa la secuencia de corte para la trombina. En el laboratorio contábamos con construcciones para *EgKU-1* (preparado por la Dra. Silvia González), *EgKU-3* (preparado por la Dra. Mariana Margenat) y *EgKU-4* (preparado por el Dr. Martín Fló). En la Figura 15 se muestra la secuencia de aminoácidos de cada una de estas construcciones.

EgKU-1

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGMGSRADICNLKIERGTQSHIKVYGYNR
KKGHCEHFYISGCGGNANRFNDRSECKRVCGNP

PM: 10.143 KDa, PI: 9.58

Luego del corte con trombina:

PM: 8.398 KDa, PI: 9.42

EgKU-3

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGMGSRIDPCKQPICAGMCLGYFPKWGM
NQETGQCEEFYGGCGGNMNOFDSKEQCELLCGR

PM: 9.905 KDa, PI: 6.63

EgKU-4

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGMGSRVNICNLPIEKGQCRSRVKVIGYNP
SKGSCERFTYSGCGGNRFRKHKRDCRKRICGKSSQKKKH

PM: 10.832 KDa, PI: 10.36

Luego del corte con trombina:

PM: 8.881 KDa, PI: 10.19

Figura 15. Secuencias de aminoácidos de los inhibidores Kunitz recombinantes producidos en *E. coli*. En azul, amarillo y verde, se muestra la extensión peptídica agregada por el plásmido pET28a+; se resalta en amarillo el tándem de histidinas y en verde el/los sitio/s de corte de la trombina. Le sigue la secuencia correspondiente a la proteína Kunitz, dentro de la cual se resaltan los residuos de cisteína en violeta y el sitio P1 en rojo. Se subrayan las secuencias de aminoácidos de los inhibidores Kunitz obtenidos al final de la producción; estas corresponden, para *EgKU-1* y *EgKU-4*, al producto luego de tratar con trombina, y para *EgKU-3*, al producto de fusión sin cortar.

Para cada construcción, las bacterias se crecieron en 2 pre-cultivos de 3 mL cada uno en medio líquido 2YT con kanamicina 30 µg/mL, a 220 rpm y 37°C (condiciones que se repitieron durante toda la producción), durante toda la noche. Estos pre-cultivos se utilizaron para inocular 2 matraces de 800 mL cada uno. Cuando el cultivo presentaba una absorbancia a 600 nm entre 0.8 y 1.0 se indujo la expresión con 1 mM de IPTG durante cuatro horas. Se rompieron las bacterias por presión y se procedió a realizar una IMAC, luego de la cual se obtuvieron las proteínas Kunitz en las fracciones eluídas con el gradiente de imidazol (ver Sección 3.2.2.2).

En la Figura 16 se muestra el análisis por SDS-PAGE de las fracciones eluídas durante la cromatografía de afinidad sobre IMAC de *EgKU-1*, *EgKU-3* y *EgKU-4*.

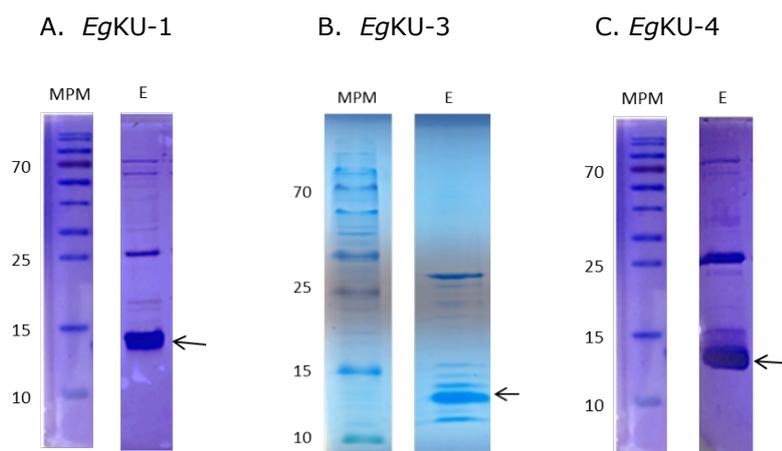


Figura 16. SDS-PAGE de las fracciones eluídas de la purificación de A. *EgKU-1*, B. *EgKU-3*, y C. *EgKU-4*, por cromatografía de afinidad. Los geles de 15% p/v de acrilamida fueron sembrados con: MPM, marcador de peso molecular (KDa); E, fracción eluída con el gradiente de imidazol. Se señalan con flechas las bandas correspondientes a las proteínas *EgKU*.

Las fracciones que contenían a *EgKU-1* y *EgKU-4* fueron tratadas con trombina comercial (1 U por mg de proteína de fusión), a 4°C, durante toda la noche, para mejorar la solubilidad de las proteínas recombinantes. La reacción se detuvo con 100 µM de PMSF. Dado que *EgKU-3* tiene un sitio de corte para la trombina adicional dentro del dominio Kunitz, no fue tratado con la proteasa. Antecedentes del grupo indican que el *tag* de histidinas no interfiere con la actividad inhibidora de proteasas de los inhibidores Kunitz. Luego del corte con trombina se llevaron las preparaciones, por diálisis, a amortiguadores adecuados para intercambio iónico.

En la Figura 17 se muestra el análisis por SDS-PAGE del perfil de elución de *EgKU-1*, *EgKU-3* y *EgKU-4* durante los pasos de intercambio iónico.

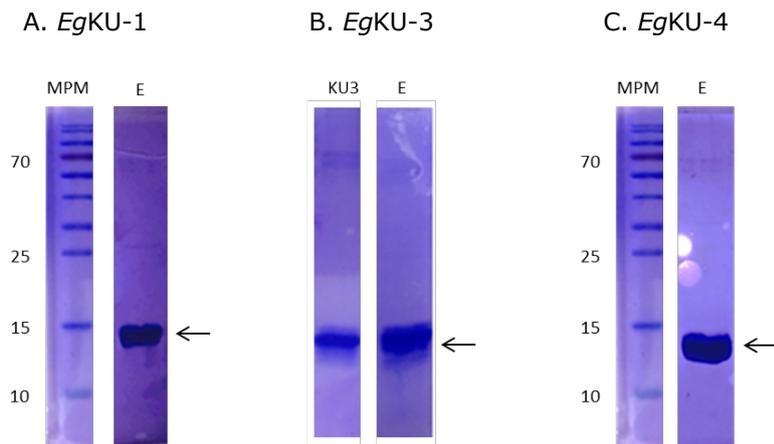


Figura 17. SDS-PAGE del perfil de purificación de A. *EgKU-1*, B. *EgKU-3* y C. *EgKU-4*, por cromatografía de intercambio iónico. Los geles de 15% p/v de acrilamida fueron sembrados con: MPM, Marcador de peso molecular (KDa); KU3, se sembró una preparación de *EgKU-3* pura disponible en el laboratorio, como referencia; FNU, fracción no unida a la columna; E, fracciones eluidas con el gradiente de NaCl. Se señala con flechas las bandas correspondientes a las proteínas *EgKU* y se indican con un recuadro las fracciones seleccionadas para los ensayos con células realizados en esta Tesis.

Finalmente las fracciones seleccionadas fueron sometidas a gel filtración en columnas PD10 para cambiar el amortiguador de elución por los amortiguadores de trabajo: Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, pH 7.4 (amortiguador PBS) para *EgKU-4* y *EgKU-1* y el mismo amortiguador ajustado a pH 8.6 para *EgKU-3*; ambos amortiguadores fueron preparados con agua para inyectables, con antibiótico/antimicótico (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin y 0.25 µg/mL de anfotericina B, Sigma #P3539), y filtrados en por 0.22 µm. Las preparaciones finales fueron filtradas por 0.22 µm en cámara de flujo y almacenadas a 4°C. Se determinó la concentración de proteína de las preparaciones finales por absorbancia a 280 nm, medida en un espectrofotómetro de gotas (NanoDrop 1000, Thermo Scientific), por triplicado, y se verificó la identidad de las proteínas por espectrometría de masas. Se obtuvieron aproximadamente 0.9 mg *EgKU-1*, 0.5 mg *EgKU-3* y 0.6 mg de *EgKU-4*, por litro de cultivo bacteriano.

3.2.4. Producción de *EgKU-9* y *EgKU-2* recombinantes

3.2.4.1. Clonado de las secuencias en los vectores de expresión

EgKU-9 no había sido expresada por nuestro grupo, pero antecedentes en de otro grupo indicaban que se expresaba en *E. coli*¹⁷¹. Se optó entonces por su expresión en *E. coli*, tanto en forma acoplada a proteínas de fusión como en forma libre, ya que había sido expresada en este sistema por otro grupo¹⁷¹. Como se explicó en la Introducción, *EgKU-2* no se había logrado expresar en forma soluble en cantidades significativas en *E. coli*^{167, 170}. Dados los antecedentes de nuestro grupo, se optó por intentar la expresión de *EgKU-2* en *E. coli* acoplada a proteínas de fusión, y como estrategia alternativa, ensayar su expresión en *Drosophila melanogaster*¹⁷⁵.

Las secuencias de *EgKU-9L* y *EgKU-2* fueron sintetizadas por la empresa *GenScript*. *EgKU-9L* para su expresión en *E. coli* y *EgKU-2* fue optimizado para ser expresado en *D. melanogaster*. *EgKU-9C* se obtuvo por PCR a partir de la secuencia de *EgKU-*

9L. Las correspondientes secuencias fueron clonadas en vectores diseñados por Correa y colaboradores ¹⁷⁶ a partir de modificaciones realizadas sobre el vector pQE80L, vector comercial utilizado frecuentemente para la expresión en *E. coli*, y a partir del vector pMT/BiP/V5-His, utilizado frecuentemente para la expresión en *D. melanogaster*. Para el clonado se utilizaron cebadores genéricos (cebador genérico reverso y cebador genérico directo), que se encontraban codificados en el vector de expresión, en el sitio de expresión asociado al promotor, flanquando la secuencia codificante para la proteína GFP (del inglés *green fluorescent protein*), y en el vector proporcionado por *GenScript*, en el cual flanqueaban la secuencia de la proteína Kunitz. Este sistema consiste entonces en una batería de vectores y cebadores genéricos asociados que permiten el clonado de la secuencia de interés sin necesidad de usar enzimas de restricción (*restriction free (RF) cloning*), y la expresión asociada a distintas proteínas de fusión para buscar mejorar la solubilidad y eficiencia, y asociada a distintos *tags* para su fácil purificación ^{176, 177}. El uso de este sistema fue de suma importancia para cumplir con este objetivo de la maestría, ya que de manera sencilla logramos evaluar una serie de condiciones asociadas a la expresión de varias proteínas.

Al final del cebador genérico directo se encontraba codificado el sitio de corte para la proteasa TEV, lo que permitía separar a la proteína Kunitz de la proteína de fusión y/o del *tag* mediante corte con esta proteasa. En el vector proporcionado por *GenScript*, en el extremo 3' del cebador genérico reverso se agregó el codón de terminación o *stop* "TAA" para indicar el fin de la traducción, inmediatamente después de la secuencia de la proteína Kunitz.

En la Figura 18 se muestran las secuencias de aminoácidos de *EgKU-9L*, *EgKU-9C* y *EgKU-2* recombinantes que se esperaban obtener como productos finales.

EgKU-9L

SVEYGCNSGEEDVCNLPMRTGPCLAYFRVWGYNRALDRCESFIYGGCGGNANRFKEKKECER
ACVKNLHL

PM: 7.929 KDa, PI: 7.51

EgKU-9C

SEEDVCNLPMRTGPCLAYFRVWGYNRALDRCESFIYGGCGGNANRFKEKKECERACVKNLHL

PM: 7.120 KDa, PI: 8.26

EgKU-2

SFNNFEVPLCRPQLQTANCWYYRPNYVYNHLLDRCIWSSCNSKLNFSKTRRECELICL
GRRRRSSPRLQESDEYYSQGFYGEVPQKRRYWPYEVHPID

PM: 12.351 KDa, PI: 8.80

Figura 18. Secuencias de aminoácidos de *EgKU-9L*, *EgKU-9C* y *EgKU-2* recombinantes. En rojo se señala el residuo de serina que forma parte del cebador genérico directo y queda en la proteína luego del corte con la proteasa TEV, si bien no forma parte del dominio Kunitz. Se subraya la secuencia de 8 residuos de *EgKU-9L* que están ausentes en *EgKU-9C*.

A continuación se detallan las características de los vectores y el procedimiento llevado a cabo para clonar las secuencias de las proteínas Kunitz en sus correspondientes vectores de expresión.

Como se mencionó, en primer lugar, el dominio Kunitz se sintetizó flanqueado de secuencias correspondientes a los cebadores genéricos. Entre la secuencia Kunitz y el cebador genérico reverso se agregó el codón de terminación "TAA" (Figura 19).



Figura 19. Representación esquemática del vector proporcionado por GenScript. CD, cebador genérico directo; KU2, *EgKU-2*; KU9L, *EgKU-9L*; CR, cebador genérico reverso. La construcción no se representa a escala.

Para la expresión en *E. coli* se emplearon vectores que permitían la expresión del dominio Kunitz como fusión carboxilo-terminal a la proteína MBP (del inglés *maltose binding protein*) o a la proteína DsbC (del inglés *disulfide bond isomerase C*), seguido de un tándem de 6 histidinas (Hisx6), bajo el promotor T5 (Figura 20).



Figura 20. Representación esquemática de las construcciones utilizadas para la expresión de *EgKU-9/EgKU-2* en *E. coli*. Hisx6, tándem de 6 histidinas; MBP/DsbC, proteína de unión a maltosa o disulfuro isomerasa C; CD, cebador genérico directo; GFP, proteína verde fluorescente; CR, cebador genérico reverso.

Para la expresión en *D. melanogaster*, *EgKU-2* se clonó en un vector que permitía la expresión como fusión carboxilo-terminal a dos *tags* en tándem con afinidad por la streptavidina (*Strep-Tagx2*) y a la secuencia de secreción BiP correspondiente al péptido señal de la proteína de estrés término HSP72 (del inglés *heat shock protein 72*) de *D. melanogaster* (Figura 21). El péptido codificado por la secuencia BiP conduce a las proteínas a la vía secretoria, por lo que la proteína recombinante se obtiene en el sobrenadante del cultivo, lo que facilita su purificación. La secuencia BiP es cortada por la maquinaria celular antes que la proteína sea secretada¹⁷⁸. En el sistema utilizado, la proteína recombinante se expresa bajo el control del promotor de la metalotioneína, lo que permite inducir la expresión por agregado de CdCl₂¹⁷⁹.



Figura 21. Representación esquemática de la construcción empleada para la expresión de *EgKU-2* en *D. melanogaster*. BiP, péptido señal para la exportación fuera de la célula; Strep-Tagx2, péptido con afinidad por la streptavidina; CD, cebador genérico directo; GFP, proteína verde fluorescente; CR, cebador genérico reverso.

Como se mencionó anteriormente, el clonado de las secuencias en los vectores de expresión se realizó por *RF cloning*. Para esto se realizó una primera PCR para amplificar la secuencia de ADN de la proteína Kunitz acoplada a los cebadores genéricos, a partir del vector proporcionado por *GenScript*, utilizando los cebadores genéricos (en verde y naranja en la Figura 22 A). Este paso se aplicó para *EgKU-9L*, *EgKU-9C* y *EgKU-2*, con una pequeña variante en el caso de *EgKU-9C*. En efecto, para obtener la secuencia de *EgKU-9C* se diseñó y se mandó a sintetizar un cebador directo al cual nombramos como "cebador directo *EgKU-9C*" formado por la secuencia del cebador genérico directo y las primeras 24 bases (1-24) nucleotídicas de la secuencia codificante para *EgKU-9C*, que corresponden a los nucleótidos 25 a 49 de *EgKU-9L*. Se realizó una PCR a partir del vector de *EgKU-9L* proporcionado por *GenScript* utilizando el cebador directo *EgKU-9C* (en verde y celeste en la Figura 22 B) y el cebador reverso genérico (en naranja en la Figura 22 B). En el vector de *EgKU-9L* proporcionado por *GenScript*, el cebador directo *EgKU-9C* hibrida con el cebador directo genérico y con los nucleótidos 25-49 de *EgKU-9L*, pero no con los nucleótidos 1-24 (en violeta en la Figura 22 B), que no forman parte de la secuencia de *EgKU-9C*. De esta manera se obtiene como producto de amplificación a la secuencia de *EgKU-9C* flanqueada por los cebadores genéricos.

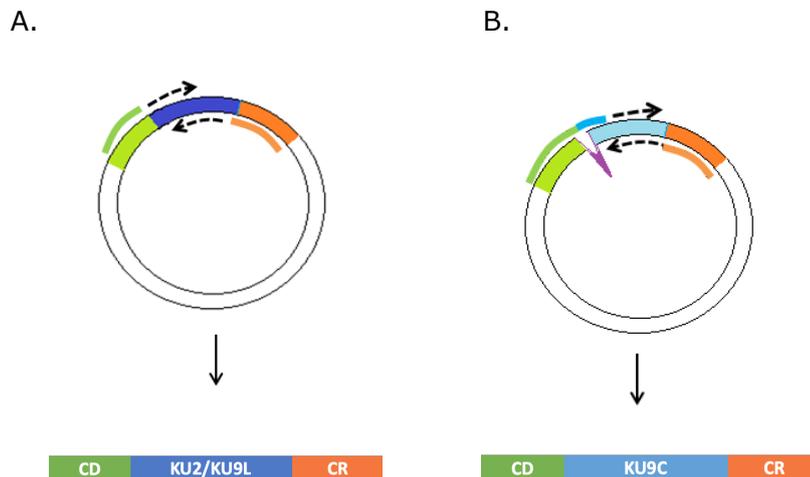


Figura 22. Esquema explicativo de la primera PCR. CD, cebador genérico directo; KU2, *EgKU-2*; KU9L, *EgKU-9L*; KU9C, *EgKU-9C*; CR, cebador genérico reverso. A. Estrategia empleada para *EgKU-2* y *EgKU-9L*. B. Estrategia empleada para *EgKU-9C*. Se indica en color violeta la secuencia ausente en *EgKU-9C* que resulta eliminada en el paso de PCR.

Los productos de las PCR se corrieron en geles de agarosa a partir de los cuales se purificaron los fragmentos de ADN amplificados.

Se realizó una segunda PCR en la cual la secuencia obtenida en la primera PCR se utilizó como cebador y el vector de expresión donde se quería insertar la secuencia de la proteína Kunitz se usó como molde (Figura 23).

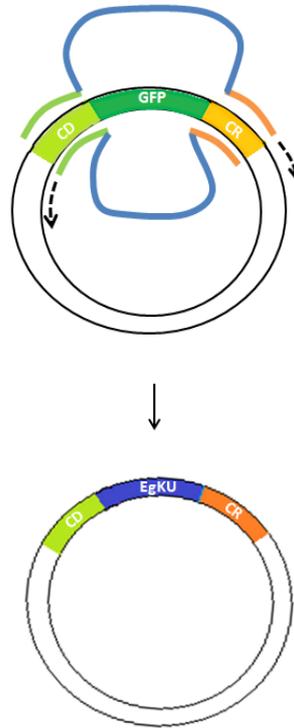


Figura 23. Esquema explicativo de la segunda PCR. CD, cebador genérico directo; GFP, proteína verde fluorescente; CR, cebador genérico reverso.

De esta manera se obtuvieron como productos de este segundo paso de PCR tres variantes del vector de expresión que codifican para *EgKU-9L*, *EgKU-9C* y *EgKU-2*. Los productos se trataron con la enzima Dpn1 (New England BioLabs) en concentración 1500 U/mL durante 2 horas a 37°C para destruir el plásmido parental metilado.

Con los productos del segundo paso de PCR se transformaron bacterias *E. coli* XL1 y se sembraron en medio LB agar con ampicilina. Dado que el vector de expresión confiere resistencia a la ampicilina, en presencia de este antibiótico se esperaba que solo crecieran bacterias transformadas. En este paso la secuencia del dominio Kunitz se inserta en el vector reemplazando la secuencia que codifica para la proteína GFP, lo que nos permitió distinguir en primera instancia las bacterias transformadas con el vector de expresión codificante para la GFP (colonias verdes), de las bacterias transformadas con el vector codificante para las proteínas Kunitz (colonias blancas), observando las colonias con luz ultravioleta.

A continuación, para corroborar que estas colonias estaban efectivamente transformadas con el vector de expresión que contenía el inserto, se realizó un

tercer paso de PCR utilizando los cebadores genéricos y, como molde, colonias blancas seleccionadas en el paso anterior. El resultado de esta PCR se corrió en un gel de agarosa (ver Sección 4.1.1 de Resultados y Discusión).

Las bacterias transformadas con los vectores para la expresión en *E. coli* se crecieron en 5 mL de medio líquido LB ampicilina toda la noche y se extrajo el ADN plasmídico mediante una *miniprep*, utilizando el kit *PureLink Quick Plasmid Miniprep* de Invitrogen. Las bacterias transformadas con los vectores para la expresión en *D. melanogaster* se crecieron en 50 mL de medio líquido LB ampicilina toda la noche y se extrajo el ADN plasmídico mediante una *midiprep*, utilizando el *QIAfilter Plasmid Midi Kit* de Qiagen.

Se midió la concentración de los plásmidos por triplicado en un espectrofotómetro de gotas, a partir de la absorbancia a 260 nm. Se verificó la secuencia por secuenciación.

3.2.4.2. Expresión y purificación de EgKU-9 y EgKU-2 en *E. coli*

Se transformaron bacterias *E. coli* BL21 (DE3) pLysS con los vectores de expresión correspondientes (ver Sección 3.2.2.1). Se plaquearon en medio LB agar, con ampicilina 30 µg/mL, y se dejaron crecer a 37°C durante toda la noche. Al otro día se realizaron pre-cultivos de 3 mL en medio líquido LB ampicilina que se crecieron a 37°C y agitación a 220 rpm (condiciones que se repetirán durante todo el tiempo de la producción), durante toda la noche. Con estos pre-cultivos se inocularon matraces de 200 mL en medio 2YT, ampicilina 30 µg/mL, que se crecieron hasta alcanzar una absorbancia a 600 nm de 1, y se indujo la expresión de la proteína recombinante con 1 mM de IPTG, durante 4 horas.

Luego de romper las bacterias mediante bomba de presión, la proteína se purificó a partir de la fracción soluble. Se realizaron dos pasos de purificación por IMAC (ver Sección 3.2.2.2), con un paso intermedio de corte con la proteasa TEV (producida de manera recombinante en el laboratorio fusionada a un *tag* de histidinas) en condiciones de diálisis contra amortiguador TEV (Tris 50 mM, NaCl 300 mM, DTT 0.5 M, pH 8).

Luego de la segunda IMAC, la fracción que contenía la proteína recombinante se sometió a gel filtración en columna PD10 para cambiar el amortiguador empleado en la IMAC a un amortiguador adecuado para el intercambio iónico. A continuación se realizó un intercambio iónico (ver Sección 3.2.2.3).

La fracción enriquecida en cada proteína de interés fue sometida a gel filtración en columnas PD10 para cambiar el amortiguador de elución por el correspondiente de trabajo: Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, pH 8.5 para EgKU-9L y el mismo amortiguador a pH 7.3 para EgKU-9C. Ambos amortiguadores fueron preparados con agua para inyectables, con antibiótico/antimicótico, y filtrados en por 0.22 µm. Las preparaciones finales fueron filtradas por 0.22 µm en cámara de flujo y almacenadas a 4°C. La concentración de proteína en las preparaciones fue determinada por absorbancia a 280 nM y se verificó la identidad por espectrometría de masas.

Durante los ensayos de expresión, la presencia de los inhibidores Kunitz en las distintas fracciones fue verificada por SDS-PAGE y por actividad de inhibición de quimotripsina (ver Sección 3.3).

3.2.4.3. Expresión y purificación de EgKU-2 en la línea celular S2 de *D. melanogaster*

Las células S2 de *D. melanogaster* estaban disponibles en el Laboratorio de Inmunovirología del Instituto Pasteur de Montevideo. Una vez descongeladas a temperatura ambiente, las células S2 fueron cultivadas en frascos de cultivo celular en medio Schneider completo: medio Schneider (Gibco #21720-024), streptomycin 50 µg/mL, penicilina 50 U/mL, y FBS 10% v/v, e incubadas a 28°C, sin agregado de CO₂ (las condiciones de incubación se mantuvieron durante todo el cultivo).

Una vez que las células se habían recuperado, el cultivo se llevó a una concentración de entre 1 x 10⁶ y 2.5 x 10⁶ células/mL, y se procedió a la transfección. Las células fueron transfectadas con 2 µg de plásmido de expresión y 0.1 µg de plásmido de selección pCoPURO (Invitrogen), que confiere resistencia a la puromicina, utilizando el *kit* para transfección de células eucariotas *Effectene Transfection Reagent* de Qiagen, siguiendo el protocolo proporcionado por la empresa.

Luego de la transfección comenzó la adaptación a la ausencia de suero, y el enriquecimiento en células transfectadas mediante el agregado de puromicina, antibiótico de selección. Para esto, se fue aumentando gradualmente la dosis de medio Xpress completo: medio Xpress (Lonza #BE12-730Q) suplementado con streptomycin 50 µg/mL, penicilina 50 U/mL y puromicina 6 µg/mL, en ausencia completa de suero, y disminuyendo la concentración de medio Schneider completo. A su vez se expandió el cultivo por pasajes 1:2 o 1:3 cada tres días o cuatro días.

Cuatro semanas luego de la transfección el cultivo se encuentra enriquecido en células que incorporaron el plásmido ¹⁷⁵. Antes de inducir la expresión de la proteína se verificó que las células efectivamente se hubieran transfectado. Para esto se tomaron 2 mL del cultivo y se cosecharon las células por centrifugación a 350 g durante 10 minutos, y se utilizaron como molde en una PCR utilizando los cebadores genéricos. Se realizó en paralelo una reacción control en la que se empleó como molde el sobrenadante de centrifugación, a fin de verificar que se estuviera amplificando plásmido efectivamente incorporado a las células, y no plásmido todavía presente en el medio de cultivo. Además se hizo una reacción de control positivo en la que se empleó como molde el vector de expresión para EgKU-2.

Se pasó el cultivo a un matraz, llevando la concentración de células a 3.5 x 10⁶ células/mL y se incubó a una velocidad de agitación de entre 20 y 40 rpm, durante 10 días, en los cuales se expandió el cultivo por agregado de medio Xpress completo, cada 2 o 3 días. Pasados los 10 días, el cultivo se llevó a 7.5 x 10⁶ células/mL y se indujo la expresión de la proteína con 5 µM de CdCl₂. La proteína se expresó durante 10 días. El tercer día luego de la inducción se agregó 20 mL de medio Xpress completo con 5 µM CdCl₂.

El día 10 pos-inducción se cosechó el sobrenadante del cultivo por centrifugación durante 20 minutos a 6000 g. El pH fue ajustado a 8.0, con el agregado de amortiguador Tris 1 M pH 9.6 a razón a 1 mL cada 120 mL de sobrenadante, y se almacenó el sobrenadante a -20°C durante toda la noche. El aumento en el pH causa la precipitación de componentes no proteicos del medio de cultivo. Al día siguiente se agregó *Bioblock (Iba Life sciences)* a una concentración de 2.4 mL/L de sobrenadante. La avidina presente en esta solución interactúa con la biotina presente en el sobrenadante formando un precipitado. Ambos precipitados fueron eliminados por centrifugación a 11000 g durante 30 minutos, y por filtrado por 0.22 µm. La eliminación de la biotina presente en el sobrenadante del cultivo evita la competencia de la biotina con el *StrepTagx2* de la proteína recombinante, por la streptavidina de la columna empleada en el paso de purificación siguiente. Es importante mencionar que la avidina no interacciona con el *Strep-Tagx2*.

Se realizó un primer paso de purificación por cromatografía de afinidad utilizando una columna *Strep-Tactin XT de 1 mL (Iba Life sciences)*, que fue equilibrada con amortiguador *Strep-Tactin*: Tris 100 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, pH 8. La proteína se eluyó con 5 mL de 25 mM de biotina en amortiguador *Strep-tactin*. La columna se regeneró con 0.5 M NaOH.

A la fracción eluida con biotina, que contenía a la proteína Kunitz, se la trató con la proteasa TEV en una diálisis en amortiguador TEV, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se sometió a gel filtración en columna PD10 para cambiar el amortiguador TEV a amortiguador *Strep-Tactin* y se realizó un segundo paso de purificación por afinidad con columna *Strep-Tactin XT*. Las fracciones que parecían contener a *EgKU-2* se mezclaron y la mezcla se sometió a gel filtración en columna PD10 para cambiar el amortiguador a un amortiguador adecuado para el intercambio iónico a pH 7.8. A continuación se realizó un intercambio catiónico (ver Sección 3.2.2.3).

La purificación se siguió por SDS-PAGE, actividad de inhibición de quimotripsina, y espectrometría de masas.

3.3. Ensayos cinéticos

Para los ensayos de inhibición de proteasas de serina digestivas se emplearon los siguientes sustratos fluorogénicos: N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC (para los ensayos con quimotripsina), N-BOC-Ile-Glu-Gly-Arg-AMC (tripsina) y N- Suc-Ala-Ala-Ala-AMC (elastasa). La intensidad de fluorescencia de estos compuestos aumenta como resultado de la liberación de su parte peptídica catalizada por las proteasas. Las medidas de actividad enzimática se realizaron en condiciones de velocidad inicial, a 37 °C. Los experimentos se llevaron a cabo a pH 8.0, que es el utilizado habitualmente para enzimas de este tipo. Las diluciones de las enzimas, los sustratos y los inhibidores fueron preparadas en Tris-HCl 50 mM, pH 8, 0.01% v/v Tritón X-100. Los ensayos se realizaron en microplacas negras para fluorimetría de 96 pocillos (Costar, Corning Life Sciences, EUA), en un volumen final de 200 µl. Los cambios de intensidad de fluorescencia, medidos en una longitud de onda de excitación de 390 nm y una de emisión de 460 nm, fueron registrados en un fluorímetro para microplacas (FLUOstarOPTIMA, BMG Labtechnologies, Offenburg, Alemania).

Las velocidades de hidrólisis de los sustratos se calcularon a partir de los gráficos de formación de AMC vs tiempo. Estos gráficos conforman una recta, cuya pendiente es el valor de velocidad inicial de la reacción de hidrólisis. La concentración de AMC formado se calculó a partir de una curva de calibración de fluorescencia en función de concentraciones crecientes de AMC. Las curvas de calibración se realizaron cada vez que se realizaba un experimento.

Los parámetros cinéticos de las tripsinas y quimotripsinas para estos sustratos son: $K_M = 85 \pm 9 \mu\text{M}$ y $k_{\text{cat}} = 50 \pm 6 \text{ s}^{-1}$ para la tripsina catiónica bovina; $K_M = 39 \pm 2 \mu\text{M}$ para las quimotripsinas caninas (no contamos con el valor de k_{cat}) y $K_M = 30 \pm 2 \mu\text{M}$ y $k_{\text{cat}} = 19 \pm 2 \text{ s}^{-1}$ para la quimotripsina- α bovina. Estos valores fueron determinados previamente por el Dr. Martín Fló¹⁶⁷. No disponemos de valores para la elastasa porcina.

La concentración molar activa de las quimotripsinas y la tripsina fue determinada anteriormente por miembros del grupo¹⁸⁰, mediante experimentos de titulación con inhibidores específicos que se unen al sitio activo de las enzimas en una relación casi estequiométrica de uno a uno, formando complejos muy estables. Se utilizó el inhibidor competitivo de alta afinidad BPTI en el caso de la tripsina y de la quimotripsina- α . Para las quimotripsinas caninas se utilizó *EgKU-3*. La elastasa no fue titulada por no contarse con un inhibidor de alta afinidad para esta enzima, por lo que se supuso que toda la enzima estaba activa.

3.3.1. Determinación de constantes de inhibición

Con el objetivo de determinar las constantes globales de inhibición (K_I^*) de *EgKU-9* sobre las distintas proteasas de serina digestivas, se analizó la velocidad inicial de hidrólisis del sustrato, en presencia de concentraciones crecientes del correspondiente inhibidor. Así, se incubaron concentraciones crecientes del inhibidor con enzima durante 15 minutos, para alcanzar el equilibrio de unión entre enzima e inhibidor, e inmediatamente antes de empezar a medir se agregó sustrato en exceso (5 μM). Para los ensayos con quimotripsina se utilizó 1 nM de enzima, y de 0 a 3 nM de inhibidor para la quimotripsina- α bovina, y de 0 a 20 nM para las quimotripsinas caninas. Para los ensayos con tripsina catiónica bovina se utilizó 0.3 nM de enzima y de 0 a 1 nM de inhibidor. Para los ensayos con elastasa porcina se utilizó 38 nM de enzima (estimado) y de 0 a 200 nM de inhibidor.

Las constantes de inhibición aparente (K_{Iap}^*) fueron determinadas a partir del ajuste de la ecuación de Morrison para inhibidores de alta afinidad (Ecuación 4)^{111, 112}, ya dada en la Introducción, pero que para facilitar la lectura se repite aquí:

$$\text{Ecuación 4} \quad v_i = \frac{v_o}{2[E]} \left\{ ([E] - [I] - K_{Iap}^*) + \sqrt{([I] + K_{Iap}^* - [E])^2 + 4K_{Iap}^*[E]} \right\}$$

Las K_i^* se obtuvieron a partir de la corrección de las K_{Iap}^* de acuerdo a la Ecuación 2 para inhibidores competitivos (también dada en la introducción)^{111, 112}.

Ecuación 2

$$K_I^* = \frac{K_{Iap}^*}{1 + \frac{[S]}{K_M}}$$

Donde [S] es la concentración total de sustrato, en nuestro caso 5 μM , y K_M es la constante de Michaelis-Menten para la reacción entre el sustrato y la enzima.

En nuestras condiciones de trabajo, la concentración de sustrato (5 μM) era al menos 6 veces menor que el de las K_M de quimotripsinas y la tripsina, por lo que, según la Ecuación 2, los valores de K_I^* resultan muy similares a los de K_{Iap}^* .

3.3.2. Estudio del mecanismo de inhibición de la quimotripsina- α bovina por EgKU-9.

Para estudiar el mecanismo de inhibición de la quimotripsina por EgKU-9 y obtener constantes cinéticas, realizamos el análisis de los cursos temporales de formación de producto en presencia de concentraciones variables de inhibidor, incubando primero el inhibidor con un exceso de sustrato (5 μM) y luego agregando enzima (1 nM), justo antes de comenzar a medir. De esta manera, si el inhibidor es lento, se observa la formación de producto a medida que la enzima se va uniendo al inhibidor, por lo que los gráficos de los cursos temporales inicialmente muestran un cambio de la pendiente en el tiempo, que es seguido por la estabilización en el valor de la pendiente, una vez que se alcanza el equilibrio entre la enzima y el inhibidor.

Los cursos temporales se ajustaron utilizando la ecuación exponencial más recta que describe el establecimiento del equilibrio entre la enzima y el inhibidor (Ecuación 7) ¹¹⁰.

Ecuación 7

$$P = v_i t + \frac{(v_o - v_i)(1 - e^{k_{obs}t})}{k_{obs}}$$

Donde P es la concentración de AMC producido por la hidrólisis del sustrato, v_o es la velocidad inicial, v_i es la velocidad una vez alcanzado el equilibrio enzima - inhibidor y k_{obs} representa la constante exponencial aparente de pseudo primer orden.

Se determinaron entonces constantes exponenciales (k_{obs}) para diferentes concentraciones de inhibidor.

Dado que los resultados mostraron que el mecanismo de inhibición involucraba dos pasos reversibles consecutivos con el primero rápido en relación al segundo (Esquema 4), k_{obs} vs [I] se ajustó a la ecuación hiperbólica 8:

Ecuación 8

$$k_{obs} = k_{-2} + \frac{k_2[I]}{[I] + K_I \left(1 + \frac{[S]}{K_M}\right)}$$

Las constantes k_2 , k_{-2} y K_I fueron determinadas a partir del ajuste a la Ecuación 8. Como la k_{-2} es muy pequeña no la pudimos determinar de este ajuste, por lo que la calculamos a partir de la Ecuación 9 ¹¹⁰:

$$\text{Ecuación 9} \quad k_{-2} = k_{obs} \frac{v_i}{v_o}$$

Los valores de k_2 , k_{-2} y K_I permitieron corroborar el valor de K_i^* a partir de la Ecuación 10 ¹¹⁰:

$$\text{Ecuación 10} \quad K_i^* = K_i \frac{k_{-2}}{k_2 + k_{-2}}$$

3.4. Ensayos inmunológicos con BMDM

3.4.1. Procedimientos y técnicas generales

3.4.1.1. Cultivo celular de BMDM

El protocolo descrito a continuación fue reportado por Lutz *et al.* ¹⁸¹ y su uso fue aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA), N° 101900-000213-18.

Se obtuvieron macrófagos derivados de médula ósea (BMDM, del inglés *bone marrow-derived macrophages*) de ratones C57BL/6, hembras, de 8 a 10 semanas provenientes del bioterio del Instituto Pasteur de Montevideo. Los procedimientos descritos a continuación se realizaron en cámara de flujo laminar con material estéril y empleando agua para inyectables para la preparación de las soluciones. Se extrajo médula ósea de fémures y tibias y los precursores fueron diferenciados durante 7 días en placas de Petri con 15 mL de medio completo: medio de cultivo DMEM (Sigma #D5523) de baja concentración de glucosa (1 g/L), suplementado con 3.7 g/L de bicarbonato de sodio (Applichem #A0384) y antibiótico/antimicótico (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 0.25 µg/mL de anfotericina B), en presencia del factor de diferenciación de macrófagos, M-CSF (del inglés *macrophage colony-stimulating factor*), obtenido como sobrenadante de cultivo de la línea celular L929, previamente titulado y agregado en dilución 5% v/v, y 10% v/v suero fetal bovino (SFB). Las placas se mantuvieron en incubador a 37°C con atmósfera 5% v/v CO₂ durante todo el tiempo de cultivo (de ahora en más, se supondrán estas condiciones de incubación a menos que se especifique lo contrario). Al día 5, día al cual los precursores que se van a diferenciar a macrófagos son células adherentes, se sacó totalmente el medio de las placas de Petri y se colocaron 15 mL de medio completo nuevo. Al día 7 se obtuvieron los BMDM quitando la totalidad del medio de las placas de Petri y despegando las células adherentes por pipeteo con solución amortiguadora de despegado: PBS 0.1% m/v glucosa, 3 mM EDTA. Las células obtenidas se sembraron en placas de

96 pocillos o 48 pocillos en medio de trabajo: DMEM suplementado con 3.7 g/L de bicarbonato de sodio y antibiótico/antimicótico, y 1% v/v SFB.

Con este método de preparación de BMDM se sembraron entre 5 y 7 millones de precursores por placa obteniéndose entre 7 y 10 millones de BMDM al día 7, lo que corresponde a 42 millones de BMDM por ratón, aproximadamente. Estas BMDM corresponden a células F4/80⁺ (marcador de macrófagos) en un 96 - 98%, según se midió por citometría de flujo.

3.4.1.2. Citometría de flujo

3.4.1.2.1. Marcado de componentes de superficie

Para la tinción de citometría, luego de retirar la placa del incubador y pasarla a hielo, se centrifugó a 350 g durante 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se despegaron los BMDM con solución amortiguadora de despegado. Las células se transfirieron a una placa de 96 pocillos de fondo en V, a razón de 0.1×10^6 células/pocillo, suponiendo un 50% de recuperación de las células adheridas a la placa. Una vez en la placa de tinción, las células se lavaron con 100 µL de solución amortiguadora para FACS: PBS 0.1% m/v seroalbúmina bovina (BSA), 2 mM EDTA, pH 7.1, por pocillo, centrifugando 350 g durante 5 minutos a 4°C. Luego de cada centrifugación, se descartó el sobrenadante por inversión de la placa y se disgregaron las células por pasaje de la placa por un agitador tipo vórtice.

Para medir viabilidad las células se incubaron con 10 µL de una solución 1/500 en PBS de la sonda del *kit Live/Dead Viability Assay* (Invitrogen), durante 10 minutos en oscuridad. Esta sonda tiene afinidad por las poliaminas. En las células muertas, cuya integridad de membrana se encuentra comprometida, la sonda se unirá a las poliaminas intracelulares además de a las de superficie, por lo que les conferirá una intensidad de fluorescencia mucho mayor. La unión sonda-poliamina es de carácter covalente y no se ve afectada por un eventual proceso de fijado y permeabilización posterior. Luego, se agregó 15 µL de amortiguador FACS conteniendo 15% v/v suero normal de rata, durante 20 minutos sobre hielo en oscuridad, a modo de bloqueo general, para evitar interacciones inespecíficas de los anticuerpos de la incubación siguiente con los receptores Fc presentes en las células u otras posibles interacciones. Posteriormente, las células se incubaron con 25 µL de una mezcla de anticuerpos conjugados a fluorocromos específicos para los antígenos de interés, diluidos en solución amortiguadora para FACS, como se especifica en la Tabla 3 durante 30 minutos sobre hielo y protegidas de la luz. En paralelo se realizaron los marcados con dos tipos de controles. Por un lado, los controles FMO (del inglés, *fluorescence minus one*), que corresponden al marcado de las células con todos los anticuerpos de la mezcla menos uno, siendo el FMO el control negativo para el análisis de esta marca. El uso del FMO elimina la contribución de la dispersión generada por la fluorescencia del resto de los anticuerpos de la mezcla en el canal de la marca que está siendo analizada. Se realiza un control FMO para cada marca cuyo nivel de expresión se quiera evaluar, no así para aquellas marcas que se utilicen para identificar la población celular de interés. Por otra parte, se realizaron los marcados simples, correspondiente a la incubación con un único anticuerpo, necesario para la compensación de colores en el citómetro.

Finalmente, se realizaron 2 lavados con 100 μ L de solución amortiguadora para FACS por pocillo, centrifugando a 350 g durante 5 minutos a 4°C cada vez. Las células se mantuvieron en 100 μ L de solución amortiguadora para FACS por pocillo sobre hielo hasta medir en el citómetro BD FACS Canto II (BD Biosciences).

3.4.1.2.2. Marcado de componentes nucleares

Para medir la BrdU incorporada en los experimentos de proliferación, por citometría de flujo, primero se marcaron los componentes de superficie, siguiendo los pasos detallados en la sección 3.4.1.2.1. Luego del segundo lavado posterior al marcado de los componentes de superficie, se fijaron las células, empleando 100 μ L por pocillo del fijador del *kit FoxP3 Staining Buffer Set* (eBioscience #00-5523-00), durante toda la noche a 4°C, en oscuridad. Se realizaron dos lavados con solución de Permeabilización/Lavado, y se incubó con 100 μ L por pocillo de solución ADNasa (SIGMA #D5025) 765000 unidades/mL en PBS, durante 30 minutos a 37°C y en oscuridad. La incubación con ADNasa rompe las hebras de ADN y permite que el anticuerpo anti-BrdU utilizado a continuación tenga acceso a las bases nucleotídicas. Se realizaron dos controles sin tratamiento con ADNasa, uno correspondiente a células sin tratar con ningún estímulo y otro a células estimuladas con M-CSF. Estos controles, en los cuales el anticuerpo anti-BrdU no tiene acceso al BrdU incorporado al ADN, fueron utilizados como marcado negativo, a partir del cual se definieron las células positivas para el BrdU.

A tiempo cumplido, se lavó la ADNasa con solución de Permeabilización/Lavado y se continuó incubando las células durante 30 minutos con 20 μ L de anticuerpo anti-BrdU conjugado a fluorocromo, diluido en solución de Permeabilización/Lavado como se especifica en la Tabla 3. La incubación se realizó a temperatura ambiente y en oscuridad. A tiempo cumplido, se realizaron dos lavados finales con solución de Permeabilización/Lavado. Las células se dejaron en 100 μ L de la misma solución, sobre hielo y protegidas de la luz, hasta el momento de medir.

Los datos obtenidos por citometría de flujo se analizaron utilizando el software FlowJo versión 7.6.

Marcado	Antígeno	Fluorocromo	Dilución	Marca # catálogo
Superficie	CD86	APC	1/100	eBiosciencias #17086282
	MHC II	PerCp	1/300	Biolegend #107624
	F4/80	PECy7	1/200	Invitrogen #25480182
Intranuclear	BrdU	APC	1 μ L/0.125x10 ⁶ Cél.	Invitrogen #17507142
Viabilidad	L/D	FitC	1/500	Life technologies #L23101
	L/D	APC	1/500	Life technologies #L10120

Tabla 3. Características de los anticuerpos utilizados durante el marcado para citometría de flujo. APC: alofocianina, PE: ficoeritrina, Cy7: cianina 7, FITC: isotiocianato de fluoresceína, PerCP: *Perinidin Chlorophyll Protein*. L/D: *live/dead*

3.4.1.3. Cuantificación de citoquinas en sobrenadantes por ELISA (del inglés, *enzyme-linked immunosorbent assay*).

Para estos ensayos se utilizaron placas de 96 pocillos Maxisorp (Thermo, #442404). En forma general, se incubó la placa con una dilución apropiada del anticuerpo de captura en la solución amortiguadora correspondiente, durante toda la noche a 4°C. Luego, se bloqueó con una solución de PBS 10% v/v SFB o PBS m/v 1% BSA durante al menos 1 hora a temperatura ambiente, para cubrir los sitios de unión en la placa no ocupados por el anticuerpo de captura. Lo siguiente fue colocar la muestra o una dilución seriada del estándar durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego, se incubó con una dilución apropiada del anticuerpo de detección conjugado a biotina en la solución amortiguadora correspondiente, y posteriormente con estreptavidina conjugada a la enzima peroxidasa. Después de cada incubación se realizaron lavados con PBS 0.05% m/v Tween-20. Finalmente, se reveló agregando 100 µL de una solución de tetrametilbencidina (TMB, Applichem #A3840) y H₂O₂. El desarrollo de color se detuvo por agregado de 50 µL de H₂SO₄ 0.5 M. Se midió absorbancia a 450 nm.

Las concentraciones de anticuerpos y estándares utilizados, así como los amortiguadores correspondientes para cada incubación, se detallan en la Tablas 4.

Anticuerpo de captura

Citoquina	Conc./porcillo	Dilución	Amortiguador	Marca #cat.
IL-6	*	1/250	0.1 M NaHCO ₃ pH 9.5	BD #555220
IL-10	*	1/250	0.2 M Na ₂ HPO ₄ pH 6.5	BD #555252
IL-12/23p40	*	1/500	0.2 M Na ₂ HPO ₄ pH 6.5	BD #551219

Estándar

Citoquina	Conc. inicial Estándar	Conc. inicial de la curva	Amortiguador	Marca #catálogo
IL-6	110 ng/mL	1 ng/mL	PBS 10% SFB	BD #555220
IL-10	95 ng/mL	2 ng/mL	PBS 10% SFB	BD #555252
IL-12/23p40	4 µg/mL	4 ng/mL	PBS 10% SFB	BD #5126616

Anticuerpo de detección

Citoquina	Conc./porcillo	Dilución	Amortiguador	Marca #catálogo
IL-6	*	1/250	PBS 10% SFB	BD #555220
IL-10	*	1/250	PBS 10% SFB	BD #555252
IL-12/23p40	*	1/1000	PBS 10% SFB	BL #505302

Tablas 4. Características de los anticuerpos y estándares utilizados en los ensayos de ELISA. * Información no aportada por el fabricante.

3.4.1.4. Ensayo de Griess

Este ensayo mide la presencia de nitritos (NO_2^-) en la muestra mediante la formación de un compuesto azo coloreado. El nivel de NO_2^- en la muestra, uno de los metabolitos del óxido nítrico (NO), se relaciona con la producción de NO.

El ensayo de Griess se basa en la reacción entre el NO_2^- y el ácido sulfanílico en condiciones ácidas, con el acople del ion diazonio resultante a α -naftilamina para dar un producto coloreado. Se preparó el reactivo de Griess (2.9 mL H_3PO_4 , 0.5 g sulfanilamida, 0.05 g naftilendiamina en 50 mL total de agua destilada) y una solución de nitrito para utilizar como estándar. Se mezclaron 50 μL del reactivo de Griess con 50 μL de la muestra o estándar en una placa de 96 pocillos. La placa se mantuvo en oscuridad durante 5 minutos y luego se midió la absorbancia a 540 nm.

3.4.2. Control de inhibidores Kunitz recombinantes, inhibidores comerciales y vehículos, en términos de inducción de citoquinas y nitritos en BMDM

Para evitar introducir errores en los experimentos realizados sobre BMDM debido a la posible presencia de cantidades significativas de endotoxinas u otros agonistas de TLR de origen bacteriano en las producciones de los inhibidores Kunitz recombinantes, así como en los inhibidores comerciales, se controlaron estas muestras en términos de inducción de citoquinas y nitritos en los BMDM. Para esto, se sembraron 0.2×10^6 BMDM por pocillo en medio de trabajo en placas de 96 pocillos de fondo plano (volumen final 200 μL). Se agregaron los *EgKUs*, inhibidores comerciales (en concentraciones entre 1 nM y 1 μM) y el vehículo en el que se encontraba cada estímulo (en diluciones correspondientes a las concentraciones de los *EgKUs* o inhibidores comerciales), en forma de mezcla en medio de trabajo. El cultivo se mantuvo en incubador durante 18 horas. A tiempo cumplido, se retiró la placa del incubador y se pasó a hielo. Se analizó el nivel de citoquinas (IL-12/23p40, IL-6 e IL-10) en el sobrenadante por ELISA, y el nivel de nitritos en sobrenadante por reacción de Griess.

3.4.3. Evaluación de los efectos de los inhibidores Kunitz sobre la respuesta de BMDM al LPS

Se sembraron 0.2×10^6 BMDM por pocillo en medio de trabajo en placas de 96 pocillos de fondo plano (volumen final 200 μL). Se agregaron los estímulos, *EgKUs*, inhibidores comerciales, y vehículos (en las diluciones adecuadas), y 30 minutos más tarde se agregó 100 ng/mL LPS (Sigma #L-4516), en todos los casos en forma de mezclas en medio de trabajo. El cultivo se mantuvo en incubador durante 18 horas. A tiempo cumplido, se retiró la placa del incubador y se pasó a hielo. Se analizó la expresión de moléculas de coestimulación (CD40, CD86) y MHCII, en las células por citometría de flujo, el nivel de citoquinas (IL-12/23p40, IL-6 e IL-10) en el sobrenadante por ELISA, y la producción de nitritos mediante el ensayo de Griess.

3.4.4. Evaluación de los efectos de los inhibidores Kunitz sobre la proliferación de BMDM inducida por M-CSF

Se sembraron 0.25×10^6 BMDM por pocillo en medio de trabajo, en placas de 48 pocillos de fondo plano (volumen final 500 μ L). Los estímulos, EgKUs e inhibidores comerciales (de 10 nM a 1 μ M), y luego de 30 minutos, 20 ng/mL M-CSF (PeproTech #315-02) se agregaron en forma de mezcla en medio de trabajo. El cultivo se mantuvo en incubador durante 24 horas. Cuatro horas antes de finalizar el ensayo se agregó 10 μ M 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU, SIGMA #B92285). A tiempo cumplido, se retiró la placa del incubador y se pasó a hielo. Se analizó la proliferación por incorporación de BrdU al ADN de las células durante el proceso de replicación, por marcado de las mismas con anticuerpo anti-BrdU y análisis por citometría de flujo.

3.5. Análisis estadístico de los datos

Para el análisis estadístico de los datos se contó con el asesoramiento del Ing. Agr. Carlos González (M.Sc. en estadística). El análisis estadístico se realizó con el *software* Microsoft Excel con el complemento *RealStatistics*, utilizando el test no paramétrico de Friedman con pos test de Conover sobre el cual se realizó la corrección de Bonferroni. Este test permite el análisis de datos para los que no se cumplen las suposiciones de normalidad y/o de homogeneidad de varianza. Si el test de Friedman resulta en un rechazo de la hipótesis nula, el test pos-hoc de Conover se utiliza para comparar entre sí pares de tratamientos. Al aplicar la corrección de Bonferroni se evita los falsos positivos en las comparaciones múltiples. Los niveles de significancia se indican en cada figura.

4. Resultados y Discusión

4.1. Producción de *EgKU-9* y *EgKU-2* recombinantes

Si bien *EgKU-9* había sido producida por McManus y colaboradores en bacterias ¹⁷¹, restaba poner a punto un protocolo de producción optimizado para su utilización en ensayos con células del sistema inmune.

Nozach y colaboradores observaron que la expresión de proteínas pequeñas ricas en disulfuros acopladas a la DsbC y a la MBP aumentaba la probabilidad de obtener proteínas solubles y correctamente plegadas ¹⁸². La DsbC, además, tiene actividad chaperona sobre la proteína a la cual se encuentra fusionada.

Si bien McManus y colaboradores habían producido a *EgKU-9* sin fusiones a otras proteínas ¹⁷¹, dadas las ventajas recién mencionadas del uso de proteínas de fusión, quisimos intentar aumentar el rendimiento de producción de esta proteína ensayando la estrategia de expresarla como proteína de fusión a la MBP y a la DsbC, además de en forma libre.

Por otra parte, como ya se comentó *EgKU-2* no se había logrado producir en forma soluble en un sistema bacteriano, aún ensayando su expresión en una variedad de cepas de *E. coli* con citoplasma oxidativo, entre ellas la cepa *Shuffle* (datos no publicados de la Dra. Fernanda Alonso). Esto nos llevó a intentar la expresión de *EgKU-2* también como fusión a la MBP y a la DsbC.

Como segunda opción para *EgKU-2*, intentamos la expresión en células S2 de *D. melanogaster*, dado que al ser un sistema eucariota la maquinaria de plegamiento es similar a la de *E. granulosus* ¹⁷⁵. Este sistema de expresión estaba siendo utilizado desde hace unos años en el laboratorio de Inmunovirología del Instituto Pasteur de Montevideo y había resultado exitoso para la producción de proteínas con cuya estructura estaba estabilizada por puentes disulfuros, cuya expresión en bacterias presenta complicaciones.

4.1.1. Clonado en los vectores de expresión

Como se mencionó en la sección 3.2.4.1 de Materiales y Métodos, la estrategia de clonado de las secuencias de *EgKU-9* y *EgKU-2* en los vectores de expresión consistió en dos pasos de PCR. Luego de obtener los productos finales, que correspondían a los vectores de expresión, para expandir los vectores se transformaron bacterias *E. coli* XL1 y se realizó una tercera PCR para corroborar que estas bacterias estaban efectivamente transformadas con el vector de expresión que contenía el inserto de las proteínas Kunitz. Como producto de esta PCR se esperaba obtener secuencias correspondientes a las proteínas Kunitz flanqueadas de los cebadores genéricos. En la Figura 24 se muestra el análisis por gel de agarosa del resultado de la tercera PCR.

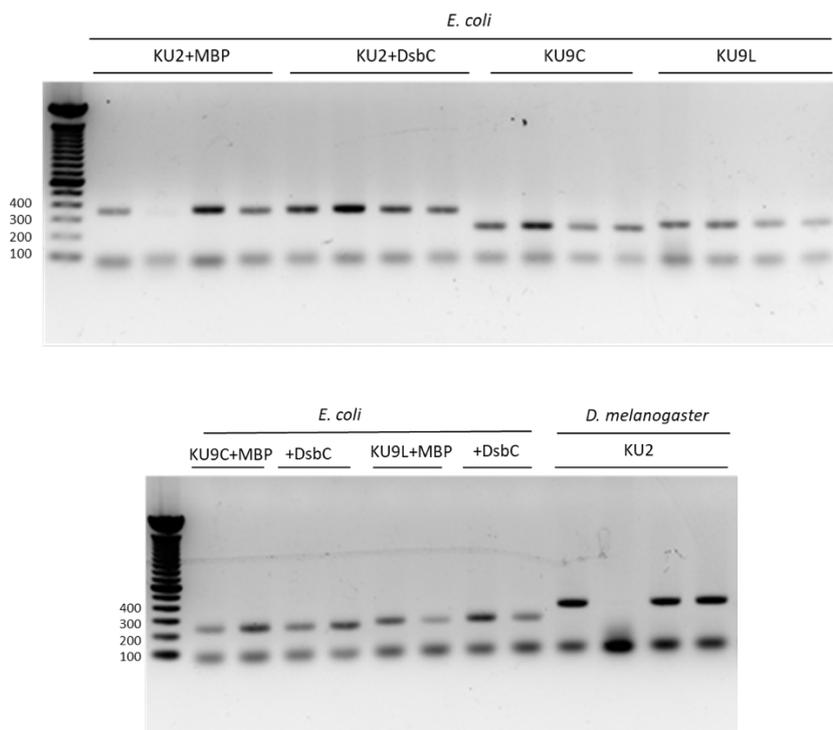


Figura 24. Gel de agarosa 1% p/v correspondiente a PCR de bacterias transformadas con el producto de la segunda PCR. Se observan bandas que coinciden con el peso molecular de *Eg*KU-9C+cebadores genéricos (246 pb), *Eg*KU-9L+cebadores genéricos (270 pb) y *Eg*KU-2+cebadores genéricos (366 pb), en los carriles sembrados con los correspondientes productos de PCR.

La mayoría de las colonias seleccionadas durante el primer screening, excepto dos de ellas, se encontraban transformadas con el vector de expresión adecuado, ya que se observaron bandas coincidentes con el peso molecular de las secuencias de las proteínas Kunitz flanqueadas de los cebadores.

Las bacterias se expandieron y se extrajo el ADN plasmídico mediante una *miniprep* o una *midiprep*. La identidad de las secuencias fue verificada por secuenciación.

Se obtuvieron 2 µg de plásmido mediante *miniprep*, para la expresión en *E. coli*, y 10 µg mediante *midiprep*, para la expresión en *D. melanogaster*.

En la Figura 25 se muestran las 8 construcciones obtenidas para la expresión de *Eg*KU-9 y *Eg*KU-2 en *E. coli*.

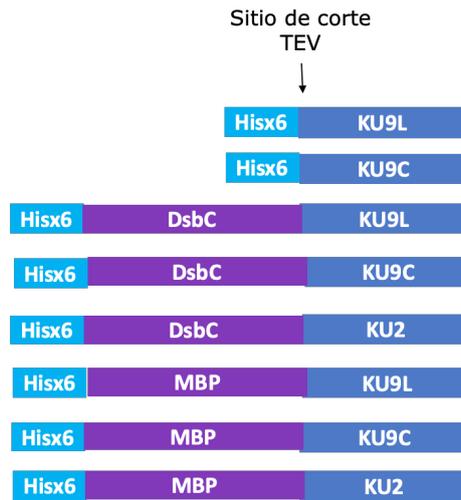


Figura 25. Representación esquemática de las construcciones de *EgKU-9* y *EgKU-2* recombinantes expresadas en *E. coli*. Hisx6, tandem de 6 histidinas; DsbC y MBP, proteínas de fusión; CD, cebador directo; KU9L, *EgKU-9L*; KU9C, *EgKU-9C*; KU2, *EgKU-2*; CR, cebador reverso.

En la Figura 26 se muestra la construcción para la expresión de *EgKU-2* en *D. melanogaster*.



Figura 26. Representación esquemática de la construcción de *EgKU-2* recombinante expresado en *D. melanogaster*. CD, cebador directo; KU2, *EgKU-2*; CR, cebador reverso; Strep-Tagx2, péptido con afinidad por la Streptavidina.

En la Tabla 5 se detallan los pesos moleculares de las construcciones previo al corte con TEV y de sus distintos componentes luego del corte con TEV.

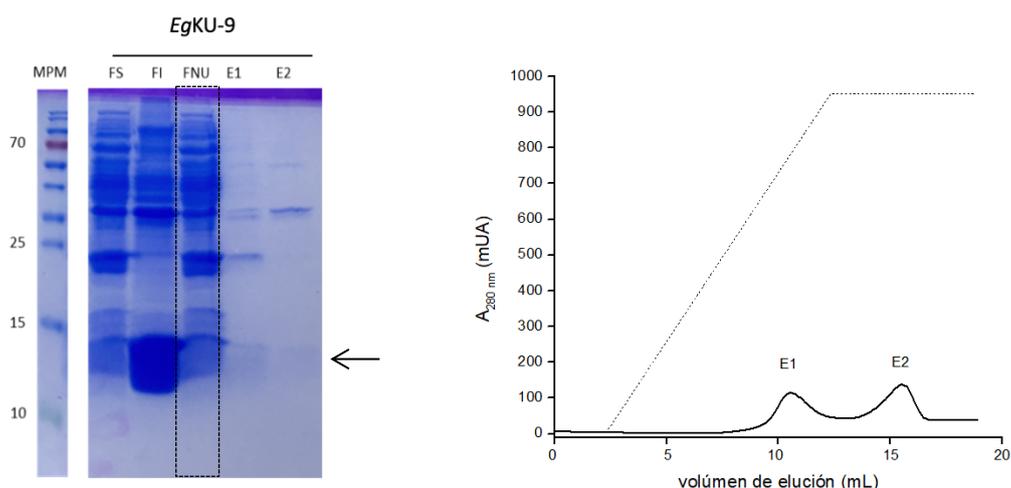
Construcción	Peso molecular
KU9L	7.9 KDa
KU9C	7.1 KDa
KU2	12.4 KDa
DsbC+KU9L	32.5 KDa
DsbC+KU9C	31.7 KDa
DsbC+KU2	37 KDa
MBP+KU9L	50.6 KDa
MBP+KU9C	49.8 KDa
MBP+KU2	55.1 KDa
StrepTagx2+KU2	16.3 KDa
DsbC	24.6 KDa
MBP	42.7 KDa

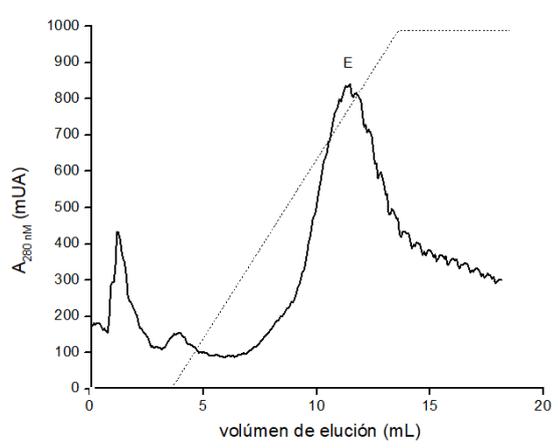
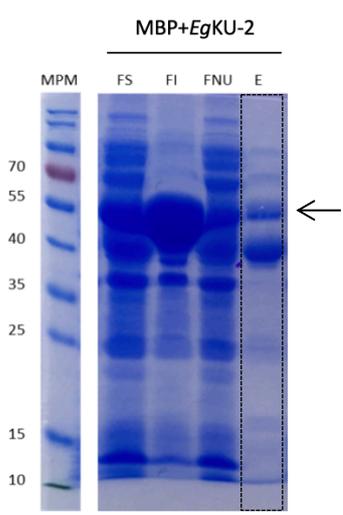
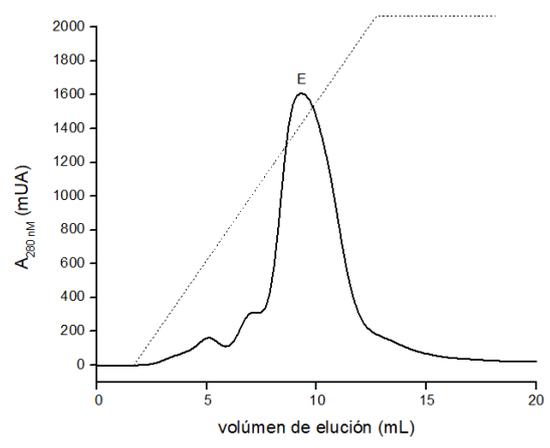
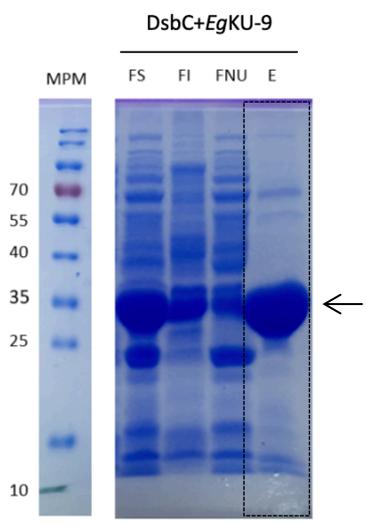
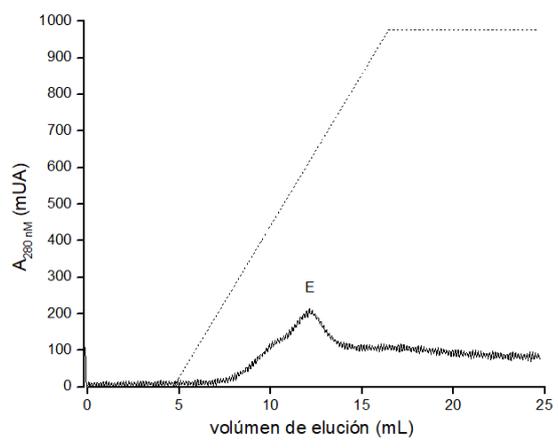
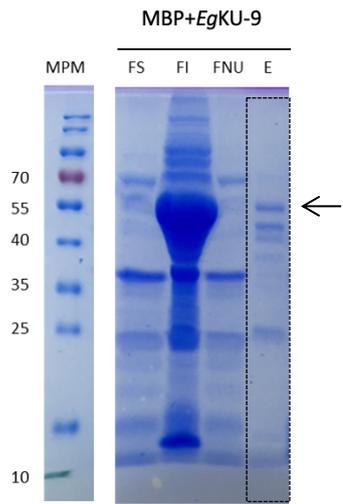
Tabla 5. Pesos moleculares de las construcciones recombinantes y sus componentes.

4.1.2. Expresión y purificación de *EgKU-9* y *EgKU-2* en *E. coli*

A continuación se muestran los resultados obtenidos para *EgKU-9* y *EgKU-2*. Los resultados indicados a continuación como “*EgKU-9*” son los de *EgKU-9L*, pero son también representativos de *EgKU-9C*, cuya producción arrojó resultados muy similares. Sin embargo, para el último paso de la purificación se muestran los análisis por SDS-PAGE tanto para *EgKU-9L* como para *EgKU-9C*, y así se lo indica.

El primer paso de purificación, como se describe en la sección 3.2.4.2.1 de Materiales y Métodos, fue por IMAC. A continuación se muestran los análisis por SDS-PAGE y los correspondientes cromatogramas de los perfiles de purificación por IMAC (Figura 27).





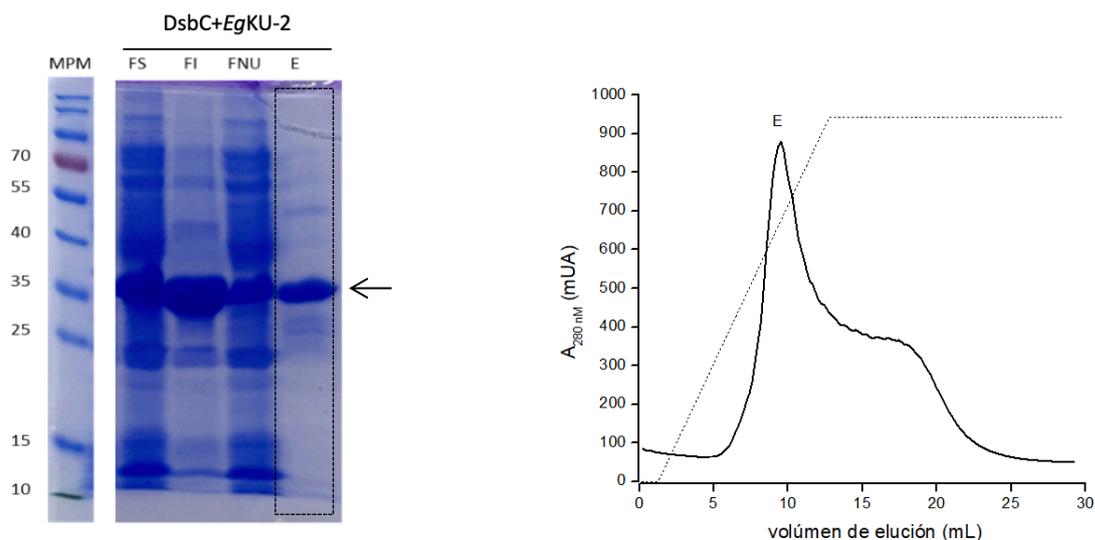


Figura 27. SDS-PAGE y cromatograma del perfil de purificación de *EgKU-9* y *EgKU-2* recombinantes por IMAC. A la izquierda se muestran los geles de 12% p/v (proteína de fusión+*EgKU-9/2*) y 15% p/v (*EgKU-9*) de acrilamida que fueron sembrados con: MPM, marcador de peso molecular (kDa); FS, fracción soluble, y FI, fracción insoluble (obtenidas luego de la ruptura de la pared de las bacterias); FNU, fracción no unida a la columna; E, fracciones eluidas por gradiente de imidazol. Se señalan con flechas las bandas de pesos moleculares coincidentes con los de las proteínas recombinantes expresadas, y con un recuadro en línea punteada, las fracciones seleccionadas para la medida de actividad. A la derecha se observan los cromatogramas asociados a cada SDS-PAGE. La línea punteada representa el gradiente de 0 a 0.5 M de imidazol, y la línea continua representa el registro de la absorbancia a 280 nm ($A_{280 \text{ nm}}$). Se indica con una E en cada caso la fracción eluida seleccionada para el análisis por SDS-PAGE.

EgKU-9 migró por encima de lo que se espera según la migración del marcador de peso molecular; sin embargo este patrón de migración es característico en los inhibidores Kunitz (datos del grupo). *EgKU-9* quedó principalmente en la fracción insoluble luego de la ruptura de las bacterias. En el pasaje por la IMAC de la fracción soluble, *EgKU-9* eluyó en la fracción no unida a la columna, junto con varias proteínas contaminantes. Para MBP+*EgKU-9*, si bien se observó un alto nivel de expresión, una gran proporción de la proteína quedó en la fracción insoluble luego de la ruptura de las bacterias. La fracción soluble minoritaria de MBP+*EgKU-9* se obtuvo en la fracción eluida con el gradiente de imidazol, junto con proteínas contaminantes. Para DsbC+*EgKU-9* se obtuvo buen rendimiento en la fracción soluble. Durante la elución con el gradiente de imidazol se obtuvo una fracción enriquecida en la proteína recombinante.

Tanto para MBP+*EgKU-2* como para DsbC+*EgKU-2*, gran parte de la proteína quedó en la fracción insoluble luego de la ruptura de las bacterias. La fracción soluble de ambas proteínas recombinantes se recuperó luego de la IMAC tanto en la fracción no unida a la columna como en la fracción eluida con el gradiente de imidazol, si bien, para ambas fusiones, el eluido resultó más enriquecido en la proteína recombinante. MBP+*EgKU-2* se obtuvo junto con cantidades importantes de proteína contaminante, que según el patrón de migración parecía ser MBP. En cambio, DsbC+*EgKU-2* se obtuvo prácticamente sin proteínas contaminantes.

En suma, para todas las construcciones, a excepción de DsbC+EgKU-9, la proteína se obtuvo principalmente en la fracción insoluble, lo que sugiere que parte de la población de proteínas presentaba un plegamiento incorrecto. Tanto para EgKU-9 como para EgKU-2, la fusión a la DsbC mejoró la recuperación de proteína recombinante en la fracción soluble. Sin embargo, para EgKU-2, la estrategia no alcanzó para obtener una mayoría de la proteína en forma soluble. Esto está de acuerdo con antecedentes del grupo de trabajo, que sugerían que EgKU-2 tiene una importante tendencia al mal plegamiento.

El haber obtenido MBP+EgKU-9, DsbC+EgKU-9 y DsbC+EgKU-2 tanto en la fracción no unida como en el eluido puede deberse a que se sembraron en la IMAC cantidades importantes de las proteínas recombinantes que podría haber saturado los sitios de unión en la columna. También resulta posible que las proteínas recombinantes establezcan interacciones con otras proteínas presentes en las muestras, y estas interacciones compitan con las interacciones entre la proteína recombinante y la matriz.

Se estimó la concentración de DsbC+EgKU-9 y DsbC+EgKU-2 en los eluidos por medida de absorbancia a 280 nM, dado que en estas muestras, según los análisis de SDS-PAGE, la proteína recombinante de interés era en cada caso el componente mayoritario de la mezcla. Las concentraciones aproximadas fueron de 55 μ M para DsbC+EgKU-9 y 14 μ M para DsbC+EgKU-2.

Para obtener información sobre la cantidad de proteína activa, medimos la actividad de inhibición de quimotripsina (ver Sección 3.3 de Materiales y Métodos) de las fracciones más enriquecidas en las proteínas de interés. Es importante recordar que antecedentes de McManus y colaboradores indicaban que EgKU-9 inhibía quimotripsina, mientras que antecedentes de nuestro grupo sugerían que EgKU-2 podría también inhibir esta proteasa. Las muestras utilizadas para los ensayos de actividad (marcadas con un recuadro en los SDS-PAGE) correspondieron a los eluidos con el gradiente de imidazol para MBP+EgKU-9, DsbC+EgKU-9, MBP+EgKU-2, y DsbC+EgKU-2 y a la fracción no unida a la columna para EgKU-9. Se ensayaron diluciones 1/10000, 1/1000 y 1/100. En la Figura 28 se muestran los resultados de las diluciones 1/10000 y 1/100.

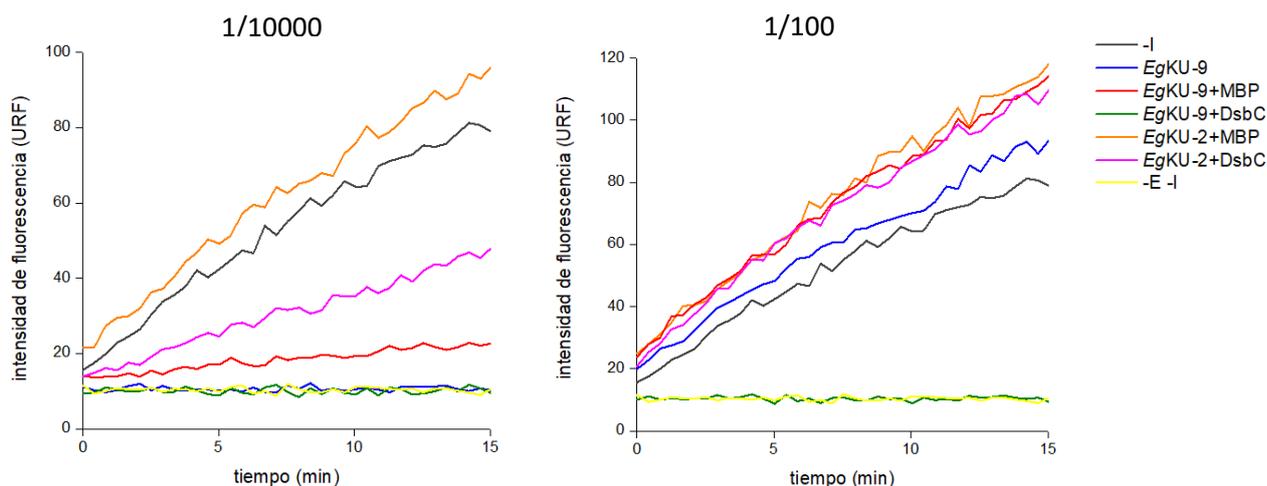


Figura 28. Cursos temporales de inhibición de la quimotripsina por las fracciones obtenidas por IMAC. Se siguió el aumento en el tiempo de la fluorescencia del producto de la reacción de la quimotripsina (1 nM) con el sustrato fluorogénico N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC (5 μ M), en presencia de distintas diluciones de fracciones obtenidas de la IMAC, a longitudes de onda de 390 nm de excitación y 460 nm de emisión. La intensidad de fluorescencia se expresó en unidades relativas de fluorescencia (URF). -I, quimotripsina + sustrato, en ausencia de inhibidores; -E -I, solo sustrato.

Como se mencionó en la Introducción, *EgKU-9* está reportado ser un inhibidor de alta afinidad de la quimotripsina, es decir que se une a la enzima en una relación que es casi 1:1. Esto, junto con la estimación por absorbancia a 280 nm de la concentración de DsbC+*EgKU-9* en la preparación, y suponiendo que la actividad de *EgKU-9* no se ve afectada por la presencia de la DsbC, resulta en que a todas las diluciones utilizadas en este ensayo, DsbC+*EgKU-9* correctamente plegada debería inhibir completamente la actividad. En concordancia con esta predicción, el eluido de DsbC+*EgKU-9* inhibió completamente la actividad a todas las diluciones, es decir que probablemente la proteína estuviera correctamente plegada. La fracción no unida de *EgKU-9* inhibió completamente la actividad a 1/100 y parcialmente a 1/10000. El eluido de MBP+*EgKU-9* inhibió parcialmente la actividad a 1/100, lo cual se podría deber a la baja concentración de MBP+*EgKU-9* y/o a que la proteína presentaba un mal plegamiento.

No se observó inhibición en el eluido de MBP+*EgKU-2* a ninguna de las diluciones, lo que sugiere que *EgKU-2* en esta construcción probablemente esté mal plegado. Se observó actividad en el eluido de DsbC+*EgKU-2*, aunque solo a la dilución 1/100. Con estos datos, no podemos descartar que DsbC+*EgKU-2* estuviera bien plegado y fuera un mal inhibidor de la quimotripsina. Sin embargo, lo más probable dados los antecedentes es que la proporción de DsbC+*EgKU-2* plegado correctamente, y por lo tanto activo, fuera muy baja en esta fracción.

Para *EgKU-9*, se continuó trabajando con la construcción *EgKU-9*+DsbC, dado que fue la más activa y de mayor pureza. Para *EgKU-2*, seguimos trabajando con las construcciones MBP+*EgKU-2* y DsbC+*EgKU-2*, ya que obtuvimos fracciones enriquecidas en ambas proteínas de fusión, y no podíamos descartar la posibilidad de obtener *EgKU-2* puro y activo empleando más pasos de purificación.

DsbC+EgKU-9, MBP+EgKU-2 y DsbC+EgKU-2 fueron tratadas con TEV, para separar el dominio Kunitz de la contraparte de fusión y del *tag* de histidinas, y fueron fraccionadas por segunda vez por IMAC (Figura 29), con la expectativa de obtener a las proteínas Kunitz libres en la fracción no unida a la columna.

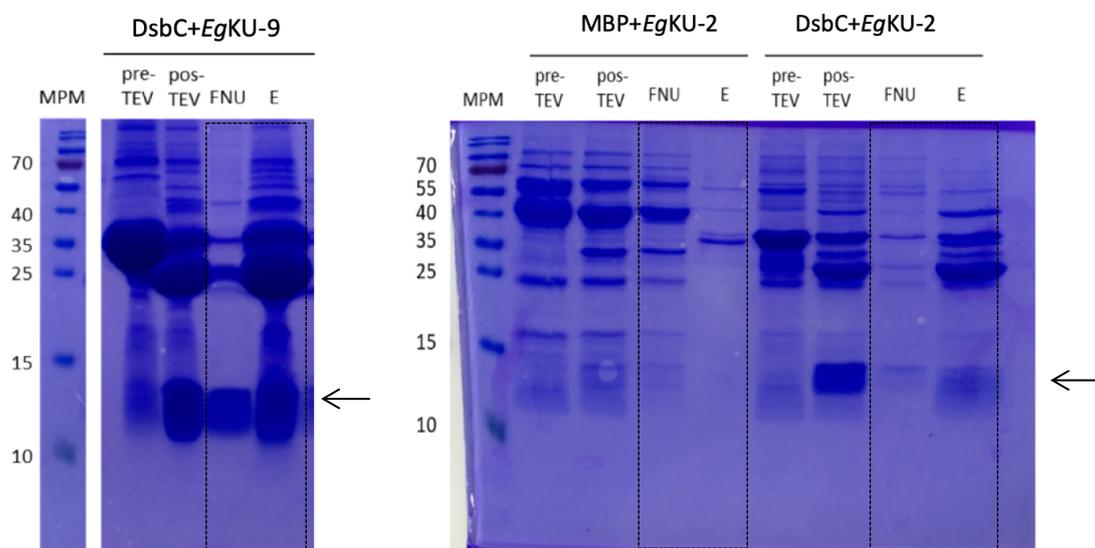


Figura 29. SDS-PAGE del perfil de purificación de DsbC+EgKU-9, MBP+EgKU-2 y DsbC+EgKU-2 tratadas con TEV y pasadas por IMAC. Se observan geles de 12% p/v de acrilamida. Los geles fueron sembrados con: MPM, marcador de peso molecular (KDa); pre-TEV, fracción eluída de la primera IMAC previo al tratamiento con la proteasa TEV; pos-TEV, fracción eluída de la primera IMAC tratada con TEV, en otras palabras, fracción sembrada en la segunda IMAC; FNU, fracción no unida a la columna; E, fracciones eluídas por gradiente de imidazol. Se señalan con flechas las bandas que corresponden a *EgKU-9L* y *EgKU-2*. Se marcan con recuadros en línea punteada las fracciones seleccionadas para medir actividad.

Para DsbC+EgKU-9, si bien en el carril donde se sembró la muestra tratada con TEV se observaron bandas importantes correspondientes a *EgKU-9* (PM 7.9 KDa; migración 10-15 KDa) y a DsbC (24.6 KDa), el corte con TEV no fue del todo eficiente, como surge de la presencia de una banda importante correspondiente a la proteína de fusión (32.5 KDa). Parte de *EgKU-9* liberada por la TEV se unió a la matriz de la IMAC, pero se obtuvo *EgKU-9* de mayor pureza en la fracción no unida a la columna, en la cual los contaminantes presentes fueron principalmente DsbC+EgKU-9 y DsbC libre.

Para MBP+EgKU-2, luego del corte con TEV apareció una banda tenue entre 10 y 15 KDa correspondiente con *EgKU-2* libre (PM 12.4 KDa); sin embargo se puede notar que el corte con TEV fue muy poco eficiente. El análisis por SDS-PAGE para esta construcción muestra que no se recuperaron cantidades significativas de *EgKU-2* luego del pasaje por la columna, posiblemente debido a precipitación.

Para DsbC+EgKU-2, si bien el corte con TEV no fue completamente exitoso, se observó la aparición de una banda densa entre 10 y 15 KDa coincidente con el peso molecular de *EgKU-2* libre. Sin embargo, durante el pasaje por la IMAC, gran parte

de esta banda desapareció, posiblemente por precipitación. *EgKU-2* se obtuvo en el eluido, con grandes cantidades de proteínas contaminantes.

Los resultados sugieren que *EgKU-2*, posiblemente mal plegada, se mantiene en solución en el contexto de las proteínas de fusión con MBP y DsbC, precipitando luego del corte con TEV. El cambio de amortiguador con imidazol al amortiguador TEV, en ausencia de imidazol, también puede haber afectado la solubilidad de la proteína recombinante. En el caso de DsbC+*EgKU-2*, la precipitación parece haber ocurrido principalmente luego del pasaje por la columna, en lugar de hacerlo inmediatamente luego del corte con TEV. Se podría pensar que luego del corte con TEV *EgKU-2* continúe interactuando con proteínas que lo mantengan en solución, y durante el pasaje por la columna estas interacciones se rompan y la proteína precipite. Otra posibilidad es que la estructura de *EgKU-2* sea muy sensible a los cambios en las concentraciones de sales y en el pH de los amortiguadores.

El hecho de que TEV no haya cortado completamente las fusiones puede deberse a impedimentos estéricos. Además se evaluó la posibilidad de que *EgKU-9* inhibiera TEV; sin embargo los resultados nos llevaron a rechazar esta suposición (resultados no mostrados).

Se midió actividad de las fracciones no unidas y de los eluidos, a diluciones 1/1000 y 1/100 (Figura 30).

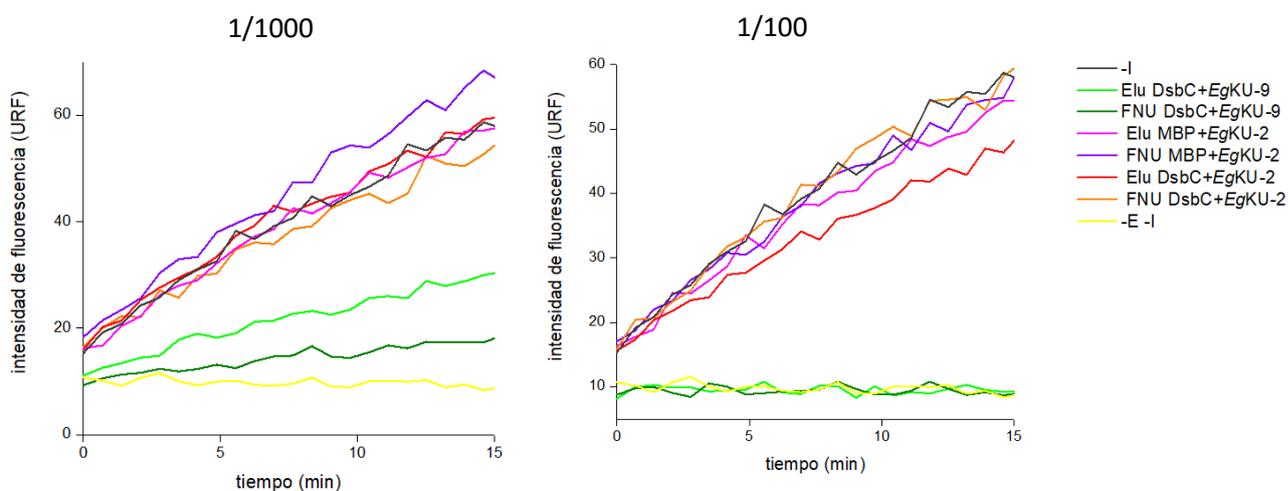


Figura 30. Cursos temporales de inhibición de la quimotripsina por las fracciones obtenidas de la segunda IMAC. -I, quimotripsina + sustrato, en ausencia de inhibidores; -E -I, solo sustrato; Elu, fracciones eluidas de la IMAC; FNU; fracciones no unidas a la columna.

El eluido de DsbC+*EgKU-2* presentó actividad parcial de inhibición a la dilución 1/100, y no presentó actividad a la dilución 1/1000. Las fracciones de MBP+*EgKU-2* no tuvieron actividad a ninguna dilución.

A partir de estos ensayos de expresión se concluyó que no se logró obtener una preparación de *EgKU-2* que se pudiera considerar confiable del punto de vista de tener un correcto plegamiento, además de que el rendimiento fue pobre.

Para DsbC+EgKU-9 se observó inhibición total con el eluido y la fracción no unida a la columna a la dilución 1/100, e inhibición parcial a 1/1000. Continuamos trabajando con la fracción no unida de DsbC+EgKU-9 dado que fue la fracción más enriquecida en EgKU-9 libre.

A continuación se muestra el análisis por SDS-PAGE y el correspondiente cromatograma del último paso a la purificación de EgKU-9L por intercambio iónico a partir de la fracción no unida a la columna de la segunda IMAC (Figura 31).

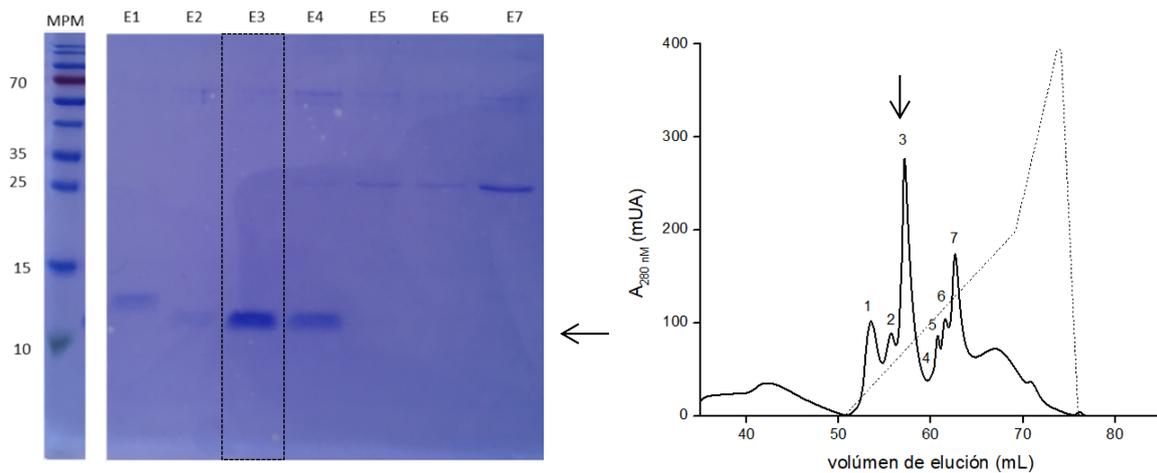


Figura 31. SDS-PAGE y cromatograma del perfil de elución de EgKU-9L por intercambio aniónico. A la izquierda se muestra el SDS-PAGE. El gel de 15% p/v de acrilamida fue sembrado con: MPM, marcador de peso molecular (KDa); E, fracciones eluidas por gradiente de NaCl de 0 a 0.5 M. A la derecha se muestra el cromatograma. La línea punteada representa el gradiente de NaCl, y la línea continua representa el registro de la absorbancia a 280 nM ($A_{280 \text{ nM}}$). Los números de los eluidos en el SDS-PAGE se corresponden con los números de los distintos picos de elución indicados en el cromatograma. Se indica con una flecha la banda correspondiente a EgKU-9L. Se marca con un recuadro en línea punteada la fracción seleccionada para los ensayos realizados en esta Tesis.

En la Figura 32 se muestra el análisis por SDS-PAGE de la preparación final obtenida para EgKU-9C.

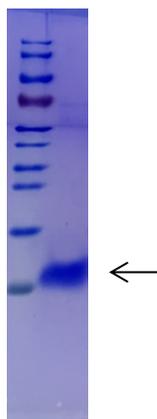


Figura 32. SDS-PAGE de la preparación final de *EgKU-9C*. Se observa el análisis por SDS-PAGE del eluido del paso final de purificación por intercambio catiónico de *EgKU-9C*. Se indica con una flecha la banda correspondiente a *EgKU-9C*.

Se obtuvieron 0.3 mg de *EgKU-9L* y 0.4 mg de *EgKU-9C* por litro de cultivo bacteriano.

Es importante notar que en los dos pasos de purificación por IMAC, para muchas de las construcciones las proteínas recombinantes no se obtuvieron en la fracción esperada, sino que se obtuvieron repartidas en más de una fracción, lo que para la purificación de *EgKU-9* determinó que se perdieran cantidades importantes de proteína recombinante a lo largo del proceso de purificación. Especulamos que esto se debe a posibles interacciones entre las proteínas Kunitz libres y las proteínas Kunitz unidas a la contraparte de fusión o interacciones con la proteasa TEV. Tal vez lograr un corte más eficiente con TEV, aumentando los tiempos de incubación y/o las concentraciones de la proteasa, de manera de eliminar completamente la presencia de la proteína de fusión, habría mejorado los resultados. Otra posibilidad es que los amortiguadores utilizados favorecieran este tipo de interacciones no deseadas, por lo que se podría probar el uso de distintos amortiguadores.

4.1.3. Producción de *EgKU-2* en la línea celular S2 de *D. melanogaster*

Como no fue posible obtener una preparación adecuada de *EgKU-2* producido en bacterias, decidimos intentar su expresión en un sistema eucariota. Para esto se trabajó con células Schneider 2 (S2) de *D. melanogaster*. Las células S2 son una línea policlonal derivada de embriones tardíos de *D. melanogaster*¹⁸³, que integran múltiples copias de plásmidos en el genoma por un proceso mediado por P-transposones, permitiendo altos niveles de expresión de la proteína recombinante¹⁸⁴⁻¹⁸⁶.

Como se mencionó en la Sección 3.2.4.3 de Materiales y Métodos, una vez que células S2 fueron transfectadas con el vector de expresión de *EgKU-2*, para verificar que la transfección había sido exitosa se realizó una PCR utilizando como molde las células S2 transfectadas y cebadores genéricos. El resultado de la PCR se corrió en un gel de agarosa (Figura 33).

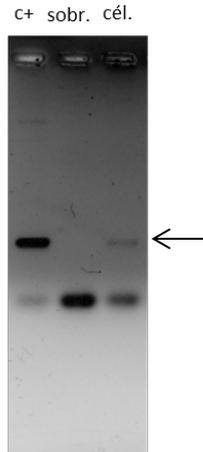


Figura 33. Gel de agarosa 1% p/v de los productos de PCR de células S2 transfectadas. Se utilizaron los cebadores genéricos, y los siguientes moldes: Cél, células S2 transfectadas con el vector de expresión de *EgKU-2*; C+, el vector de expresión de *EgKU-2* (control positivo y marcador de peso molecular); sobr., sobrenadante del cultivo de células S2 transfectadas (control negativo). Se indica con una flecha la banda correspondiente a *EgKU-2*.

No se observaron bandas correspondientes a la secuencia de *EgKU-2* en el sobrenadante del cultivo; en cambio, sí se observó una banda correspondiente a *EgKU-2* en la muestra de células S2, al igual que en el control positivo correspondiente al plásmido, lo que nos asegura que este resultado positivo no se debe a restos de plásmido que quedaron en el cultivo luego de la transfección, y que efectivamente hubo incorporación del plásmido a las células.

Como se explica en Materiales y Métodos, luego de la expresión de la proteína durante 10 días, se obtuvo el sobrenadante del cultivo y se realizó un primer paso de purificación por cromatografía de afinidad por la streptavidina. En la Figura 34 se muestra el análisis de las fracciones obtenidas por SDS-PAGE y el cromatograma de la elución.

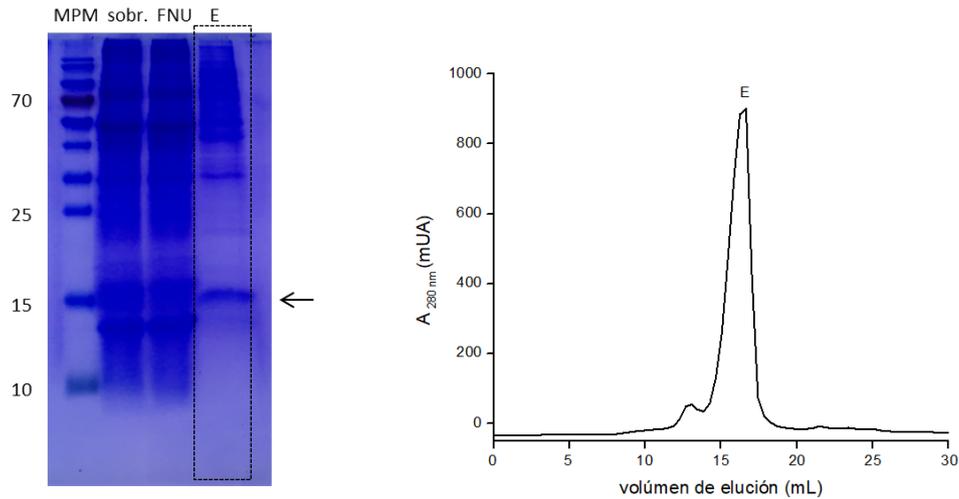


Figura 34. Análisis por SDS-PAGE y cromatograma de la purificación por cromatografía de afinidad por streptavidina. A la izquierda se muestra el gel de 15% p/v de acrilamida que fue sembrado con: MPM, marcador de peso molecular (kDa); sobr., sobrenadante del cultivo; FNU, fracción no unida a la columna *Strep-Tactin XT*; E, fracción eluída con 5 mL de biotina 25 mM. Se indica con una flecha la banda correspondiente a *EgKU-2+Strep-Tagx2* cuya identidad se verificó por espectrometría de masas. Se indica con un recuadro en línea punteada la fracción con la cual se continuó trabajando. A la derecha se observa el cromatograma del perfil de elución.

En la fracción eluída aparece una banda que migra aproximadamente a la altura de la banda de 15 kDa del MPM. Se verificó por espectrometría de masas que esta banda correspondía a *EgKU-2* como fusión al *Strep-Tagx2*.

Se midió la actividad de inhibición de quimotripsina de la fracción sembrada en la columna y de las fracciones obtenidas luego del pasaje por la misma, a diluciones 1/1000 y 1/100 (Figura 35).

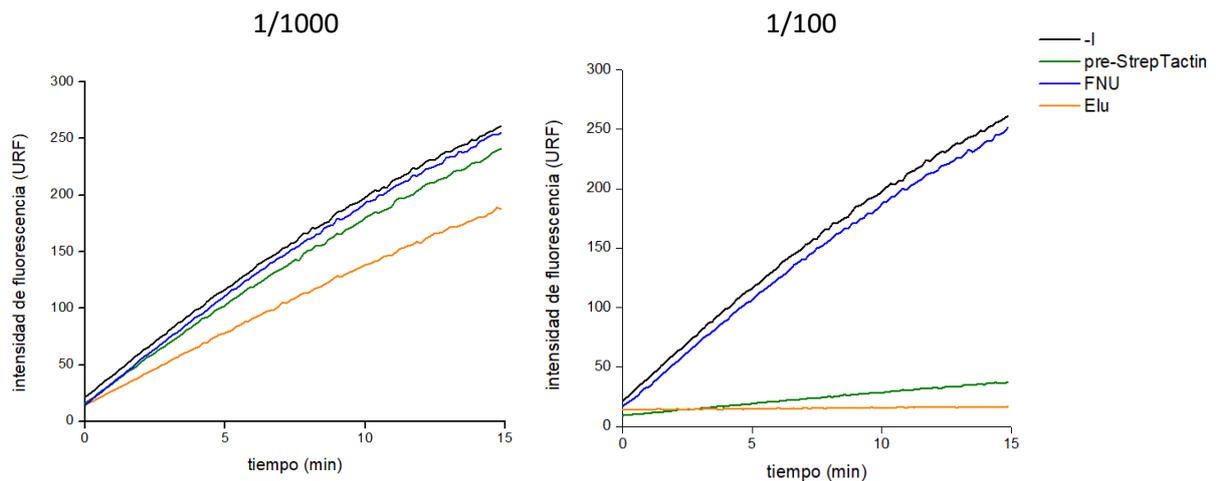


Figura 35. Cursos temporales de inhibición de la quimotripsina por las fracciones obtenidas de cromatografía de afinidad. Se siguió el aumento en el tiempo de la fluorescencia del producto de la reacción de la quimotripsina con el sustrato fluorogénico N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC, en presencia de distintas diluciones de fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad por streptavidina, a longitudes de onda de 390 nm de excitación y 460 nm de emisión. -I, quimotripsina + sustrato, en ausencia de inhibidores; pre-StrepTactin, sobrenadante del cultivo S2 antes de pasar por la columna; Elu, fracción eluída; FNU; fracción no unida.

Se observó inhibición total de la actividad de la quimotripsina por parte del sobrenadante del cultivo sembrado en la columna y en el eluído, a la dilución 1/100. A 1/1000 se observó inhibición parcial en la fracción eluída.

El eluído se trató con TEV para separar *EgKU-2* del *Strep-Tagx2* y se realizó un segundo paso de purificación por cromatografía de afinidad por streptavidina esperando obtener *EgKU-2* libre en la fracción no unida a la columna. En la Figura 36 se muestra el análisis de la purificación por SDS-PAGE.

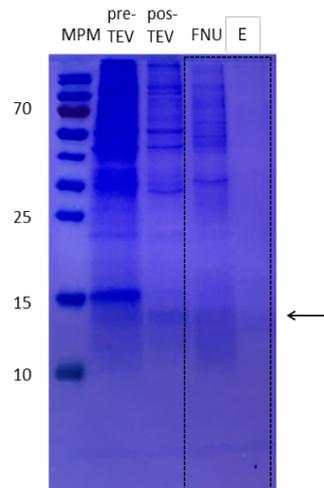


Figura 36. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad. El gel de 15% m/v de acrilamida fue sembrado con: MPM, marcador de peso molecular (KDa); pre-TEV, eluido de la primer cromatografía, previo al corte con TEV; pos-TEV, eluido de la primera cromatografía luego del corte con TEV; FNU, fracción no unida a la columna *Strep-tactin XT*; E, fracción eluída con 5 mL de biotina. Se indica con una flecha la banda correspondiente a *EgKU-2* disociado del *Strep-Tagx2*. Se indica con un recuadro en línea punteada las fracciones seleccionadas para el siguiente paso de purificación.

El corte con la proteasa TEV fue eficiente; sin embargo, el análisis por SDS-PAGE pareció indicar que parte de *EgKU-2* precipitó durante el corte. A su vez, no se observaron bandas definidas correspondientes a *EgKU-2* en la fracción no unida a la columna y tampoco en el eluido.

Se midió la actividad de las fracciones de diluciones 1/100 y 1/10 de las fracciones sembradas en el SDS-PAGE.

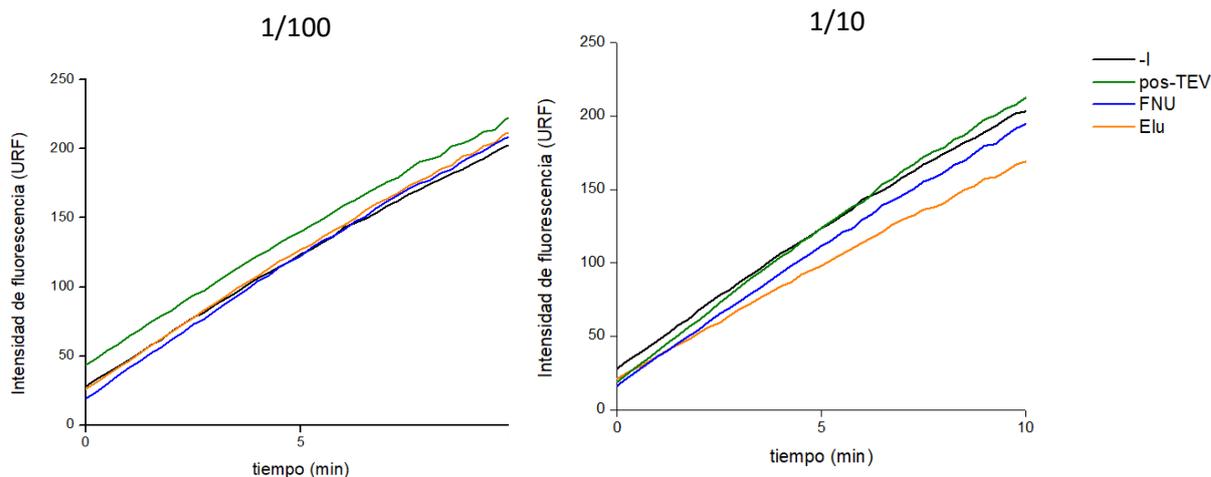


Figura 37. Cursos temporales de inhibición de la quimotripsina por las fracciones obtenidas de cromatografía de afinidad. A la izquierda se muestra el gráfico correspondiente a diluciones 1/100 de las fracciones, a la derecha, las diluciones 1/10. -I, quimotripsina + sustrato, en ausencia de inhibidores; pos-TEV, eluido de la primer purificación tratado con TEV, y sembrado en la columna de streptavidina; FNU, fracción no unida; Elu, fracción eluída.

En concordancia con lo observado en el SDS-PAGE en términos de la banda correspondiente a *EgKU-2*, el tratamiento con la proteasa TEV junto con el pasaje por la segunda cromatografía de afinidad resultó en una pérdida casi completa de la actividad de inhibición de *EgKU-2*, reafirmando la suposición de que *EgKU-2* precipitó. Pese a lo anterior, decidimos realizar un último paso de purificación por intercambio aniónico con una preparación que contenía la fracción no unida a la columna, dado que este tipo de cromatografía tiende a concentrar las proteínas y no descartábamos la posibilidad de recuperar al menos una pequeña cantidad de *EgKU-2* activo. Sin embargo, no observamos bandas que pudieran corresponder a *EgKU-2* (Figura 38).

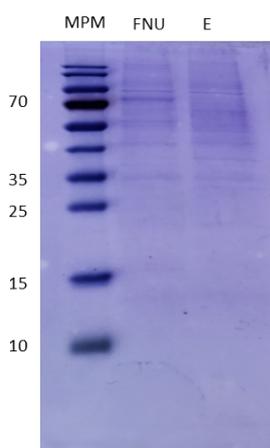


Figura 38. SDS-PAGE de la purificación de *EgKU-2* por intercambio aniónico. Se muestra el gel de 15% p/v de acrilamida sembrado con: MPM, marcador de peso molecular (kDa); FNU, fracción no unida a la columna; E, fracción eluída por gradiente de NaCl de 0 a 0.5 M.

En resumen, si bien *EgKU-2* se expresó y se obtuvo en la fracción soluble del sobrenadante de las células S2, a medida que se fueron realizando distintos pasos de purificación, la proteína parece haber precipitado. Es probable que *EgKU-2* estuviera mal plegado y que la interacción con el *Strep-Tagx2* o con proteínas presentes en el sobrenadante lo mantuvieran en solución, bajo determinadas condiciones de amortiguador. Es también posible que *EgKU-2* sea sensible a cambios en la concentración de sales y/o pH del amortiguador.

En suma, no se obtuvieron cantidades solubles significativas de *EgKU-2*, a diferencia de *EgKU-1*, *EgKU-3*, *EgKU-4* y *EgKU-9L/C*, que fueron producidas de manera recombinante en *E. coli* y para las cuales se muestran los rendimientos en la Tabla 6 .

<i>EgKU</i>	Rendimiento
KU1	0.9 g/L de cultivo
KU3	0.5 g/L de cultivo
KU4	0.6 g/L de cultivo
KU9L	0.3 g/L de cultivo
KU9C	0.4 g/L de cultivo

Tabla 6. Rendimientos de las producciones de inhibidores Kunitz recombinantes. Se detalla la cantidad de gramos de proteína recombinante obtenida por litro de cultivo bacteriano.

4.2. Caracterización de la actividad de inhibición de proteasas de serina pancreáticas por *EgKU-9*

Como se mencionó en la Introducción, los antecedentes indican que los inhibidores de proteasas de serina del tipo Kunitz son inhibidores competitivos de alta afinidad. Además la inhibición suele ser lenta, y presenta un mecanismo cinético que involucra dos equilibrios ¹⁰⁸. En particular, los antecedentes del grupo de trabajo muestran que los miembros de la familia *EgKU* cuya actividad ha sido caracterizada tienen este comportamiento típico ^{88, 167}.

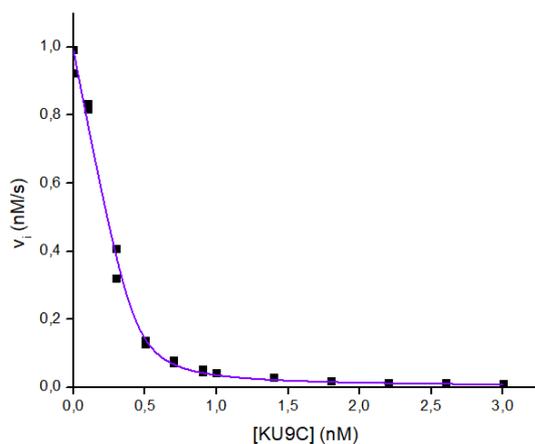
4.2.1. Determinación de constantes globales de inhibición

En primer lugar se determinaron las constantes globales de inhibición, K_i^* , de *EgKU-9L* y *EgKU-9C* recombinantes frente a la quimotripsina, la tripsina y la elastasa. En un principio se realizaron ensayos de inhibición de la quimotripsina- α bovina. Como se obtuvieron K_i^* similares para *EgKU-9L* y para *EgKU-9C* (5.08×10^{-11} M y 2.0×10^{-11} M, respectivamente) se continuó trabajando con *EgKU-9C*, cuya expresión recombinante había presentado el mejor rendimiento. Se ensayaron además la tripsina catiónica bovina y la elastasa porcina. Se eligieron estas tres enzimas por ser enzimas pancreáticas presentes en el intestino del hospedero intermediario unguulado de *E. granulosus*. Dados los resultados obtenidos para la quimotripsina- α bovina decidimos ensayar una mezcla de quimotripsinas caninas, enzimas digestivas expresadas en el hospedero definitivo de *E. granulosus*. Se referirá en esta sección a *EgKU-9C* y a *EgKU-9L* como *EgKU-9*, suponiendo que ambas variantes se comportan de la misma manera, para facilitar la lectura. Esta

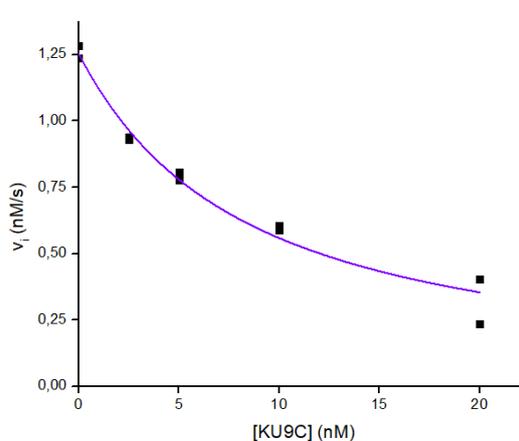
suposición se basa en que *EgKU-9L* y *EgKU-9C* inhiben la quimotripsina- α bovina con la misma afinidad, y en que los 8 residuos presentes en la región N-terminal de *EgKU-9L*, ausentes en el extremo N-terminal de *EgKU-9C*, en un principio no deberían interferir con la actividad de inhibición de proteasas, por localizarse lejos del bucle anti-peptidasa y por no presentar una alta densidad de carga positiva o negativa, que pudiera interferir con la estructura global de la proteína.

Como se menciona en la sección 3.3.1 de Materiales y Métodos, los valores de K_I^* fueron determinados a partir de las medidas de velocidad de hidrólisis del sustrato por las enzimas en presencia de concentraciones crecientes de inhibidor, manteniendo fija la concentración de enzima activa, y de sustrato en exceso. Los datos obtenidos fueron ajustados a la ecuación de Morrison (Ecuación 4), utilizando el programa Origin 8.6, como se ejemplifica en la Figura 39.

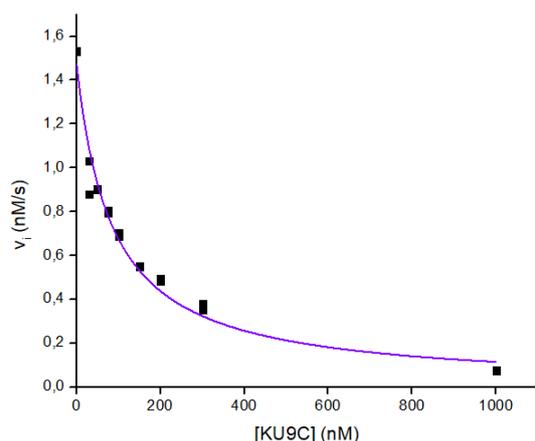
Quimotripsina- α bovina



Quimotripsinas caninas



Tripsina catiónica bovina



Elastasa porcina

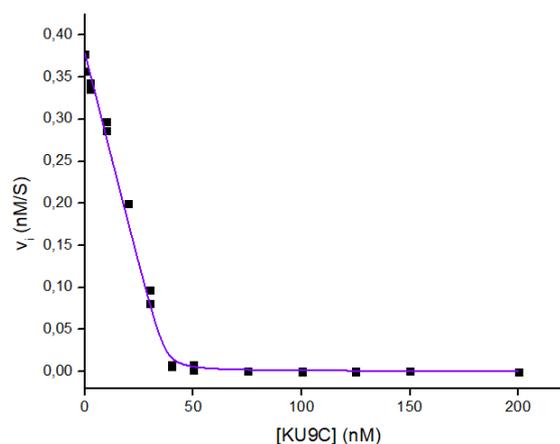


Figura 39. Inhibición de la quimotripsina bovina, tripsina catiónica bovina, elastasa porcina y quimotripsinas caninas por *EgKU-9*. Se incubó la enzima (1 nM para las quimotripsinas, 0.3 nM para la tripsina y 38 nM para la elastasa) con concentraciones crecientes del *EgKU-9* durante 15 minutos y se inició la reacción con el sustrato (N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC para las quimotripsinas, N-BOC-Ile-Glu-Gly-Arg-AMC para la tripsina y N-Suc-Ala-Ala-Ala-AMC para la elastasa; 5 μ M). Se determinó la velocidad inicial de la reacción siguiendo la fluorescencia con longitudes de onda de 390 nm de excitación y 460 nm de emisión. Las líneas azules y violetas representan el mejor ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Morrison (Ecuación 4). Para cada par enzima-inhibidor se muestra una gráfica representativa de dos experimentos independientes.

Se puede observar, como se esperaba, que *EgKU-9* es un inhibidor reversible de las quimotripsinas y la tripsina, ya que se observa actividad remanente a concentraciones estequiométricas de inhibidor mayores a las de enzima. Para la inhibición de la elastasa, esto no resulta claro a partir de estos gráficos. Sin embargo ensayos preliminares en los cuales se incubó *EgKU-9* con elastasa a

distintos tiempos y concentraciones y luego se analizaron las muestras por SDS-PAGE, no mostraron modificación covalente de la enzima (datos no mostrados), lo que sugiere que *EgKU-9* es un inhibidor reversible también de la esta proteasa.

De los ajustes se determinaron los valores de K_{Iap}^* , que se corrigieron con la Ecuación 2, obteniéndose los valores de K_I^* . Los valores de K_{Iap}^* y K_I^* obtenidos se muestran en la Tabla 7.

Proteasa	K_{Iap}^* (M)	K_I^* (M)
Q. bovina	$2.4 \pm 0.3 \times 10^{-11}$	$2.0 \pm 0.3 \times 10^{-11}$
Q. canina	$6.1 \pm 2.1 \times 10^{-9}$	$5.4 \pm 1.8 \times 10^{-9}$
T. catiónica bovina	$8.0 \pm 0.6 \times 10^{-8}$	$7.6 \pm 0.6 \times 10^{-8}$
E. porcina	$2.4 \pm 0.1 \times 10^{-11}$	ND ^a

Tabla 7. Constantes de inhibición globales (K_{Iap}^* y K_I^*) de *EgKU-9* recombinante frente a proteasas de serina digestivas. Las constantes fueron calculadas a partir del ajuste a la Ecuación 4 en ensayos de inhibición (Figuras 27), y corrigiendo por la concentración de sustrato y la K_M utilizando la Ecuación 2. Los valores corresponden al promedio y desviación estándar de dos experimentos. ^a No determinado. Q: quimotripsina. T: tripsina. E: elastasa.

Según Dixon, se puede decir que un inhibidor es de alta afinidad cuando presenta K_I^* del orden de 10^{-9} M o menor ¹⁸⁷. *EgKU-9* es un inhibidor potente de alta afinidad de la quimotripsina bovina (K_I^* del orden de 10^{-11} M). Además es un inhibidor de alta afinidad pero no tan bueno de la mezcla de quimotripsinas caninas (K_I^* del orden de 10^{-9} M), e inhibe, aunque no con alta afinidad, la tripsina bovina (K_I^* del orden de 10^{-8} M), lo que es esperado debido a la leucina presente en el sitio P1 (ver Figura 13). Para el caso de la elastasa, no se determinó un valor de K_M con su sustrato fluorogénico porque no contábamos con la cantidad de reactivo y de enzima suficiente, por lo que no pudimos determinar un valor de K_I^* . Para esta enzima podemos tener las dos situaciones que se describen a continuación. Como primera posibilidad, si el K_M es mayor que $[S]$, entonces, según la Ecuación 4, el K_I^* sería similar a la K_{Iap}^* . Como segunda posibilidad, si K_M es menor que $[S]$, la K_I^* sería menor que la K_{Iap}^* . En suma, el valor de K_I^* tiene que ser similar o menor al obtenido para la K_{Iap}^* , que es del orden de 10^{-11} M, lo que lleva a la deducción que *EgKU-9* es un inhibidor potente de alta afinidad de la elastasa porcina.

El valor de K_I^* frente a la quimotripsina bovina es de los más pequeños registrados en la base de datos MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>), junto con el valor de K_I^* registrado para *EgKU-3* (del orden de 10^{-11} M) ¹⁶⁷ y para el inhibidor tipo Kunitz AeTi de *Archidendron ellipticum*, perteneciente a la familia I3 de inhibidores Kunitz de peptidasas de serina presentes en leguminosas, cuyo prototipo es el inhibidor de tripsina de soja (STI del inglés "soybean trypsin inhibitor"), que presenta un K_I^* también del orden de 10^{-11} M ¹⁸⁸.

Suponiendo que el valor de K_{Iap}^* frente a la elastasa pancreática porcina es efectivamente del mismo orden que el K_I^* , este valor sería el más pequeño

registrados en la base de datos MEROPS para esta enzima. Otros inhibidores de alta afinidad que presentan K_I^* del orden de 10^{-10} M son el inhibidor de *Anemonia sulcata*, perteneciente a la familia I1 de inhibidores tipo Kazal¹⁸⁹, y la elafina/Trappin-2, un inhibidor humano perteneciente a la familia I17, cuya función es inhibir peptidasas leucocitarias¹⁹⁰.

Para los estudios con quimotripsina canina, se empleó una muestra que contenía las dos isoformas de quimotripsinas- β caninas¹⁶⁷. Nuestros resultados (K_I^* del orden de 10^{-9} M) pueden indicar que *EgKU-9* es para estas dos isoformas un inhibidor de alta afinidad aunque menos potente que para la quimotripsina bovina. Esta diferencia podría indicar cierta especificidad funcional por enzimas tipo quimotripsina de ungulados, en concordancia con los altos niveles de expresión de *EgKU-9* en la oncosfera, estadio que infecta a los hospederos intermediarios ungulados (y especialmente la oveja). Alternativamente, *EgKU-9* podría ser un inhibidor potente de alta afinidad de una de las isoformas de quimotripsina canina pero no de la otra.

Se compararon las secuencias de los 10 residuos que rodean el sitio P1 de *EgKU-9* con las de aquellas proteínas *EgKU* cuyas K_I^* habían sido previamente determinadas para varias proteasas (*EgKU-3* y *EgKU-8*)¹⁶⁷, así como con la del BPTI¹⁹¹. *EgKU-3*, así como *EgKU-9*, es un inhibidor potente de alta afinidad de la quimotripsina bovina (K_I^* del orden de 10^{-11} M)¹⁶⁷. Sin embargo, inhibe elastasa porcina con una K_I^* del orden de 10^{-9} M¹⁶⁷, dos órdenes de magnitud mayor que la K_I^* determinada en esta Tesis para *EgKU-9*. *EgKU-8* inhibe tripsina bovina y tripsinas caninas con una K_I^* del orden de 10^{-11} M, y quimotripsina- α bovina con una K_I^* del orden de 10^{-9} M. El BPTI inhibe tripsina catiónica bovina con una K_I^* del orden de 10^{-13} M, y quimotripsina- α bovina con una K_I^* del orden de 10^{-11} M. El alineamiento se muestra en la Figura 40.

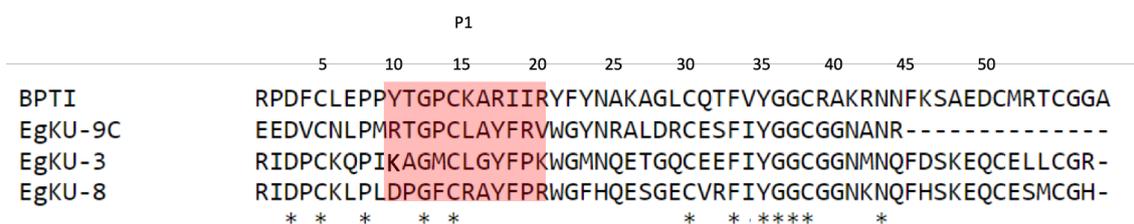


Figura 40. Alineamiento de secuencias de inhibidores Kunitz con distintas especificidades de inhibición. Se señalan con asteriscos los residuos conservados en todas las secuencias. Se indica el residuo P1. En rojo se resalta la secuencia de aminoácidos que rodea al sitio P1. El alineamiento se realizó utilizando la herramienta Muscle 3.8 del programa Clustal.

Se puede observar que existen dos residuos conservados en el bucle anti-peptidasa de las 4 proteínas, que corresponden a la Gly₁₂ y a la Cys₁₄. Como se explicó en la Introducción, la especificidad de estos inhibidores por sus enzimas blanco está determinada principalmente por la cadena lateral del residuo P1: residuos cargados positivamente para la tripsina, aromáticos o hidrofóbicos para la quimotripsina y pequeños no cargados para la elastasa. En concordancia con esto, el BPTI y *EgKU-8* presentan lisina y arginina en el sitio P1 respectivamente, e inhiben preferencialmente tripsina. *EgKU-9* y *EgKU-3* presentan leucina, e inhiben tanto

elastasa como quimotripsina, más allá que para la elastasa *EgKU-9* es un inhibidor más potente que *EgKU-3*. Las secuencias de *EgKU-9* y de *EgKU-3* comparten la presencia de un residuo básico en el sitio 10 (Arg₁₀ para *EgKU-9* y Lys₁₀ para *EgKU-3*) ausentes en las secuencias del BPTI y de *EgKU-8*; se puede especular que este residuo básico podría contribuir a la actividad de inhibición de quimotripsina y/o elastasa. Si se compara la secuencia de *EgKU-9* con las secuencias de los otros 3 inhibidores Kunitz presentes en la Tabla, que como se dijo no inhiben elastasa o la inhiben de manera menos potente, se puede especular que contribuyan a la inhibición potente de elastasa un residuo básico en posición 19 (Arg₁₉ para *EgKU-9*) y un residuo pequeño hidrofóbico en la posición 20 (Val₂₀ para *EgKU-9*); en la posición 20 en particular, en las otras proteínas comparadas hay residuos básicos (Arg₂₀ en el BPTI y *EgKU-8* y Lys₂₀ en *EgKU-3*). Es claro sin embargo que residuos fuera del bucle anti-peptidasa, que pueden afectar la conformación global de la proteína, posiblemente también influyan en las distintas eficiencias con las cuales las proteínas Kunitz inhiben las proteasas.

4.2.2. Caracterización del mecanismo de inhibición de *EgKU-9* frente a la quimotripsina- α bovina

McManus y colaboradores habían determinado constantes de inhibición de *EgKU-9* para algunas proteasas de serina; sin embargo no habían realizado los ensayos adecuados para proponer un mecanismo ¹⁷¹. Por esto, nos interesaba estudiar el mecanismo de inhibición de *EgKU-9* para lo cual elegimos la quimotripsina- α bovina, enzima para la cual *EgKU-9* es un inhibidor de alta afinidad. Para esto, como se explica en la sección 3.3.2 de Materiales y Métodos, realizamos el análisis de los cursos temporales de formación de producto en presencia de concentraciones relativamente altas de inhibidor (próximas a pseudo primer orden), sin incubar previamente el inhibidor con la enzima. En la suposición que ambas variantes se comportan de la manera similar, se trabajó solamente con *EgKU-9C*, al cual se referirá como *EgKU-9* para facilitar la lectura.

Los gráficos de los cursos temporales para la inhibición de la quimotripsina- α bovina muestran cómo cambia la pendiente en el tiempo, hasta que se estabiliza una vez que se alcanza el equilibrio entre la enzima y el inhibidor. Este comportamiento en el tiempo muestra que *EgKU-9* es un inhibidor lento (Figura 41).

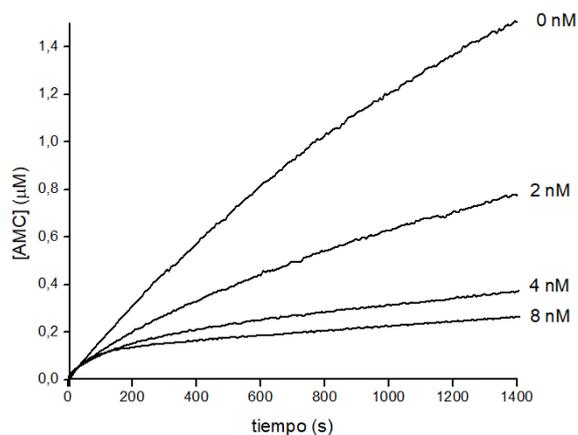


Figura 41. Gráfico representativo de los cursos temporales de la inhibición de la quimotripsina bovina por *EgKU-9*. Se muestran algunos cursos temporales. Se registró la aparición de producto inmediatamente después del agregado de quimotripsina (1 nM) a la mezcla de sustrato (N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC, 5 μM) y concentraciones crecientes de *EgKU-9* (números que se indican al final de cada curso temporal).

De los gráficos de cursos temporales se también se pudo apreciar que *EgKU-9* es un inhibidor reversible de la quimotripsina bovina ya que se observa actividad enzimática incluso a concentraciones mayores a la estequiométrica de inhibidor una vez alcanzado el equilibrio entre la enzima y el inhibidor.

A partir de los ajustes de los cursos temporales con la Ecuación 7, se determinaron las constantes exponenciales (k_{obs}) para diferentes concentraciones de inhibidor. Se graficaron los valores de k_{obs} vs $[I]$. Los resultados mostraron que el mecanismo de inhibición involucraba dos pasos reversibles consecutivos, siendo el primero rápido en relación al segundo (Esquema 4), por lo que k_{obs} se relaciona con las constantes cinéticas k_2 y k_{-2} y con el equilibrio de disociación del primer paso K_I ($K_I = k_{-1}/k_1$) por la Ecuación 8, hiperbólica (Figura 42).

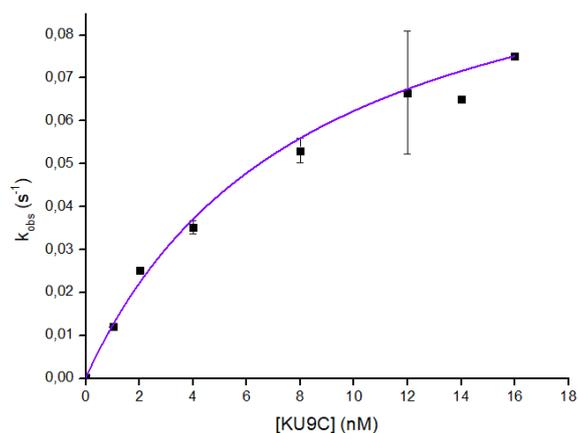


Figura 42. Efecto de la concentración de *Eg*KU-9 sobre la constante exponencial. Cada punto representa el promedio y desvío estándar de valores de k_{obs} de dos medidas independientes, obtenidos a partir del mejor ajuste de los cursos temporales a la Ecuación 7. Con la línea violeta se representa el mejor ajuste a la ecuación hiperbólica (Ecuación 8), que corresponde al mecanismo de inhibición del Esquema 4.

Del ajuste de los datos de k_{obs} vs $[I]$ a la Ecuación 8 se determinaron las constantes K_I (k_{-1}/k_1) y k_2 . Como los valores de k_{-2} son muy pequeños, no se pudieron determinar a partir de este ajuste. k_{-2} fue determinada utilizando la Ecuación 9. A partir de los valores de k_2 , k_{-2} y K_I se corroboró el valor de K_I^* utilizando la Ecuación 10. En la Tabla 8 se muestran los valores de K_I , k_2 , k_{-2} y K_I^* obtenidos.

constantes	valores
K_I (M)	$7.2 \pm 0.8 \times 10^{-9}$
k_2 (s^{-1})	$11.4 \pm 0.4 \times 10^{-2}$
k_{-2} (k_{off}) (s^{-1})	$4.4 \pm 0.8 \times 10^{-4}$
k_2/K_I (k_{on}) ($M^{-1} s^{-1}$)	$1.6 \pm 0.2 \times 10^7$
K_I^* (M)	$2.8 \pm 0.6 \times 10^{-11}$

Tabla 8. Constantes cinéticas (k_2 y k_{-2}), constantes de equilibrio (K_I) de disociación del complejo enzima-inhibidor, y constantes globales de inhibición (K_I^*) de *Eg*KU-9 recombinante frente a la quimotripsina- α bovina. Los valores corresponden a un experimento con su respectivo error estándar.

Al comparar los valores de la constante aparente de segundo orden para la formación del complejo estable EI^* (k_{on}), es decir los valores de k_2/K_I , obtenidos para *Eg*KU-9 ($10^7 M^{-1} s^{-1}$) con valores conocidos previamente ($10^6 M^{-1} s^{-1}$ para *Eg*KU-3, *Eg*KU-8 y para el BPTI con sus respectivos sustratos) se deduce que el complejo estable entre la enzima y el inhibidor se forma más rápidamente en el caso de *Eg*KU-9 que de los restantes inhibidores discutidos. En tanto, el valor de k_{-2} , que es la constante cinética del paso más lento de disociación enzima-inhibidor, y en este sistema se comporta como la constante aparente de primer orden para la disociación del complejo estable EI^* (k_{off}), es para *Eg*KU-9 del orden de $10^{-6} s^{-1}$, similar al reportado para *Eg*KU-8 y *Eg*KU-3 ¹⁶⁷ y varios órdenes mayor que el del BPTI ($10^{-8} s^{-1}$ ¹⁹¹). Esto indica que el complejo *Eg*KU-9 con la quimotripsina bovina

es tan estable como el que forma *EgKU-8* con la tripsina y *EgKU-3* también con la quimotripsina.

El valor de K_i^* obtenido a partir de los cursos temporales de la inhibición fue igual al obtenido a partir del ajuste a la ecuación de Morrison.

McManus y colaboradores estudiaron algunos parámetros de la cinética de inhibición de *EgKU-9* recombinante ¹⁷¹. Este grupo determinó constantes de inhibición para la elastasa de neutrófilos ($K_i^* 10^{-11}$ M), la catepsina G ($K_i^* 10^{-10}$ M), la quimotripsina bovina ($K_i^* 10^{-9}$ M) y la elastasa pancreática porcina ($K_i^* 10^{-9}$ M). Nuestros resultados sin embargo indican que *EgKU-9* inhibe la quimotripsina bovina y la elastasa porcina con una mayor potencia que la informada por el grupo de McManus. Estas diferencias probablemente se deban a que este grupo ajustó los gráficos de velocidad inicial en función de concentración de inhibidor a la ecuación para inhibidores clásicos y no a la ecuación de Morrison para inhibidores de alta afinidad ¹⁷¹. Además, no utilizan concentraciones altas de inhibidor que habrían permitido observar la fase correspondiente a la velocidad de inhibición máxima, en la que la velocidad se mantiene constante aun agregando más inhibidor. Por otra parte, McManus y colaboradores afirman que *EgKU-9* no es un inhibidor lento, y sin embargo no muestran experimentos que apoyen esta afirmación.

En suma, nuestros resultados nos permiten afirmar que *EgKU-9* es un inhibidor lento de alta afinidad de la quimotripsina bovina y de la elastasa porcina. *EgKU-9* es un inhibidor más potente de la quimotripsina bovina que de las quimotripsinas caninas, o al menos de una de ellas, lo que sugiere que su(s) blanco(s) fisiológico(s) podría(n) ser quimotripsina(s) de ungulados. Esto concordaría con sus altos niveles de expresión en la oncosfera, que es el estadio de *E. granulosus* que entra directamente en contacto con la luz intestinal del hospedero intermediario luego de la eclosión del huevo, lugar anatómico al cual se vuelcan las proteasas de serina digestivas. *EgKU-9* podría entonces interferir con la actividad proteolítica de la quimotripsina y de la elastasa presentes en la luz intestinal y contribuir al inicio de la infección en el hospedero intermediario. Además de esta función, *EgKU-9* podría contribuir a la sobrevivencia de la oncosfera durante el establecimiento en los tejidos internos, gracias a su actividad inhibidora de proteasas de neutrófilos ¹⁷¹.

4.3. Control de las producciones de inhibidores Kunitz recombinantes, inhibidores comerciales y vehículos en términos de inducción de citoquinas y nitritos en BMDM

Se esperaba que las preparaciones de las proteínas Kunitz recombinantes producidas en bacterias contuvieran LPS y otros contaminantes bacterianos. El LPS y otros productos de origen bacteriano son detectados por TLRs y otros PRRs expresados en células mieloides aun cuando están presentes a muy baja concentración, generando cambios importantes en las células. Por esto, la presencia de productos bacterianos es incompatible con ensayos funcionales en células mieloides. Específicamente, en el caso de los ensayos realizados en esta Tesis, una contaminación cuantitativamente importante con LPS era incompatible, en primer lugar porque se planteaba ensayar la modulación por los *EgKUs* de la activación de macrófagos inducida por LPS, y en segundo lugar porque se planteaba

estudiar efectos sobre la proliferación, y es sabido que el LPS inhibe la proliferación de macrófagos ¹⁹². Por todo lo anterior, se propuso poner a punto condiciones de purificación y conservación que permitieran obtener los inhibidores Kunitz recombinantes lo suficientemente libres de endotoxinas para usar en ensayos funcionales con macrófagos. Para esto se tomaron una serie de precauciones, que se detallan a continuación. Las soluciones amortiguadoras utilizadas durante el intercambio iónico, paso final de purificación, fueron preparadas en agua para inyectables y filtradas por 0.22 μm . Al finalizar la purificación, las proteínas fueron filtradas por 0.22 μm en cámara de flujo y almacenadas en un amortiguador preparado con agua para inyectables, en presencia de antibiótico-antimicótico, a 4°C. Además, a modo de prueba, para las producciones iniciales, se tomó aproximadamente un tercio del volumen total de la producción de cada proteína Kunitz y se realizó un paso de purificación adicional sobre una columna con matriz de polimixina B, que une LPS ¹⁹³.

Como se introdujo previamente, no se conocen agonistas de TLR proteicos que deriven de helmintos. En la expectativa entonces de que las proteínas *EgKU* por sí mismas no inducirían respuestas de citoquinas en los macrófagos, y para evaluar funcionalmente la presencia de endotoxinas en las producciones recombinantes, como se detalla en la Sección 3.4.2 de Materiales y Métodos, se analizó en éstas la capacidad de inducir en BMDM las citoquinas IL-6, IL-12/23p40 (subunidad p40 presente en la IL-12 e IL-23) e IL-10 (ver Sección 3.4.1.3 de Materiales y Métodos). En paralelo se analizaron las preparaciones de inhibidores comerciales también utilizados en esta Tesis.

Al comparar para las producciones iniciales los niveles de citoquinas inducidos por las muestras antes y después de pasar por la columna de polimixina B, se observó que estos no diferían significativamente (datos no mostrados), por lo que se descartó este paso de purificación para siguientes producciones.

En la Figura 43 se muestra la producción de citoquinas por BMDM condicionados con *EgKU*-1, *EgKU*-3 y *EgKU*-4 recombinantes e inhibidores comerciales.

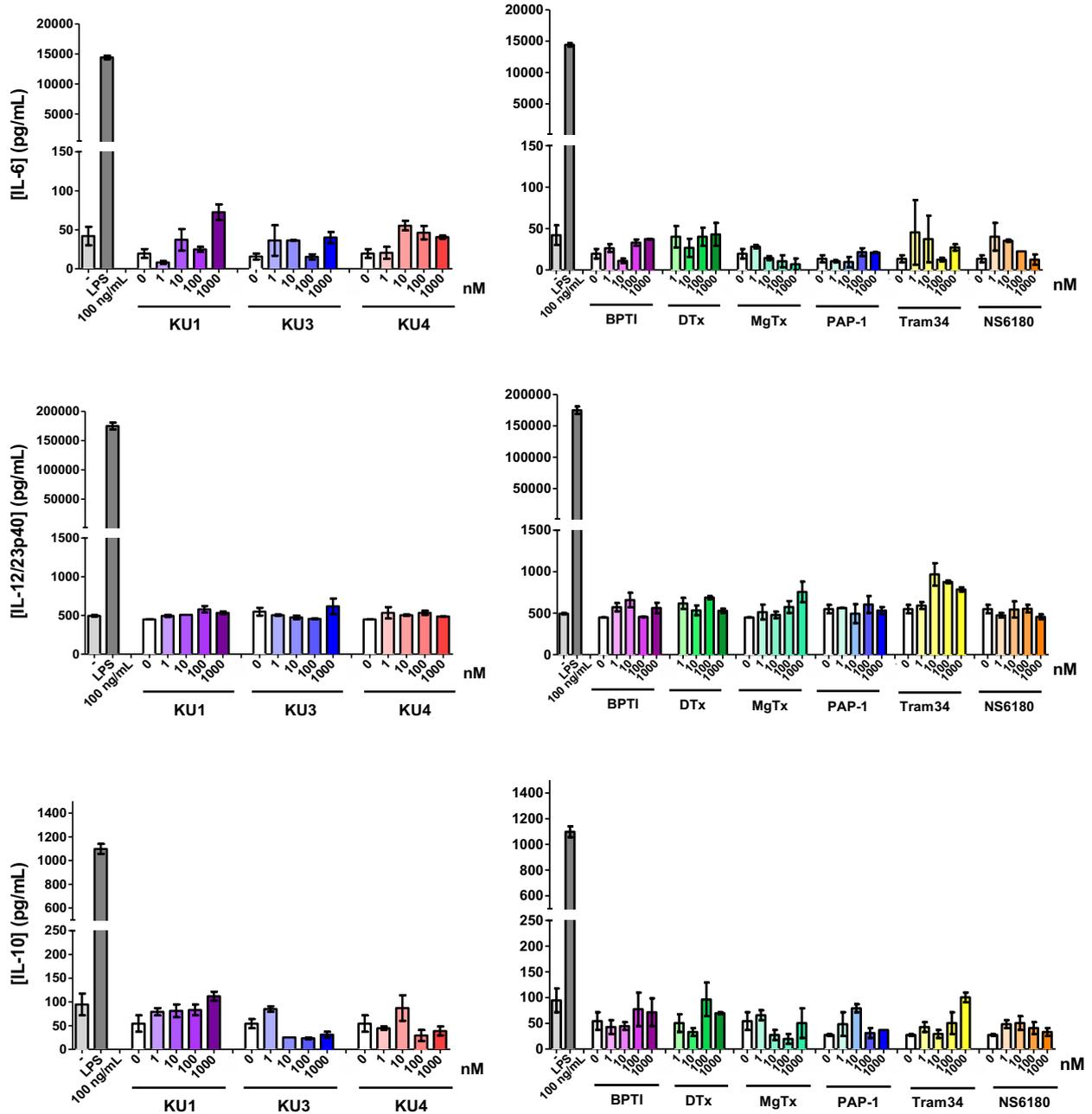


Figura 43. Inducción de citoquinas en BMDM estimulados con los inhibidores Kunitz recombinantes e inhibidores comerciales. Se incubaron 0.2×10^6 BMDM por pocillo con 100 ng/mL de LPS o los inhibidores Kunitz recombinantes (gráficas a la izquierda) o los inhibidores comerciales (gráficas a la derecha), durante 18 horas. A tiempo cumplido, se midió la concentración de IL-6, IL-12/23p40 e IL-10 en los sobrenadantes por ELISA. El experimento se realizó una vez con pocillos duplicados. Las gráficas muestran mediana +/- rango de la concentración de citoquinas. La concentración indicada como "0" para cada estímulo corresponde a células incubadas solamente con el vehículo en el que se encuentra el estímulo. Además se presentan datos correspondientes a células incubadas en medio solamente (-). La nomenclatura "KU" equivale a "EgKU".

EgKU-1, *EgKU-3* y *EgKU-4* agregados a BMDM en concentraciones de hasta 1 μ M no parecieron inducir cantidades significativas de citoquinas, lo que indica que pueden

ser utilizados para ensayos funcionales sobre BMDM. Los inhibidores comerciales tampoco indujeron citoquinas.

También se evaluó la producción de nitritos por reacción de Griess en las producciones de inhibidores Kunitz recombinantes y en los inhibidores comerciales. Ninguna de las muestras pareció inducir nitritos en BMDM hasta una concentración de 1 μM (datos no mostrados).

En la Figura 44 se muestra la producción de citoquinas por BMDM condicionados con *Eg*KU-9L y *Eg*KU-9C recombinantes

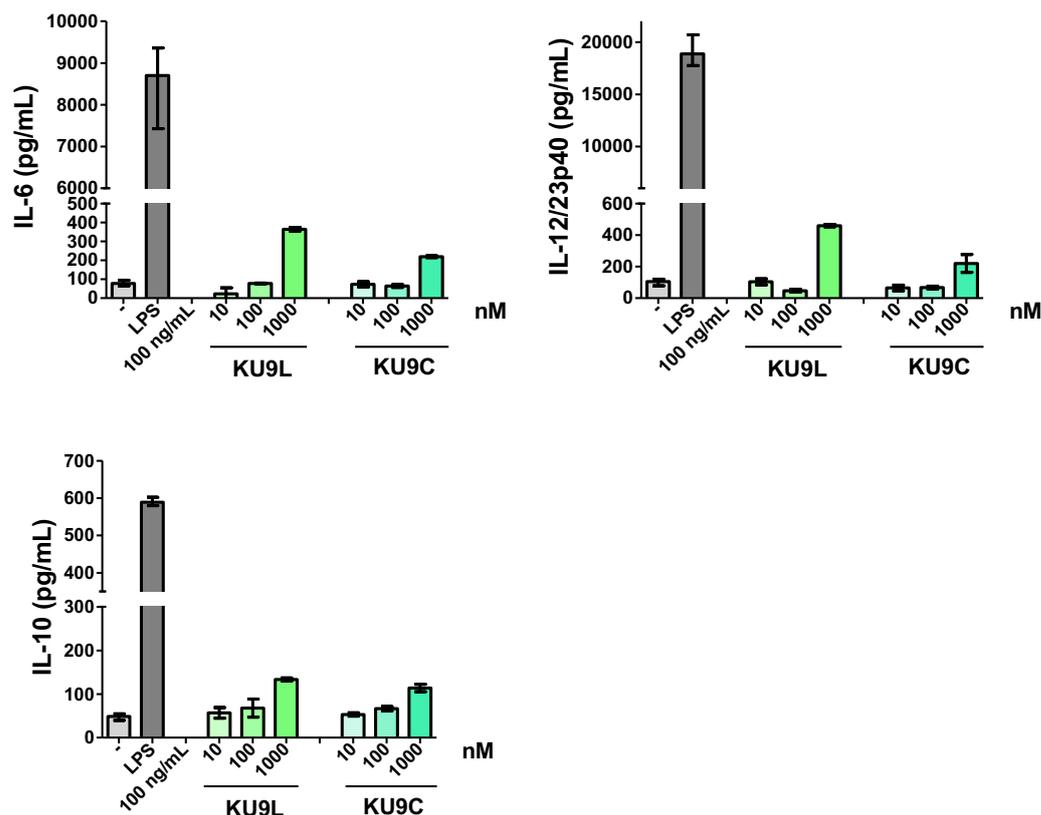


Figura 44. Inducción de citoquinas en BMDM estimulados con *Eg*KU-9L y *Eg*KU-9C recombinantes. Se incubaron 0.2×10^6 BMDM por pocillo con 100 ng/mL LPS o los inhibidores Kunitz recombinantes durante 18 horas. A tiempo cumplido, se midió la concentración de IL-6, IL-12/23p40 e IL-10 en los sobrenadantes por ELISA. El experimento se realizó una vez con pocillos duplicados. Las gráficas muestran mediana +/- rango de la concentración de citoquinas.

Las producciones de *Eg*KU-9L y *Eg*KU-9C agregadas a BMDM en concentraciones de hasta 100 nM no parecieron inducir cantidades significativas de las citoquinas antes mencionadas; sin embargo, a la concentración de 1 μM , ambas producciones indujeron niveles de citoquinas superiores a los basales. El hecho de que las muestras de *Eg*KU-9L/C aparentemente presentaran niveles de endotoxinas mayores que las producciones de *Eg*KU-1, *Eg*KU-3 y *Eg*KU-4 se puede relacionar con que se obtuvieron preparaciones menos concentradas de *Eg*KU-9L/C que del resto de las proteínas Kunitz; por lo tanto, las células debieron ser estimuladas con volúmenes mayores de las preparaciones de *Eg*KU-9L/C, en los que es posible que

estuviera presente una cantidad mayor de endotoxinas. En concordancia con esta hipótesis, *EgKU-9L*, que resultó ser la producción de *EgKU-9* menos concentrada, indujo más citoquinas que *EgKU-9C*. Por otra parte, las construcciones para la expresión de *EgKU-9L/C* fueron distintas a las empleadas para la expresión de *EgKU-1/3/4*; *EgKU-9L/C* por ejemplo fueron producidas como proteínas de fusión, por lo que resulta difícil explicar las diferencias en los niveles de endotoxinas simplemente por diferencias en las concentraciones de las preparaciones finales. A su vez, unos mayores niveles de endotoxinas en la muestra de *EgKU-9L* en relación a la de *EgKU-9C* podrían deberse a que el último paso de purificación de *EgKU-9L* fue un intercambio aniónico, mientras que para *EgKU-9C* este paso fue un intercambio catiónico. Durante el intercambio aniónico se espera que las moléculas de LPS cuya densidad de carga es mayormente negativa, se unan a la matriz de la columna, y eluyan con el gradiente de NaCl, en forma parcial o totalmente solapada con la proteína recombinante. En cambio, durante un intercambio catiónico se espera que la proteína recombinante se obtenga separada del LPS. Para próximas producciones sería conveniente utilizar un amortiguador una unidad de pH por debajo del punto isoeléctrico de la proteína recombinante, de modo de poder realizar intercambios catiónicos, que contribuyan a eliminar el posible LPS presente en las muestras.

Como se mencionó en la Introducción, nuestro grupo no fue el primero en producir *EgKU-9C* de manera recombinante. McManus y colaboradores también produjeron *EgKU-9C* en bacterias ¹⁷¹, y sin embargo realizaron solamente un paso de purificación por IMAC y no tuvieron precauciones para reducir la cantidad de endotoxinas presentes en la preparación final. Ellos estimaron, mediante el test de LAL (del inglés *Limulus amoebocyte lysate*), que 200 µL de preparación 15 µM de proteína recombinante contenían 12 µg de LPS. Si nuestras preparaciones contuvieran el nivel de endotoxinas estimado para las de McManus y colaboradores, a la concentración más alta de *EgKU-9C* empleada en nuestros ensayos (1 µM), estaríamos agregando 4 µg/mL de LPS. Tomando en cuenta que en nuestros ensayos se busca ver un efecto de los inhibidores sobre la respuesta de BMDM estimulados con 100 ng/mL de LPS, resultaría impensable trabajar con muestras que contuvieran 40 veces más LPS que nuestro control. Si bien no realizamos el test de LAL sobre nuestras producciones, las producciones de *EgKU-9C* ensayadas a 1 µM indujeron 4 veces menos IL-10, 24 veces menos IL-6, y 40 veces menos IL-12/23p40 que el estímulo de 100 ng/mL de LPS. Estos resultados nos aseguran que nuestras producciones a la concentración de 1 µM contenían niveles mucho menores a 100 ng/mL de LPS. El contraste aparente entre los niveles de endotoxinas en las producciones de *EgKU-9C* de ambos grupos sugiere que el uso de agua para inyectables en los amortiguadores utilizados durante este último paso y el filtrado y almacenamiento de las proteínas en condiciones de esterilidad y en presencia de antibiótico-antimicótico fueron importantes para reducir significativamente los niveles de endotoxinas.

En suma, podemos decir que se lograron poner a punto condiciones de purificación y conservación de proteínas recombinantes producidas en bacterias tales que las preparaciones finales pueden ser empleadas en un amplio rango de concentraciones en ensayos con células del sistema inmune.

4.4. Efectos sobre la respuesta de BMDM a agonista de TLR

Como se explicó en la Sección 1.1 de la Introducción, los ensayos *in vitro* que estudian efectos de moléculas de helmintos sobre células mieloides suelen incluir evaluaciones de la capacidad de dichas preparaciones de modificar la maduración convencional inducida por agonistas de TLRs ^{1, 10}. En este sentido, si bien el LPS no debería estar presente en la infección por *E. granulosus*, en esta Tesis esta molécula fue empleada como ligando de TLR modelo; en otras palabras, el LPS se usó con el objetivo de generar la activación inicial de los BMDM y poder evaluar efectos de las proteínas Kunitz de *E. granulosus* sobre esta activación.

En estos ensayos se emplearon tres de los inhibidores Kunitz producidos de manera recombinante en esta Tesis. Se trabajó con *EgKU-1* y *EgKU-4*, bloqueantes de K_v y ASIC, y *EgKU-3*, inhibidor de quimotripsina, en un rango de concentraciones desde 1 nM hasta 1 μ M. *EgKU-9*, que fue producido hacia el final del trabajo de Tesis, no pudo ser ensayado con los BMDM en el contexto de esta Tesis; el inhibidor queda disponible para futuros experimentos con células a ser realizados por el grupo.

Es importante destacar que se desconoce qué miembros de la familia de canales K_v bloquean *EgKU-1* y *EgKU-4*, ya que en los ensayos de *whole-cell patch-clamp* en neuronas de ganglio dorsal de rata se evaluaron las corrientes totales de K^+ generadas por cambios en el voltaje, y estas corrientes pueden corresponder a diferentes miembros de la familia K_v . Lo mismo sucede con el bloqueo de ASIC ¹⁶⁷. También se desconoce si los inhibidores Kunitz estudiados en esta Tesis bloquean canales distintos a K_v , ASIC o Na_v , ya que en los ensayos de *whole-cell patch-clamp* solamente se evaluaron efectos sobre estos tres tipos de canales. Así, no se puede descartar por ejemplo la posibilidad de bloqueo de canales del tipo K_{Ca} . Por esto, se utilizaron a modo de comparación para obtener información mecánica, inhibidores comerciales, también en un rango de concentraciones desde 1 nM hasta 1 μ M. Para elegir estos inhibidores se tomó en cuenta que, como se explicó en la Introducción, en BMDM las corrientes de K^+ inducidas por cambios en el voltaje están reguladas por los canales $K_v1.3$ y $K_v1.5$ (y adicionalmente $K_{ir2.1}$), y la estimulación de BMDM con LPS induce expresión de $K_v1.3$ y aumenta las corrientes de eflujo de K^+ ¹²⁴. Se empleó entonces la margatoxina (MgTx), una toxina de escorpión que a las concentraciones utilizadas en esta Tesis bloquea $K_v1.1$, 1.2 y 1.3 ¹⁹⁴. También se utilizó el 5-(4-phenoxibutoxi)psoraleno (PAP-1), un inhibidor químico selectivo para $K_v1.3$ a concentraciones de 1 y 10 nM, que además bloquea $K_v1.5$ a partir de 100 nM y otros canales de la familia K_v a partir de 1 μ M ¹⁹⁵. Si bien en BMDM no se han estudiado funciones de $K_{Ca3.1}$, consideramos la posibilidad que este canal participe en la activación de estas células, dado que ha sido implicado en diversos aspectos de la activación de macrófagos en otros modelos ^{131-133, 135-137}. Por ello, también ensayamos el triarilmetano-34 (Tram34) y la benzotiazinona NS6180, bloqueantes de $K_{Ca3.1}$ selectivos a concentraciones menores a 1 μ M, (y que a 1 μ M tienen leves efectos sobre otros canales del tipo K_{Ca} , así como sobre K_v y Na_v) ^{196, 197}. Además se empleó el BPTI y la α -DTx como modelos de inhibidores tipo Kunitz de proteasas de serina y de canales, respectivamente. La α -DTx bloquea los canales $K_v1.1$, 1.2 y 1.6 ¹⁵⁴, que en un principio no estarían expresados en BMDM ni participarían la activación de células del sistema inmune ^{119, 124}. No disponíamos de bloqueantes de $K_{ir2.1}$ ni de ASIC, pero habría sido conveniente incluirlos.

En los primeros ensayos se estimularon BMDM durante 18 horas con LPS junto con los inhibidores Kunitz o los inhibidores comerciales, y se cuantificó por ELISA en los sobrenadantes la producción de moléculas inducidas por el LPS: las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-6 e IL-12/23p40, y la anti-inflamatoria IL-10 (Figura 45) (ver Sección 3.4.1.3 de Materiales y Métodos). Los BMDM no produjeron TNF- α , por lo que estos resultados no se muestran en la Tesis. Además, se analizó la producción de NO, cuantificado en términos de NO₂⁻, en los sobrenadantes, por reacción de Griess (Figura 46) (ver Sección 3.4.1.4 de Materiales y Métodos).

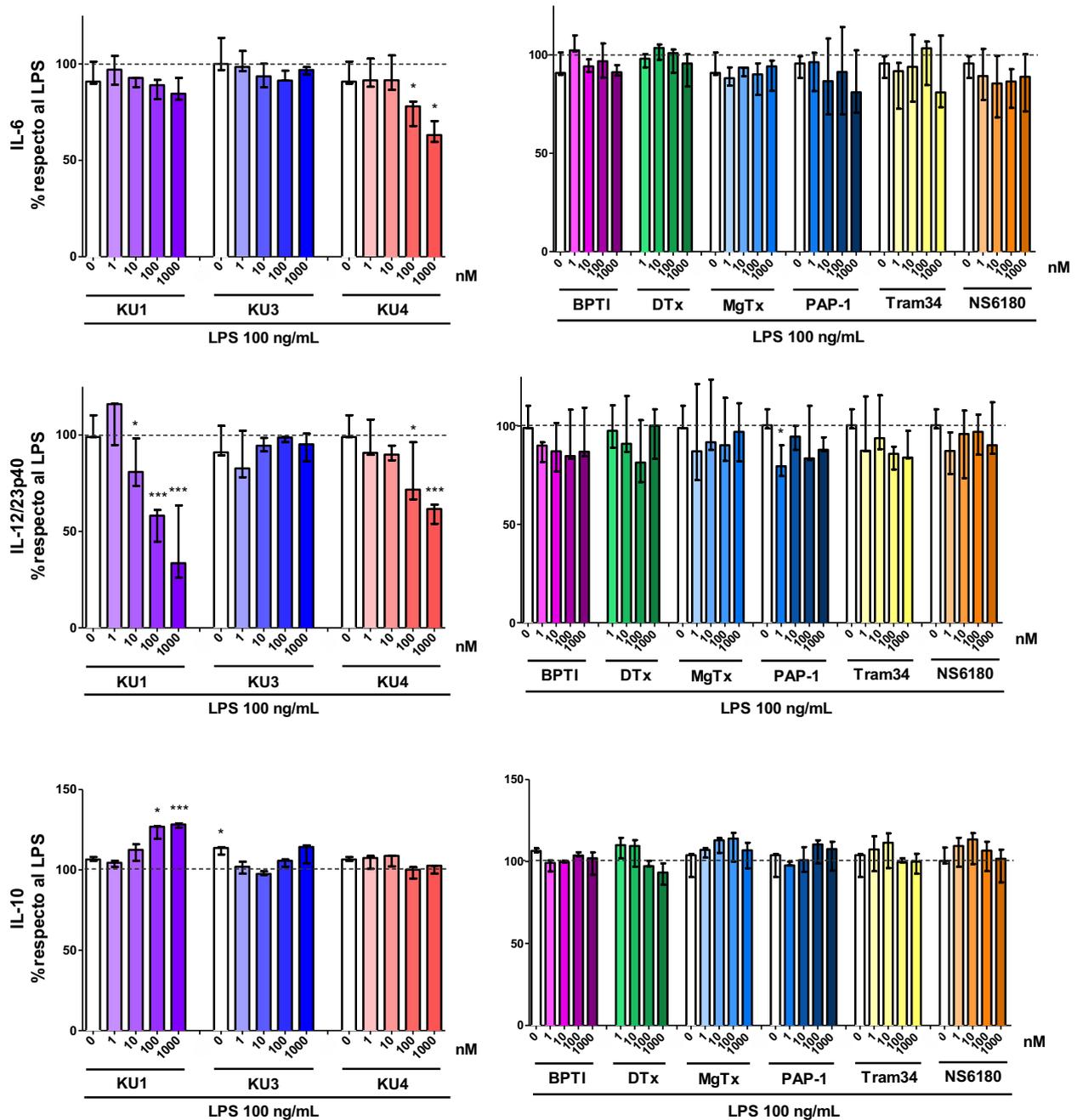


Figura 45. Producción de citoquinas en BMDM estimulados con LPS en presencia de inhibidores Kunitz recombinantes o inhibidores comerciales. Se incubaron 0.2×10^6 BMDM por pocillo con 100 ng/mL LPS, solamente o en presencia de los inhibidores Kunitz (gráficos a la izquierda) o los inhibidores comerciales (gráficos a la derecha), durante 18 horas. A tiempo cumplido, se midió la concentración de IL-6, IL-12/23p40 e IL-10 en los sobrenadantes por ELISA. Se muestra el promedio de 3 experimentos independientes, normalizados con respecto a la condición de células estimuladas con LPS en ausencia de otros estímulos (correspondiente al 100%, indicado con una línea punteada). Las gráficas muestran mediana +/- rango de los tres experimentos normalizados. La concentración indicada como "0" para cada estímulo corresponde a células incubadas solamente con el vehículo en el que se encuentra el estímulo. Se aplicó sobre los datos crudos (sin normalizar) el test no paramétrico de dos vías de Friedman, con pos-test de Conover, sobre el cual se realizó la corrección de Bonferroni. Los símbolos * indican diferencias con respecto a la

condición de células estimuladas con LPS solamente; uno, dos o tres símbolos corresponden a $p < 0,05$, $p < 0,01$ o $p < 0,001$, respectivamente.

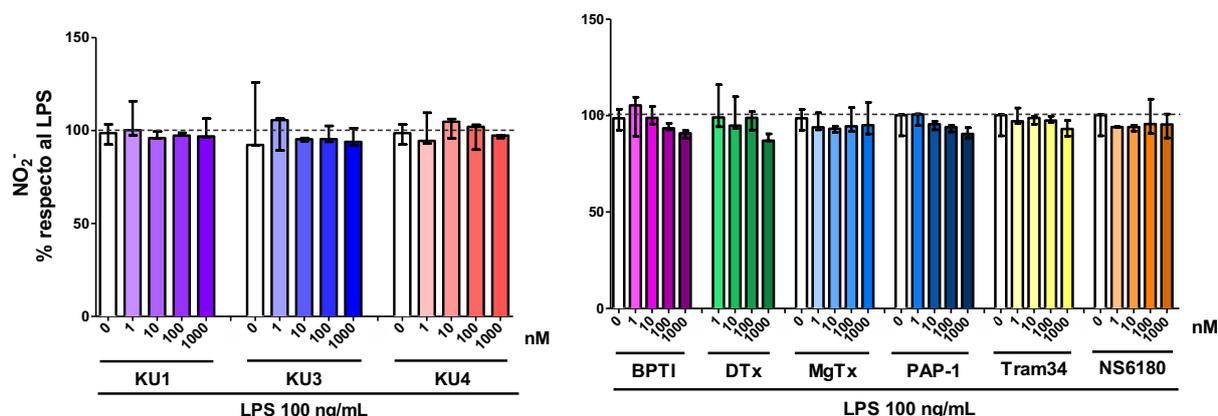


Figura 46. Producción de nitrito en BMDM estimulados con LPS en presencia de inhibidores Kunitz recombinantes o inhibidores comerciales. Se incubaron 0.2×10^6 BMDM por pocillo con 100 ng/mL LPS, solamente o en presencia de los inhibidores Kunitz (gráfico a la izquierda) o los inhibidores comerciales (gráfico a la derecha), durante 18 horas. A tiempo cumplido se midió la concentración de NO_2^- en los sobrenadantes por reacción de Griess. Se muestra el promedio de 3 experimentos independientes normalizados con respecto a la condición de células estimuladas con LPS en ausencia de otros estímulos (correspondiente al 100%, indicado con una línea punteada). Las gráficas muestran mediana \pm rango de los tres experimentos normalizados. Se aplicó sobre los datos crudos (sin normalizar) el test de Friedman con pos-test de Conover y corrección de Bonferroni.

EgKU-1 causó un aumento en la producción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 y una disminución en la producción de la citoquina pro-inflamatoria IL-12/23p40. En tanto, *EgKU-4* inhibió la producción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-12/23p40 e IL-6. Los efectos mencionados fueron observados a concentraciones de 100 nM y 1 μM de *EgKU-1* y/o *EgKU-4*. La inhibición de la producción de la IL-12/23p40 por *EgKU-1* fue observada también a 10 nM. No se observaron efectos en la producción de nitrito.

Nos interesaba además analizar la expresión de marcadores de superficie asociados a la activación clásica de los macrófagos. Para esto se estimularon BMDM durante 18 horas con 100 ng/mL de LPS y los inhibidores Kunitz o inhibidores comerciales a concentraciones de 10 y 100 nM, y se analizó la expresión de moléculas co-estimuladoras: CD40 y CD86, y la expresión de MHCII, por citometría de flujo (ver Sección 3.4.1.2 de Materiales y Métodos). Los BMDM no expresaron CD40, por lo que estos resultados no se muestran en esta Tesis. En la Figura 47 se muestra la estrategia de *gating* para este ensayo.

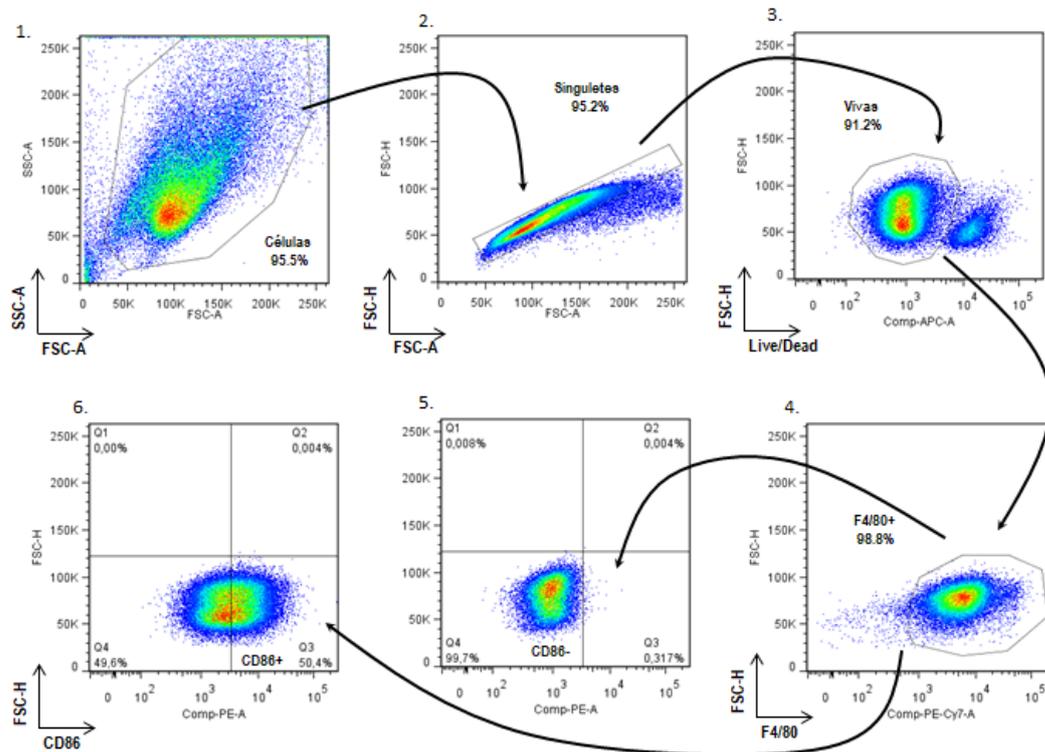


Figura 47. Estrategia de *gating* utilizada en el análisis de los ensayos de expresión de moléculas de superficie. Se muestra la estrategia de marcado y clasificación que se utilizó para definir la población celular de interés y evaluar la expresión de CD40, CD86 y MHCII sobre esa población. 1. Se seleccionaron las células; 2. Se seleccionaron los singuletes; 3. Se seleccionaron las células vivas; 4. Se seleccionaron los macrófagos en términos de células F4/80⁺. 5. Se analizaron los controles FMO para las células sin estímulos y para las células estimuladas con LPS, este último utilizado como control FMO para todas las muestras de células tratadas con LPS en ausencia o presencia de inhibidores. 6. A partir del control FMO se seleccionaron en las muestras problema las células positivas para el marcador determinado. Además se evaluaron los niveles de expresión de los marcadores en términos de media geométrica de la intensidad de la fluorescencia, sobre la población de células positivas para cada marcador (Figura 6). En los cuadrantes 5 y 6 se muestra solo uno de los controles FMO y una muestra problema, respectivamente, correspondientes a la estrategia de *gating* para la molécula CD86.

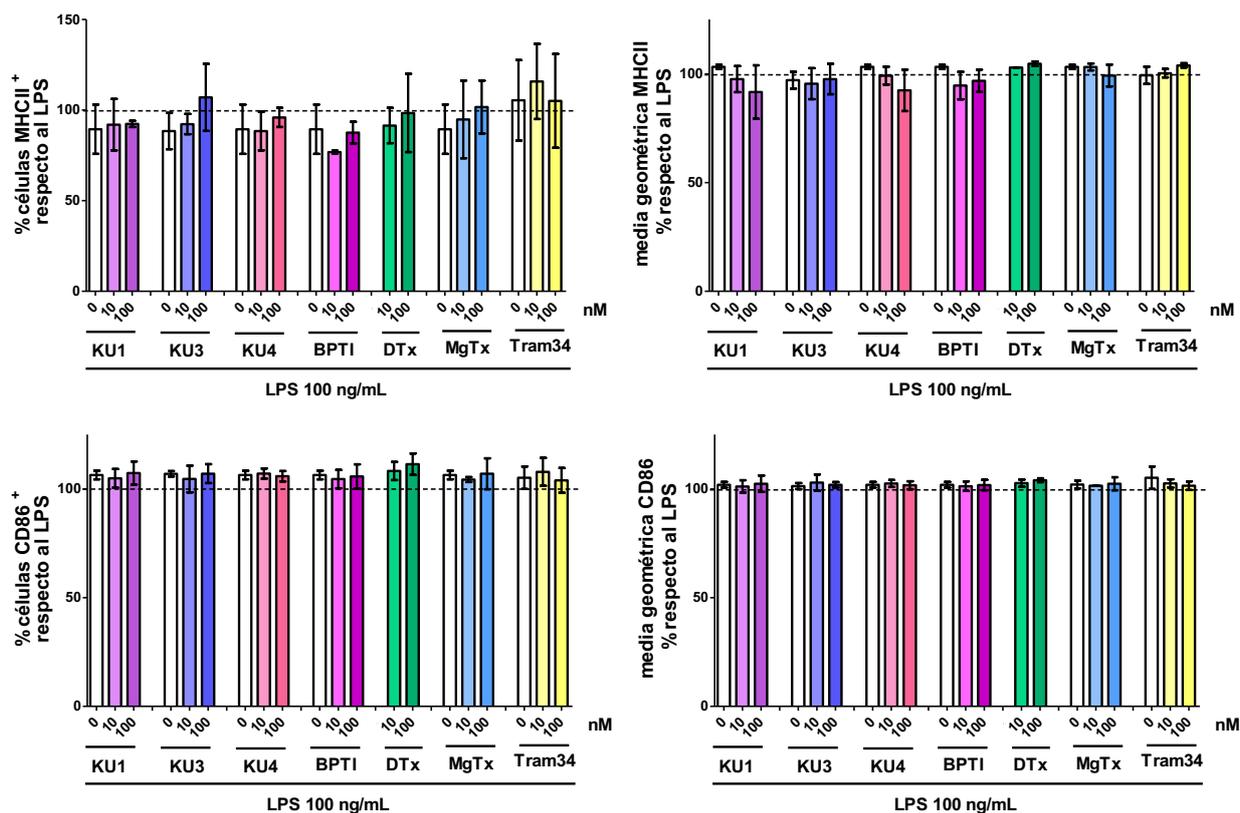


Figura 48. Expresión de marcadores de superficie de BMDM estimulados con LPS en presencia de inhibidores Kunitz recombinantes o inhibidores comerciales. Se incubaron 0.2×10^6 BMDM por pocillo con 100 ng/mL LPS, solamente o en presencia de los inhibidores Kunitz o los inhibidores comerciales, durante 18 horas. A tiempo cumplido, se cuantificó la expresión de CD40 (datos no mostrados), CD86 y MHCII por citometría de flujo. Se muestra el promedio de 2 experimentos independientes, normalizados con respecto a la condición de células estimuladas con LPS en ausencia de otros estímulos (correspondiente al 100%, indicado con una línea punteada). Las gráficas muestran mediana +/- rango de los dos experimentos normalizados. La concentración indicada como "0" para cada estímulo corresponde a células incubadas solamente con el vehículo en el que se encuentra el estímulo. Se aplicó sobre los datos crudos (sin normalizar) el test de Friedman con pos-test de Conover, sobre el cual se realizó la corrección de Bonferroni.

Ni los inhibidores Kunitz recombinantes ni los inhibidores comerciales modificaron la respuesta de los BMDM al LPS en términos de moléculas de superficie estudiadas. Es importante destacar que el porcentaje de células que expresaron la molécula MHCII fue de entre un 2 a un 4%, por lo que la ventana de respuesta era muy pequeña. La respuesta de las células al LPS en cuanto a expresión de CD86 en cambio fue de entre un 40 a un 60%.

Considerando que utilizamos proteínas *EgKU* que inhiben canales catiónicos (K_v y ASIC) así como otra que actúa sobre proteasas de serina, en principio se podrían haber observado efectos sobre la activación de BMDM inducida por LPS dependientes tanto de uno como de otro tipo de blanco. El hecho de que en estos ensayos se hayan observado efectos únicamente de *EgKU-1* y *EgKU-4*, que como se mencionó, son bloqueantes de K_v y ASIC, y no de *EgKU-3*, que no posee esta

actividad, apoya la idea de que los efectos observados sean consecuencia del bloqueo de canales. La modulación ejercida por *EgKU-1* y *EgKU-4* no fue imitada por los inhibidores comerciales agregados en forma individual, de lo que se deduce que estas proteínas ejercerían los efectos observados sobre citoquinas a través de blancos diferentes o adicionales a $K_v1.1$, 1.2, 1.3, 1.5, 1.6 y $K_{Ca}3.1$. Esto abre la posibilidad de que *EgKU-1* y/o *EgKU-4* actúen a través de ASIC o $K_{ir}2.1$ y/u otros canales.

Si bien *EgKU-1* y *EgKU-4* son bloqueantes de ASIC, en el planteo esta Tesis consideramos prioritariamente los posibles efectos a través del bloqueo de K_v , ya que los ASIC participarían en la activación de células inmunes inducida por pH ácido, y no por ligandos de TLR ¹⁹⁸. Sin embargo, dado que durante la activación de los macrófagos estas células adquieren un metabolismo principalmente glucolítico, con producción de ácido láctico ¹⁹⁹, no descartamos que exista un componente de activación causado por esta acidosis en el medio de cultivo, y que *EgKU-1* y *EgKU-4* pudieran estar teniendo efectos por bloqueo de ASIC en este contexto. Aunque esta posibilidad explicaría el hecho de que ninguno de los inhibidores comerciales de K_v ni $K_{Ca}3.1$ haya imitado los efectos de *EgKU-1* y *EgKU-4*, ensayos preliminares realizados en esta Tesis indicaron que estos Kunitz no inhiben la activación de BMDC inducida por acidosis (datos no mostrados). De todas formas no podemos descartar la posibilidad de que *EgKU-1* y/o *EgKU-4* tengan funciones sobre ASIC implicados en la activación en BMDM.

Otra posibilidad es que el bloqueo de un único canal no sea suficiente para generar efectos fenotípicos sobre la activación de los macrófagos, y que *EgKU-1* y/o *EgKU-4* estén bloqueando más de un canal, generando así efectos que no son imitados por los inhibidores comerciales de manera separada, pero que tal vez sean imitados por combinaciones de estos u otros inhibidores. En linfocitos T, por ejemplo, $K_v1.3$ y $K_{Ca}3.1$ actúan en conjunto para mantener el potencial electrostático necesario para el influjo de calcio luego de estimulación del TCR ¹¹⁹.

Además de los canales mencionados, otros canales de potasio han sido implicados en aspectos de la activación de BMDM. Como se mencionó en la Introducción, recientemente se identificó el canal de K^+ de doble poro (K_{2P}), TWIK2, como el responsable del elujo de K^+ durante la activación del inflammasoma NLRP3 por ATP en BMDM ¹³⁰. Ensayos preliminares realizados en el contexto de esta Tesis parecieron indicar que *EgKU-1* y *EgKU-4* no son capaces de inhibir la activación del inflammasoma NLRP3 inducida por ATP ni por alúmina, en BMDC. Sin embargo, dada la diferencia en los canales implicados en la activación del inflammasoma NLRP3 en distintos modelos celulares ^{130, 131}, sería interesante evaluar la posibilidad de que los inhibidores Kunitz modularan la activación del inflammasoma NLRP3 en BMDM.

Como se señaló en la Introducción, la estimulación de BMDM con LPS induce un aumento de las corrientes de K^+ hacia fuera de la célula ¹²⁴. A su vez, el eflujo de K^+ es necesario para que se produzca un aumento en los niveles de Ca^{2+} intracelular. Sin embargo, la función del aumento en el Ca^{2+} intracelular en macrófagos aun no es clara. Se sabe que el calcio es necesario para la activación del factor de transcripción NFAT, involucrado en la activación de macrófagos así como de otras células del sistema inmune. NFAT es desfosforilado por la calcineurina unida a Ca^{2+} , lo que permite su translocación al núcleo y la expresión

de proteínas involucradas en la respuesta inflamatoria ^{118, 200}. En BMDM, NFAT se encuentra expresado y localizado en el núcleo de manera constitutiva y su inhibición disminuye la producción de TNF- α , MIP-1 α e IL-1 β en respuesta al LPS ²⁰¹. Además, la producción de IL-12/23p40 e IL-6 en BMDM en respuesta a zimosán requieren de NFAT ^{202, 203}. Dados los resultados obtenidos en esta Tesis sobre la expresión de IL-12/23p40 e IL-6, se abre la posibilidad de que *EgKU-1* y/o *EgKU-4* inhiban la activación de NFAT, a través del bloqueo de K_v u otros canales involucrados en la regulación del flujo de Ca^{2+} , como los canales de Ca^{2+} de tipo CRAC, o los canales de Ca^{2+} presentes en el retículo endoplasmático.

En suma, se observaron efectos inhibitorios sobre citoquinas pro-inflamatorias, IL-6 e IL-12/23p40, y potenciadores sobre la citoquina anti-inflamatoria, IL-10, de los efectos producidos por el LPS sobre BMDM. Se puede decir que *EgKU-1* y *EgKU-4*, parálogos cercanos entre sí y ambos con actividad sobre canales, modulan en dirección anti-inflamatoria la producción de citoquinas en macrófagos estimulados con LPS. En cambio, estas actividades no fueron compartidas por un miembro de la familia *EgKU* que no es, hasta donde se conoce, bloqueante de canales: *EgKU-3*. A su vez, los efectos producidos por *EgKU-1* y *EgKU-4* fueron distintos entre sí, y no fueron imitados por inhibidores comerciales de canales relevantes en la respuesta inmune, de lo que resulta que en base a los datos presentados en esta sección no se pueden proponer blancos específicos por los cuales estarían actuando *EgKU-1* y *EgKU-4* para modular la producción de citoquinas en este sistema.

4.5. Efectos sobre la respuesta proliferativa de BMDM inducida por M-CSF

Como se mencionó en la Introducción, el aumento en el número de macrófagos por proliferación de macrófagos residentes del tejido, así como de macrófagos recientemente derivados de monocitos, es una característica de contextos Th2 como lo son las infecciones por helmintos ³⁶. En este contexto, el M-CSF sería el responsable del aumento inicial en la proliferación de macrófagos, mientras que una vez establecida la respuesta Th2, existiría además un componente de proliferación inducida por aumento en los niveles de IL-4/IL-13 ³⁷.

La administración de IL-4 exógena genera proliferación de macrófagos *in vivo*. Sin embargo, *in vitro* la IL-4 no es suficiente para inducir proliferación ^{5, 36, 37}. Lo anterior, sumado a que la estimulación de BMDM con M-CSF aumenta las corrientes de K^+ , y el agregado de MgTx, que bloquea $K_v1.3$, así como el agregado Ba^{2+} , que bloquea $K_{ir}2.1$, inhiben parcialmente la proliferación inducida por M-CSF ¹²⁴, nos llevó a ensayar los inhibidores Kunitz en la respuesta proliferativa de macrófagos inducida por M-CSF.

Como se detalla en la Sección 3.4.4 de Materiales y Métodos, en estos ensayos los BMDM fueron estimulados con 40 ng/mL M-CSF en presencia de los inhibidores Kunitz recombinantes, MgTx y Tram34, a concentraciones de 10 nM a 1 μ M, durante 24 horas. La proliferación se analizó por incorporación de BrdU al ADN, por citometría de flujo (ver Sección 3.4.1.2 de Materiales y Métodos). En la Figura 49 se muestra la estrategia de *gating* empleada para el análisis de estos ensayos.

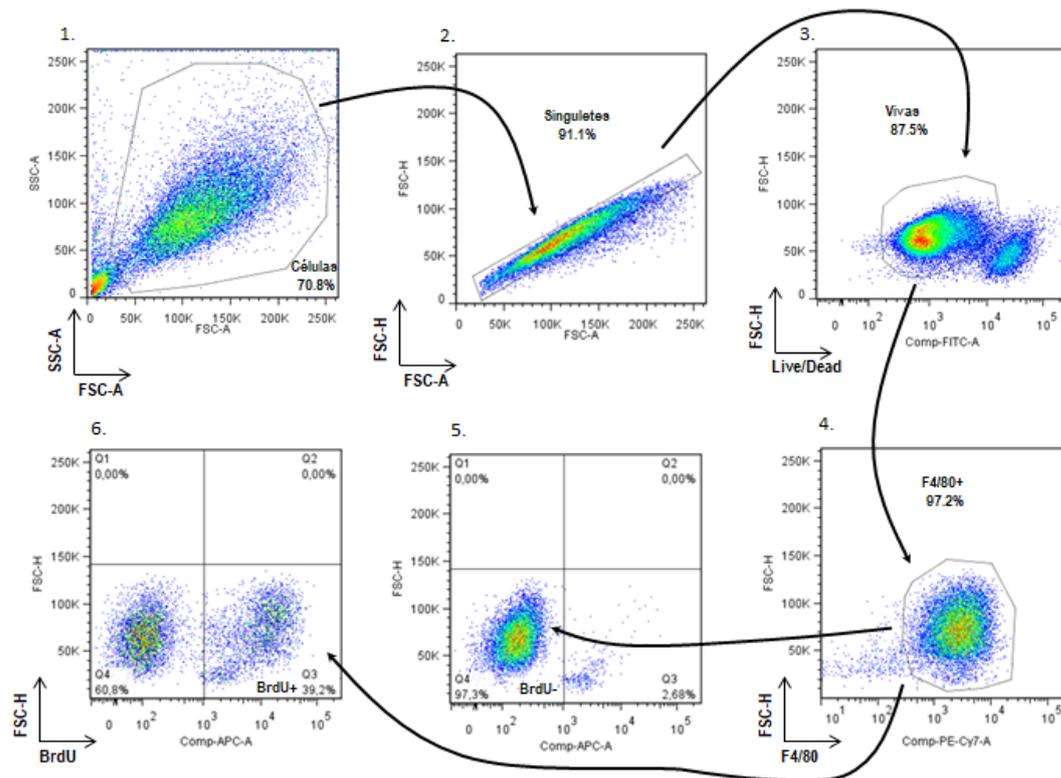


Figura 49. Estrategia de *gating* utilizada para el análisis de los experimentos de proliferación de BMDM inducida por M-CSF. Se muestra la estrategia de marcado y clasificación que se utilizó para definir la población celular de interés y analizar la incorporación de BrdU al ADN. 1. Se seleccionaron las células; 2. Se seleccionaron los singuletes; 3. Se seleccionaron las células vivas; 4. Se seleccionaron los macrófagos en términos de células F4/80⁺. 5. Se analizaron muestras control sin tratar con ADNasa para las células sin estímulos y para las células estimuladas con M-CSF, este último utilizado como control para todas las muestras de células tratadas con M-CSF en ausencia o presencia de inhibidores. 6. En base a los controles sin ADNasa, se seleccionaron en las muestras problema (tratadas con ADNasa), las células positivas para el marcador BrdU (Figura 50). En los cuadrantes 5 y 6 se muestra solo uno de los controles sin ADNasa y una muestra tratada con ADNasa.

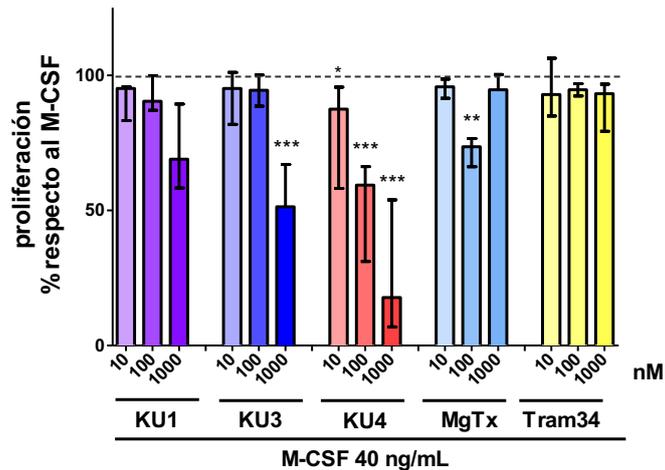


Figura 50. Proliferación de BMDM estimulados con M-CSF en presencia de inhibidores Kunitz recombinantes o inhibidores comerciales. Se incubaron 0.25×10^6 BMDM por pocillo con 40 ng/mL M-CSF, en presencia o ausencia de los inhibidores Kunitz, de MgTx o de Tram34, durante 24 horas. Cuatro horas antes de finalizar el ensayo se agregó 10 μ M BrdU. A tiempo cumplido se midió la incorporación de BrdU al ADN por citometría de flujo, que se expresó en términos de porcentaje de células positivas para BrdU. Se muestra el promedio de 3 experimentos independientes normalizados con respecto a la condición de células estimuladas con M-CSF en ausencia de otros estímulos (correspondiente al 100%, indicado con la línea punteada). Las gráficas muestran mediana \pm rango de los tres experimentos normalizados. Se aplicó sobre los datos crudos (sin normalizar) el test de Friedman con pos-test de Conover y corrección de Bonferroni. Los símbolos * indican diferencias con respecto a la condición de células estimuladas con M-CSF solamente; uno, dos o tres símbolos corresponden a $p < 0,05$, $p < 0,01$ o $p < 0,001$, respectivamente.

*Eg*KU-4 causó una inhibición en la proliferación dependiente de la dosis, a todas las concentraciones ensayadas. Esta inhibición, a 100 μ M pareció ser cuantitativamente mayor a la producida por MgTx a la misma concentración; sin embargo, no se obtuvo significancia estadística sobre esta diferencia. A 1 μ M *Eg*KU-3 también causó inhibición, no así la MgTx. Los efectos de *Eg*KU-4 a 1 μ M parecen ser cuantitativamente mayores que los de *Eg*KU-3, aunque tampoco en este caso se obtuvo significancia estadística sobre esta diferencia. En suma, *Eg*KU-4 parece ser un inhibidor más potente de la proliferación que *Eg*KU-3 y que MgTx, tanto a 100 nM como a 1 μ M, mientras que esta actividad parece estar ausente en *Eg*KU-1.

Vicente y colaboradores demostraron que la estimulación de BMDM con M-CSF aumenta las corrientes de K^+ tanto hacia dentro como hacia fuera de las células, y que el bloqueo de ambos tipos de corriente causa una disminución en la proliferación¹²⁴. Se sabe además que la señalización por M-CSF causa activación de la fosfolipasa C²⁰⁴, por lo que probablemente se produzca liberación de Ca^{2+} de los almacenes del retículo endoplasmático y la entrada de Ca^{2+} al citosol desde el exterior celular¹¹⁶⁻¹¹⁸. En general, la entrada de Ca^{2+} al citosol y el eflujo de K^+ se encuentran mecánicamente conectadas, por un tema de balance de cargas. Sin embargo no se entienden cabalmente los papeles del K^+ ni del Ca^{2+} en el proceso de proliferación.

La inhibición de la proliferación de macrófagos por 100 nM de MgTx observada en nuestros ensayos concuerda con lo observado por Vicente y colaboradores¹²⁴. Más

aún, la similitud de efectos a nivel cualitativo entre MgTx y EgKU-4 en nuestros ensayos abre la posibilidad de que el efecto de EgKU-4 sobre la proliferación efectivamente involucre bloqueo de Kv1.3. En la misma dirección, y como se mencionó en la Introducción, EgKU-4 comparte la presencia de una región C-terminal básica con la proteína tipo Kunitz Hg1, bloqueante de Kv1.3. Sin embargo, la diferencia entre los patrones de dosis-respuesta de EgKU-4 y MgTx sugiere que EgKU-4 debería estar actuando sobre blancos adicionales a Kv1.3 para inhibir la proliferación. Es concebible que este blanco sea Kir2.1, ya que en BMDM el bloqueo de este canal contribuye a disminuir la proliferación inducida por M-CSF¹²⁴. Otro blanco concebible de EgKU-4 en este contexto es el recientemente identificado canal TRPM7, necesario para la proliferación de BMDM inducida por IL-4 o M-CSF. Este canal es permeable al Mg²⁺ y al Ca²⁺ y además de su actividad como transportador de iones tiene un dominio citosólico proteína-quinasa, que media la fosforilación de residuos de serina/treonina; no se sabe si su papel en la proliferación es mediado por el flujo de iones, por fosforilación, o por ambas actividades²⁰⁵.

Por otro lado, el efecto observado de EgKU-3 a altas concentraciones sugiere que la proliferación de BMDM podría ser afectada por inhibición de proteasas, quizás del sistema vesicular²⁰⁶, al que EgKU-3 podría llegar vía endocitosis.

En suma, EgKU-4, bloqueante de canales, inhibió la proliferación de BMDM inducida por M-CSF incluso a dosis bajas (10 nM), y las comparaciones con inhibidores conocidos sugieren que este efecto podría deberse a bloqueo de Kv1.3 quizás junto con canal(es) adicional(es)

4.6. Conclusiones finales y Perspectivas

En esta Tesis se produjeron 4 inhibidores Kunitz de *E. granulosus* (EgKU-1, EgKU-3, EgKU-4 y EgKU-9) en forma recombinante en *E. coli* con niveles de endotoxinas lo suficientemente bajos para la utilización de las preparaciones (a dosis de hasta 100 nM al menos) en ensayos funcionales con macrófagos.

De las 4 proteínas EgKU expresadas, solamente EgKU-9 no había sido previamente expresada por el grupo ni caracterizada en detalle en cuanto a su actividad de inhibición de proteasas de serina. Se ensayaron varias construcciones para la expresión de EgKU-9 en forma soluble, resultando la fusión a la DsbC la de mayor eficiencia. Por corte con la proteasa TEV y re-purificación se obtuvo EgKU-9 soluble libre de contraparte de fusión. Se determinó que EgKU-9 se comporta como un inhibidor Kunitz típico en cuanto a que es un inhibidor lento, de alta afinidad de la quimotripsina- α bovina y de la elastasa porcina, con constantes de inhibición globales del orden de 10^{-11} M. EgKU-9 se encuentra entre los transcritos más expresados en la oncosfera de *E. granulosus*, que como se mencionó en la Introducción, es el estadio que infecta al hospedero intermediario, penetra la pared intestinal y es transportado hasta los tejidos internos, donde se desarrolla a hidátide. Las proteasas digestivas intestinales podrían ser entonces blancos fisiológicos de EgKU-9. La oncosfera debe ser un estadio sensible al ataque proteolítico, ya que en este estadio el tegumento se encuentra totalmente expuesto al medio interno del hospedero, contrariamente a los estadios posteriores, parcialmente protegidos por la capa laminar. Es por lo tanto de esperar que el

parásito haya desarrollado evolutivamente la capacidad de inhibir la actividad de las proteasas digestivas. En concordancia con esta hipótesis, *EgKU-9* resultó ser mucho mejor inhibidor de una quimotripsina de ungulado que de las quimotripsinas caninas, lo que refuerza la idea que *EgKU-9* se desarrolló para actuar a nivel del hospedero intermediario más que del hospedero definitivo. Para cerrar el presente trabajo resta ensayar *EgKU-9*, en experimentos de activación y de proliferación de BMDM.

Se realizaron ensayos inmunológicos sobre BMDM con *EgKU-1* y *EgKU-4*, parálogos cercanos, bloqueantes de canales, y *EgKU-3*, inhibidor de quimotripsina. Se encontraron diversos efectos de los inhibidores mencionados que apuntan a una regulación a la baja de las respuestas inflamatoria y proliferativa de macrófagos. En efecto, se observó antagonismo de efectos del LPS en términos de inducción de citoquinas pro-inflamatorias y en cambio potenciación de una citoquina anti-inflamatoria. También se observó inhibición del efecto del M-CSF en términos de proliferación. Los resultados son compatibles con la idea que la mayoría de los efectos observados se deban a bloqueo de canales iónicos. En efecto, descontando las observaciones a una dosis muy alta de inhibidores (1 μ M), tuvieron efectos sobre respuestas de BMDM los dos inhibidores bloqueantes de canales (*EgKU-1* y *EgKU-4*) y no el inhibidor que no tiene actividad conocida sobre canales (*EgKU-3*).

Es importante destacar la diferencia tanto cualitativa como cuantitativa entre *EgKU-1* y *EgKU-4* en términos de efectos ejercidos sobre BMDM, estimulados ya sea con LPS o con M-CSF. Estas diferencias sugieren que *EgKU-1* y *EgKU-4* difieren en sus blancos. En este sentido, los ensayos de *whole-cell patch-clamp* indicaron que el voltaje al cual el bloqueo de corrientes de K^+ es máximo difiere entre *EgKU-1* y *EgKU-4*¹⁶⁷, lo que efectivamente sugiere diferencias en la especificidad por canales. En la misma dirección, la extensión C-terminal básica presente en *EgKU-4*, que como se discutió en la sección anterior es candidata a tener actividad sobre $K_v1.3$ (por similitud con la correspondiente de Hg1)¹⁵⁵, no está presente en *EgKU-1*. En cambio, tanto *EgKU-4* como *EgKU-1* presentan características de secuencia similares a las involucradas en bloqueo de canales por DTx^{152, 154} (Figura 13). En suma, nuestros resultados son compatibles con la hipótesis de que *EgKU-4* presente dos regiones activas, capaces de bloquear dos canales diferentes. La primera de estas regiones sería la región N-terminal básica, compartida con *EgKU-1*, la cual, a través de bloqueo de canales no identificados, podría ser responsable de aquellos efectos que son similares entre ambas proteínas *EgKU* (inhibición de la IL-12/23p40). Por lo discutido en la sección anterior, se debe considerar las posibilidades que estos canales sean $K_{ir}2.1$ o TRPM7, especialmente si se propone que: (i) *EgKU-1* tendría una cierta capacidad de inhibir la proliferación de BMDM, que sin embargo no llegó a significancia estadística en nuestros experimentos (Figura 50) y (ii) la actividad de *EgKU-1* sobre este canal ($K_{ir}2.1$ o TRPM7) podría ser menor a la de *EgKU-4*. La segunda región con actividad de bloqueo de canales por *EgKU-4* sería la extensión C-terminal básica, que actuando probablemente sobre $K_v1.3$ sería responsable de aquellos efectos de *EgKU-4* que están ausentes en *EgKU-1* (inhibición de la proliferación y de la producción de IL-6). En este escenario, la observación que *EgKU-1* potencia la producción de IL-10 mientras que *EgKU-1* no lo hace podría ser explicada si el bloqueo del canal que es blanco común de ambos inhibidores tiene efecto positivo sobre dicha citoquina pero este efecto es

contrarrestado por un efecto opuesto causado por bloqueo del canal que es blanco exclusivo de *EgKU-4* (hipotéticamente $K_v1.3$). También en este contexto, el bloqueo del blanco común de *EgKU-1* y *EgKU-4* podría tener un leve efecto inhibitorio sobre la producción de IL-6 y sobre la proliferación (coherente con las posibilidades mencionadas que este blanco sea $K_{ir}2.1$ o TRPM7), que explicaría las ligeras tendencias a tener estos efectos observadas para *EgKU-1*, ya discutidas. En la Figura 51 se representa en forma esquemática el conjunto de hipótesis planteadas.

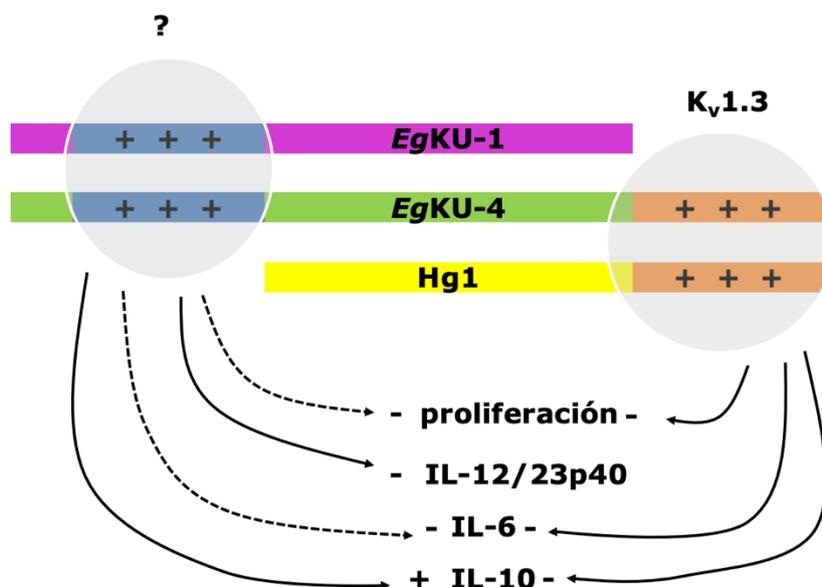


Figura 51. Hipótesis explicativa de los efectos observados por *EgKU-1* y *EgKU-4*. La región básica N-terminal, responsable del bloqueo de canales no identificados, se representa en azul. La región básica C-terminal, potencialmente responsable del bloqueo de $K_v1.3$, se representa en naranja. Las líneas sólidas representan efectos fuertes, que por sí solos son capaces de dar cambios con significancia estadística en nuestros ensayos; las líneas punteadas representan efectos leves, que pueden potenciar los efectos producidos por el bloqueo propuesto del canal $K_v1.3$.

Es importante aclarar que se puede plantear una variante de las hipótesis antes resumidas. Esta es que las regiones N-terminales de *EgKU-1* y *EgKU-4*, que presentan ciertas diferencias de secuencia entre sí (Figura 13), tengan además de blanco(s) compartido(s), cierto(s) blanco(s) adicional(es) diferencial(es). El bloqueo de este(os) canal(es) podría ser responsable del efecto sobre la IL-10 mostrado por *EgKU-1* pero no por *EgKU-4*.

Para explorar las hipótesis resumidas en la Figura 51 se podría estimular BMDM con *EgKU-1* junto con MgTx, bloqueante de $K_v1.3$, condición en la cual se esperaría ver efectos similares a los producidos por *EgKU-4*. Alternativamente se podría expresar *EgKU-4* truncado en su extremo C-terminal, y evaluar si aún presenta aquellas actividades que están ausentes en *EgKU-1*. Para aproximarnos al conocimiento de el(los) blanco(s) que según se propone, comparten *EgKU-1* y *EgKU-4* en BMDM, podrían ensayarse bloqueantes de los canales candidatos $K_{ir}2.1$ y TRPM7, ensayos en los cuales, si alguno de estos canales son efectivamente blancos de los *EgKU*, se

esperaría ver efectos similares a los producidos por *EgKU-1*. Además sería interesante ensayar combinaciones de bloqueantes de $K_{ir2.1}$ o de TRPM7 con la MgTx, condición en la cual se esperaría ver efectos similares a los producidos por *EgKU-4*.

Para obtener información más robusta sobre los posibles canales blancos de los *EgKU* deberían realizarse ensayos electrofisiológicos, en los cuales se estudiaría la actividad de *EgKU-4* y *EgKU-1* sobre células transfectadas con subunidades particulares de K_v , u otros canales. En este contexto, la primera prioridad sería específicamente analizar la actividad de *EgKU-4* sobre células transfectadas con $K_v1.3$. Un enfoque complementario es el empleo de ensayos de afinidad, que consistirían en inmovilizar las proteínas Kunitz a una matriz y pasar extractos de membrana plasmática de células inmunes con el fin de capturar moléculas interactoras. Luego se analizarían por espectrometría de masas las moléculas eluidas con un gradiente de fuerza iónica.

En cuanto a la profundización en el estudio de los efectos inmuno-moduladores de los *EgKU*, sería importante realizar ensayos *in vitro* con *EgKU-1* y *EgKU-4* sobre modelos de macrófagos distintos a los BMDM, así como corroborar los resultados en ensayos *in vivo*. Dada la diferencia en los patrones de expresión y funciones de canales en distintos modelos de un mismo tipo celular ¹¹⁹, estos ensayos además aportarían información de interés sobre los posibles blancos de estos inhibidores. También sería interesante evaluar efectos de los inhibidores *EgKU* en un contexto Th2, biológicamente más relevante, inducido por ejemplo por estimulación con IL-4, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. Por otra parte, un modelo celular de interés para evaluar actividades inmuno-moduladoras de las proteínas *EgKU* a través de bloqueo de canales son los linfocitos T. Esto sería adecuado además para corroborar la hipótesis que plantea el bloqueo de $K_v1.3$ por *EgKU-4*, ya que en estas células el bloqueo de este canal tiene efectos más claros que sobre células de la inmunidad innata, particularmente sobre la proliferación y producción de IL-2 ¹¹⁹.

En cuanto a las funciones de *EgKU-1* y *EgKU-4* en el contexto de la infección por *E. granulosus*, en un principio estos inhibidores podrían actuar atenuando tanto la respuesta innata como distintas ramas de la respuesta adaptativa en el hospedero intermediario. La IL-12 y la IL-23, cuya producción por macrófagos podría ser inhibida por *EgKU-1* y *EgKU-4*, actúan sobre los propios macrófagos y sobre células dendríticas aumentando la activación inflamatoria de las células, incluyendo la inducción de la producción de TNF- α , IFN- γ y NO ²¹⁰. En términos de polarización de células T, la IL-12 se asocia a la inducción de células Th1 productoras de IFN- γ . La IL-23 y la IL-6 (cuya producción por macrófagos podría ser inhibida por *EgKU-4*), en combinación con TGF- β , son importantes para el desarrollo de células Th17, productoras de IL-17 ^{210, 211}. Si bien las respuestas Th1 y Th17 están destinadas a combatir bacterias intra- y extra-celulares respectivamente, como se mencionó en la Introducción, la infección por *E. granulosus* larvario genera una respuesta con un componente Th1 y probablemente también exista un componente Th17, capaz de dañar a los parásitos. En este sentido, varios estudios indican que las respuestas reguladoras inducidas por *E. granulosus* modulan las 3 ramas de la respuesta adaptativa ^{45, 50-56}. En concordancia con lo anterior, la IL-10, cuya producción por macrófagos sería aumentada por *EgKU-1*, inhibe la activación y las funciones

efectoras de células Th1, Th17 y Th2. Además actúa sobre células mieloides disminuyendo la capacidad de presentación antigénica, la producción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-12 e IFN- γ y de moléculas de co-estimulación, y sobre células T vírgenes promoviendo su diferenciación a células T reguladoras del tipo Tr1, que a su vez secretan TGF- β e IL-10²¹²⁻²¹⁴. Como se mencionó en la Introducción, datos transcriptómicos sugieren que estos inhibidores podrían expresarse en la oncosfera¹⁵⁹. La oncosfera es el estadio más susceptible al ataque del sistema inmune del hospedero intermediario, pese a lo cual la mayoría de las veces logra evadirlo. Cuando la oncosfera se instala en los tejidos internos, previo al desarrollo de la hidátide, se genera una reacción inflamatoria inicial local de tipo granulomatosa, con presencia de macrófagos, la cual es capaz de eliminar al parásito si este no logra controlarla^{42, 43}. En estas etapas tempranas, *EgKU-1* y *EgKU-4* podrían ser secretados a la interfase parásito-hospedero e inhibir la proliferación de los macrófagos y/o, a través de la inducción de un perfil de citoquinas anti-inflamatorio, inhibir funciones efectoras, tanto de los mismos macrófagos como de la inmunidad adaptativa. La respuesta inflamatoria inicial, una vez formada la hidátide, puede dar lugar a su vez a un granuloma típico, con macrófagos íntimamente asociados al parásito e infiltrado de otras células inmunes⁶. Como se mencionó en la Introducción, faltan datos sobre la expresión de *EgKU-1* y *EgKU-4* por parte de las células de la hidátide (o sea, de la capa germinativa). De todos modos, y específicamente para *EgKU-1*, la expresión demostrada en PSC⁸⁸ abre la posibilidad de secreción hacia el líquido hidático y (dado que existe pasaje de moléculas entre el líquido hidático y el hospedero) funciones inmunomoduladoras sobre los macrófagos que forman el granuloma. Actividades inmunomoduladoras de *EgKU-1*, como se dijo expresado en PSC, también podrían actuar en las etapas tempranas de la infección en el hospedero definitivo, donde también la presencia del parásito es capaz de regular la respuesta inflamatoria hospedero⁵⁷⁻⁶⁰.

En suma, los resultados de esta Tesis en conjunto con los resultados previos permiten proponer que la secreción de *EgKU-1* y *EgKU-4* y consiguiente bloqueo de canales catiónicos pueden ser herramientas del parásito para regular la respuesta inmune del hospedero activada por su presencia.

Finalmente, cabe mencionar que, dadas las actividades observadas que apuntan hacia una inhibición de la activación pro-inflamatoria de los macrófagos, y que consecuentemente podrían acarrear inhibición de las ramas Th1 y/o Th17 de la respuesta adaptativa, *EgKU-1* y *EgKU-4* tienen potencial para ser utilizados como drogas en enfermedades autoinmunes/autoinflamatorias, donde la patología es consecuencia de una respuesta inflamatoria exacerbada²¹⁵.

5. Referencias

1. Díaz A, Allen JE. (2007) Mapping immune response profiles: the emerging scenario from helminth immunology, *Eur J Immunol.* 37(12), 3319-3326.
2. Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF Jr, Stadecker MJ, Gause WC. (2007) Protective immune mechanisms in helminth infection, *Nat Rev Immunol.* 7(12), 975-987.
3. Roediger B, Weninger W. (2015) Group 2 innate lymphoid cells in the regulation of immune responses, *Adv Immunol.* 125, 111-154.
4. Allen JE, Maizels RM. (2011) Diversity and dialogue in immunity to helminths, *Nat Rev Immunol.* 11(6), 375-388.
5. Rückerl D, Allen JE. (2014) Macrophage proliferation, provenance, and plasticity in macroparasite infection, *Immunol Rev.* 262(1), 113-133.
6. Díaz A, Sagasti C, Casaravilla C. (2018) Granulomatous responses in larval taeniid infections, *Parasite Immunol.* 40(5), doi: 10.1111/pim.12523.
7. Díaz A, Allen JE. (2007) Mapping immune response profiles: the emerging scenario from helminth immunology, *Eur J Immunol.* 37(12), 3319-3326.
8. Mendlovic F, Flisser A. (2010) Dendritic Cells in the Gut: Interaction with Intestinal Helminths, *J Biomed Biotechnol.* doi: 10.1155/2010/250563
9. Aranzamendi C, et al. (2012) Trichinella spiralis-secreted products modulate DC functionality and expand regulatory T cells in vitro, *Parasite Immunol.* 34(4), 210-223.
10. Perona-Wright G, Jenkins SJ, MacDonald AS. (2006) Dendritic cell activation and function in response to Schistosoma mansoni, *Int J Parasitol.* 36(6), 711-721.
11. Steers NJ, Rogan MT, Heath S. (2001) In vitro susceptibility of hydatid cysts of *Echinococcus granulosus* to nitric oxide and the effect of the laminated layer on nitric oxide production, *Parasite Immunol.* 23(8), 411-417.
12. Silvia-Álvarez V, et al. (2016) Echinococcus granulosus Antigen B binds to monocytes and macrophages modulating cell response to inflammation, *Parasit Vectors.* doi: 10.1186/s13071-016-1350-7.
13. van Liempt E, et al. (2007) Schistosoma mansoni soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation, *Mol Immunol.* 44(10), 2605-2615.
14. Jankovic D, Steinfeld S, Kullberg MC, Sher A (2006) Mechanisms underlying helminth- induced Th2 polarization: default, negative or positive pathways? *Chem Immunol Allergy.* 90, 65-81.
15. Terrazas CA, Alcantara-Hernandez M, Bonifaz L, Terrazas LI, Satoskar AR (2013) Helminth- excreted/secreted products are recognized by multiple receptors on DCs to block the TLR response and bias Th2 polarization in a cRAF dependent pathway, *FASEB J.* 27(11), 4547-4560
16. Carvalho L, et al. (2009) Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: mechanisms underlying helminth modulation of dendritic cell function. *Immunology* 126(1), 28-34.
17. Elgueta R et al. (2009) Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system, *Immunol Rev.* 229, 152-172
18. Donnelly S, Dalton JP, Loukas A. (2006) Proteases in helminth- and allergen-induced inflammatory responses, *Chem Immunol Allergy.* 90, 45-64.

19. Park MK, et al. (2011) Protease-activated receptor 2 is involved in Th2 responses against *Trichinella spiralis* infection, *Korean J Parasitol.* 49(3), 235-243.
20. Liang G, Barker T, Xie Z, Charles N, Rivera J, Druey KM. (2012) Naive T cells sense the cysteine protease allergen papain through protease-activated receptor 2 and propel TH2 immunity, *J Allergy Clin Immunol.* 129(5), 1377-1386.
21. Devlin MG, Gasser RB, Cocks TM. (2007) Initial support for the hypothesis that PAR2 is involved in the immune response to *Nippostrongylus brasiliensis* in mice, *Parasitol Res.* 101(1), 105-109.
22. Zhang L, Wang CC. (2014) Inflammatory response of macrophages in infection, Hepatobiliary, *Pancreat Dis Int.* 13(2), 138-152.
23. Bain CC, et al. (2016) Long-lived self-renewing bone marrow-derived macrophages displace embryo-derived cells to inhabit adult serous cavities, *Nat Commun.* doi: 10.1038/ncomms11852.
24. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization, *Trends Immunol.* 25(12), 677-686.
25. Mackaness GB. (1962) Cellular resistance to infection, *J Exp Med.* 116, 381-406.
26. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. (1992) Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation, *J Exp Med.* 176(1), 287-292.
27. Doyle AG, et al. (1994) Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: comparison with interleukin-4 and interferon-gamma, *Eur J Immunol.* 24(6), 1441-1445.
28. R ckerl D, Allen JE. (2014) Macrophage proliferation, provenance, and plasticity in macroparasite infection, *Immunol Rev.* 262(1), 113-133.
29. Nair MG, Guild KJ, Artis D. (2007) Novel Effector Molecules in Type 2 Inflammation: Lessons Drawn from Helminth Infection and Allergy, *J Immunol.* 177(3), 1393-1399.
30. Cai Y, Kumar RK, Zhou J, Foster PS, Webb DC. (2009) Ym1/2 promotes Th2 cytokine expression by inhibiting 12/15(S)-lipoxygenase: identification of a novel pathway for regulating allergic inflammation, *J Immunol.* 182(9), 5393-5399.
31. Arora M, et al. (2006) Simvastatin promotes Th2-type responses through the induction of the chitinase family member Ym1 in dendritic cells, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(20), 7777-7782.
32. Klotz C, et al. (2011) A helminth immunomodulator exploits host signaling events to regulate cytokine production in macrophages, *PLoS Pathog.* 7(1):e1001248.
33. Ziegler T, et al. (2015) A novel regulatory macrophage induced by a helminth molecule instructs IL-10 in CD4+ T cells and protects against mucosal inflammation, *J Immunol.* 194(4), 1555-1564.
34. Louis C, et al. (2015) Specific Contributions of CSF-1 and GM-CSF to the Dynamics of the Mononuclear Phagocyte System, *J Immunol.* 195(1), 134-144.
35. Pixley FJ, Stanley ER. (2004) CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action, *Trends Cell Biol.* 14(11), 628-638.
36. Jenkins SJ, et al. (2011) Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation, *Science.* 332(6035), 1284-8.

37. Jenkins SJ, *et al.* (2013) IL-4 directly signals tissue-resident macrophages to proliferate beyond homeostatic levels controlled by CSF-1, *J Exp Med.* 210(11), 2477-2491.
38. Nakao M, Lavikainen A, Yanagida T, Ito A. (2013) Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae), *Int J Parasitol.* 43, 1017-1029.
39. CDC, C.f.D.C.a.P. Parasites - Echinococcosis - Biology. [web site] 2012 december; Available from: <http://www.cdc.gov/parasites/echinococcosis/biology.html>.
40. Thompson RC. (2017) Biology and Systematics of *Echinococcus*, *Adv Parasitol.* 95, 65-109.
41. Díaz A, Casaravilla C, Barrios AA, Ferreira AM. (2016) Parasite molecules and host responses in cystic echinococcosis, *Parasite Immunol.* 38, 193-205
42. Tamarozzi F, Mariconti M, Neumayr A, Brunetti E. (2016) The intermediate host immune response in cystic echinococcosis, *Parasite Immunology.* 38, 170-181.
43. Breijo M, Anesetti G, Martínez L, Sim RB, Ferreira AM. (2008) *Echinococcus granulosus*: the establishment of the metacestode is associated with control of complement-mediated early inflammation, *Exp Parasitol.* 118(2), 188-96.
44. Piccoli *et al.* (2012) Serum Cytokine Profile by ELISA in Patients with Echinococcal Cysts of the Liver: A Stage-Specific Approach to Assess Their Biological Activity, *Clin Dev Immunol.* doi: 10.1155/2012/483935.
45. Rogan MT. (1998) T-cell activity associated with secondary infections and implanted cysts of *Echinococcus granulosus* in BALB/c mice, *Parasite Immunol.* 20(11), 527-533.
46. Mourglia-Ettlin G, Merlino A, Capurro R, Dematteis S. (2015) Susceptibility and resistance to *Echinococcus granulosus* infection: Associations between mouse strains and early peritoneal immune responses, *Immunobiology.* 221(3), 418-26.
47. Siracusano A, Rigano R, Ortona E *et al.* (2008) Immunomodulatory mechanisms during *Echinococcus granulosus* infection, *Exp Parasitol.* 119, 483-489
48. Wang *et al.* (2014) *Echinococcus granulosus* infection reduces airway inflammation of mice likely through enhancing IL-10 and down-regulation of IL-5 and IL-17A, *Parasit Vectors*, doi: 10.1186/s13071-014-0522-6.
49. Adjobimey T, Hoerauf A. (2010) Induction of immunoglobulin G4 in human filariasis: an indicator of immunoregulation, *Ann Trop Med Parasitol.* 104(6), 455-464.
50. Rigano R, Profumo E, Buttari V, Teggi A, Siracusano A. (1999) Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with pharmacologically treated cystic echinococcosis, *Clin Exp Immunol.* 118(1), 95-101.
51. Rigano R *et al.* (2004) *Echinococcus granulosus*-specific T-cell lines derived from patients at various clinical stages of cystic echinococcosis, *Parasite Immunol.* 26(1), 45-52.
52. Mondragón-de-la-Peña C, Ramos-Solís S, Barbosa-Cisneros O, Rodríguez-Padilla C, Tavizón-García P, Herrera-Esparza R. (2002) *Echinococcus granulosus* down regulates the hepatic expression of inflammatory cytokines IL-6 and TNF alpha in BALB/c mice, *Parasite.* 9(4), 351-356.
53. Turhan N, *et al.* (2015) Co-existence of *Echinococcus granulosus* infection and cancer metastasis in the liver correlates with reduced Th1 immune responses, *Parasite Immunol.* 37(1), 16-22.

54. Vismarra A *et al.* (2015) Immuno-histochemical study of ovine cystic echinococcosis (*Echinococcus granulosus*) shows predominant T cell infiltration in established cysts, *Vet Parasitol.* 209, 258-8.
55. Tuxun T *et al.* (2012) Th17/Treg imbalance in patients with liver cystic echinococcosis, *Parasite Immunol.* 34(11), 520-527.
56. Vatankhah A, Halász J, Piurkó V, Barbai T, Rásó E, Tímár J. (2015) Characterization of the inflammatory cell infiltrate and expression of costimulatory molecules in chronic echinococcus granulosus infection of the human liver, *BMC Infect Dis.* doi: 10.1186/s12879-015-1252-x.
57. Moreno M *et al.* (2004) Local and systemic immune responses to *Echinococcus granulosus* in experimentally infected dogs, *Vet Parasitol.* 119(1), 37-50.
58. Desplazes P, Thompson RC, Constantine CC, Penhale WJ. (1994) Primary infection of dogs with *Echinococcus granulosus*: systemic and local (Peyer's patches) immune responses, *Vet Immunol Immunopathol.* 40(2), 171-184.
59. Rossi A *et al.* (2012) *Echinococcus granulosus*: different cytokine profiles are induced by single versus multiple experimental infections in dogs, *Exp Parasitol.* 130(2), 110-115.
60. Gemmell MA, Lawson JR, Roberts MG. (1986) Population dynamics in echinococcosis and cysticercosis: biological parameters of *Echinococcus granulosus* in dogs and sheep, *Parasitology.* 92(3), 599-620.
61. Murphy KT, Walport M. (2009) *Inmunología de Janeway. 7th ed*, ed. M.G. Hill.
62. Jabbar A, Swiderskiw Z, Mlocicki D, Beveridge I, Lightowlers MW. (2010) The ultrastructure of taeniid cestode oncospheres and localization of hostprotective antigens, *Parasitology.* 137, 521-535.
63. Holcman B, Heath DD. (1997) The early stages of *Echinococcus granulosus* development, *Acta Trop.* 64(1-2), 5-17.
64. Holcman B, Heath DD, Shaw RJ. (1994) Ultrastructure of oncosphere and early stages of metacestode development of *Echinococcus granulosus*, *Int J Parasitol.* 24(5), 623-635.
65. Chow C, Cauci CG, Cowman AF, Lightowlers MW. (2004) *Echinococcus granulosus*: oncosphere-specific transcription of genes encoding a host-protective antigen, *Exp Parasitol.* 106(3-4), 183-6.
66. Díaz A, *et al.* (2017) Immunology of cystic echinococcosis (hydatid disease), *Br Med Bull.* 124(1), 121-133.
67. Díaz A, Casaravilla C, Allen JE, Sim RB, Ferreira AM. (2011) Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* II: immunology, *Trends Parasitol.* 27(6), 264-273.
68. Monteiro MK, Carvalho MO, Zaha A, Ferreira HB. (2010) Proteomic analysis of the *Echinococcus granulosus* metacestode during infection of its intermediate host, *Proteomics.* 10, 1985-1999.
69. Ahn CS *et al.* (2015) Alteration of immunoproteome profile of *Echinococcus granulosus* hydatid fluid with progression of cystic echinococcosis, *Parasites & Vectors.* DOI 10.1186/s13071-014-0610-7
70. Dos Santos GB *et al.* (2016) Excretory/secretory products in the *Echinococcus granulosus* metacestode: is the intermediate host complacent with infection caused by the larval form of the parasite? *Int J Parasitol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.07.009>

71. Ersfeld K, Craig PS. (1995) Cloning and immunological characterisation of Echinococcus granulosus ferritin, *Parasitol Res.* 81(5), 382-387.
72. Muhlschlegel F, Sygulla L, Frosch P, Massetti P, Frosch M. (1993), Paramyosin of Echinococcus granulosus: cDNA sequence and characterization of a tegumental antigen, *Parasitol Res.* 79(8), 660-666.
73. Martin RM, Colebrook AL, Gasser RB, Lightowlers MW. (1996) Antibody responses of patients with cystic hydatid disease to recombinant myophilin of Echinococcus granulosus, *Acta Trop.* 61(4), 307-314.
74. Margutti P *et al.* (2008) Thioredoxin peroxidase from Echinococcus granulosus: a candidate to extend the antigenic panel for the immuno-diagnosis of human cystic echinococcosis, *Diagn Microbiol Infect Dis.* 60(3), 279-285.
75. Colebrook AL, Lightowlers MW. (1997) Serological reactivity to heat shock protein 70 in patients with hydatid disease, *Parasite Immunol.* 19(1), 41-46.
76. Ortona E, *et al.* (2002) Immunological characterization of *Echinococcus granulosus* cyclophilin, an allergen reactive with IgE and IgG4 from patients with cystic echinococcosis, *Clin Exp Immunol.* 128(1), 124-130.
77. Thompson RC, Dunsmore JD, Hayton AR. (1979) *Echinococcus granulosus*: secretory activity of the rostellum of the adult cestode in situ in the dog, *Exp Parasitol.* 48(1), 144-163.
78. Siles-Lucas M, Nunes CP, Zaha A, Breijo M. (2000) The 14-3-3 protein is secreted by the adult worm of Echinococcus granulosus, *Parasite Immunol.* 22(10), 521-528.
79. Díaz A, Ferreira A, Sim RB. (1997) Complement evasion by Echinococcus granulosus: sequestration of host factor H in the hydatid cyst wall, *J Immunol.* 158(8), 3779-3786.
80. Coombs PJ, Maureen ET, Drickamer K. (2006) Two categories of mammalian galactose-binding receptors distinguished by glycan array profiling, *Glycobiology.* 16(8), 1C-7C.
81. Suda T, *et al.* (1988) Prevention of suppression of alloreactive capacity following intravenous injection of neuraminidase-treated allogeneic cells by co-injection of agents competing for asialoglycoprotein receptor, *Reg Immunol.* 1(1), 24-31.
82. Casaravilla *et al.* (2014) Unconventional maturation of dendritic cells induced by particles from the laminated layer of larval *Echinococcus granulosus*, *Infect Immun.* 82(8), 3164-3176.
83. Seoane PI, *et al.* (2016) Particles from the *Echinococcus granulosus* laminated layer inhibit IL-4 and growth factor-driven Akt phosphorylation and proliferative responses in macrophages, *Sci Rep.* 6: 39204.
84. Hewiston JP, Grainger JR, Maizels RM. (2009) Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity, *Mol Biochem Parasitol.* 167(1), 1-11.
85. Mejri N, Hassen IE, Knapp J, Saidi M. (2017) Impairment of Macrophage Presenting Ability and Viability by Echinococcus granulosus Antigens, *Iran J Immunol.* 14(1), 35-50.
86. Nicolao MC, Rodriguez Rodrigues C, Cumino AC. (2019) Extracellular vesicles from *Echinococcus granulosus* larval stage: Isolation, characterization and uptake by dendritic cells, *PloS Negl Trop Dis.* 13(1), doi: 10.1371/journal.pntd.0007032.
87. Wang Y, *et al.* (2015) Impairment of dendritic cell function and induction of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells by excretory-secretory products: a potential

mechanism of immune evasion adopted by *Echinococcus granulosus*, *BMC Immunol.* 16-44.

88. González S, et al. (2009) A Family of Diverse Kunitz Inhibitors from *Echinococcus granulosus* Potentially Involved in Host-Parasite Cross-Talk, *PLoS One.* 4(9), doi: 10.1371/journal.pone.0007009.

89. Ranasinghe S, McManus DP. (2013) Structure and function of invertebrate Kunitz serine protease inhibitors, *Dev Comp Immunol.* 39(1), 219-227.

90. Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ. (2004) Evolutionary families of peptidase inhibitors, *Biochem J.* 378(3), 705-716.

91. Zupunski V, Kordis D. (2016) Strong and widespread action of site-specific positive selection in the snake venom Kunitz/BPTI protein family, *Sci Rep.* doi: 10.1038/srep37054.

92. Ascenzi P, et al. (2003) The bovine basic pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz inhibitor): a milestone protein, *Curr Protein Pept Sci.* 4(3), 231-251.

93. Paesen GC, et al. (2009) An ion-channel modulator from the saliva of the brown ear tick has a highly modified Kunitz/BPTI structure, *J Mol Biol.* 389(4), 734-747.

94. Dai SX, Zhang AD, Huang JF. (2012) Evolution, expansion and expression of the Kunitz/BPTI gene family associated with long-term blood feeding in *Ixodes Scapularis*, *BMC Evol Biol.* doi: 10.1186/1471-2148-12-4.

95. Harvey AL. (2001) Twenty years of dendrotoxins, *Toxicon.* 39(1), 15-26.

96. Yang W, et al. (2014) BF9, the first functionally characterized snake toxin peptide with Kunitz-type protease and potassium channel inhibiting properties, *J Biochem Mol Toxicol.* 28(2), 76-83.

97. Zupunski V, Kordis D, Gubensek F. (2003) Adaptive evolution in the snake venom Kunitz/BPTI protein family, *FEBS Lett.* 547(1-3), 131-136.

98. Hedstrom L. (2002) Serine protease mechanism and specificity, *Chem Rev.* 102, 4501-4523.

99. López-Otín C, Bond JS. (2008) Proteases: multifunctional enzymes in life and disease, *J Biol Chem.* 283(45), 30433-30437.

100. Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. (2010) MEROPS: the peptidase database, *Nucleic Acids Res.* 38, D227-D233.

101. Shigetomi H, et al. (2010) Anti-inflammatory actions of serine protease inhibitors containing the Kunitz domain, *Inflamm Res.* 59(9), 679-687.

102. Sim RB, Tsiftoglou SA. (2004) Proteases of the complement system, *Biochem Soc Trans.* 32, 21-27.

103. Liu X, Yu J, Song S, Yue X, Li Q. (2017) Protease-activated receptor-1 (PAR-1): a promising molecular target for cancer, *Oncotarget.* 8(63), 107334-107345.

104. White MJ, Gomer RH. (2015) Trypsin, Trypsinase, and Thrombin Polarize Macrophages towards a Pro-Fibrotic M2a Phenotype, *PLoS One.* doi: 10.1371/journal.pone.0138748.

105. Day JR, Landis RC, Taylor KM. (2006) Aprotinin and the protease-activated receptor 1 thrombin receptor: antithrombosis, inflammation, and stroke reduction, *Semin Cardiothorac Vasc Anesth.* 10(2), 132-142.

106. Pugia MJ, Valdes R J, Jortani SA. (2007) Bikunin (urinary trypsin inhibitor): structure, biological relevance, and measurement, *Adv Clin Chem.* 44, 223-245.

107. Heutinck KM, ten Berge IJ, Hack CE, Hamann J, Rowshani AT. (2010) Serine proteases of the human immune system in health and disease, *Mol Immunol.* 47(11-12), 1943-1955.

108. Laskowski M Jr, Kato I. (1980) Protein inhibitors of proteinases, *Annu Rev Biochem.* 49, 593-626.
109. Krowarsch D, Cierpicki T, Jelen F, Otlewski J. (2003) Canonical protein inhibitors of serine proteases, *Cell Mol Life Sci.* 60, 2427-2444.
110. Copeland RA. (2005) Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery A Guide for Medicinal, *Methods Biochem Anal.* 46, 1-265.
111. Morrison JF. (1969) Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalysed reactions by tight-binding inhibitors, *Biochim Biophys Acta.* 185(2), 269-286.
112. Greco WR, Hakala MT. (1979) Evaluation of methods for estimating the dissociation constant of tight binding enzyme inhibitors, *J Biol Chem.* 254(23), 12104-12109.
113. Kuang Q, Purhonen P, Hebert H. (2015) Structure of potassium channels, *Cell Mol Life Sci.* 72, 3677-3693.
114. Kim DM, Nimigean CM. (2016) Voltage-Gated Potassium Channels: A Structural Examination of Selectivity and Gating, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* doi: 10.1101/cshperspect.a029231.
115. Wulff H, Castle NA, Pardo LA. (2009) Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets, *Nat Rev Drug Discov.* 8(12), 982-1001.
116. Cahalan MD, Wulff H, Chandy KG. (2001) Molecular properties and physiological roles of ion channels in the immune system, *J Clin Immunol.* 21(4), 235-252.
117. Tang S, et al. (2017) Extracellular calcium elicits feedforward regulation of the Toll-like receptor-triggered innate immune response, *Cell Mol Immunol.* 14(2), 180-191.
118. Feske S. (2007) Calcium signalling in lymphocyte activation and disease, *Nat Rev Immunol.* 7(9), 690-702.
119. Feske S, Wulff H, Skolnik EY. (2015) Ion channels in innate and adaptive immunity, *Annu Rev Immunol.* 33, 291-353.
120. Mullen KM, et al. (2006) Potassium channels Kv1.3 and Kv1.5 are expressed on blood-derived dendritic cells in the central nervous system, *Ann Neurol.* 60(1), 118-127.
121. Matzner N, Zemtsova IM, Nguyen TX, Duszenko M, Shumilina E, Lang F. (2008) Ion channels modulating mouse dendritic cell functions, *J Immunol.* 181(1), 6803-6809.
122. Crottés D, et al. (2016) Immature human dendritic cells enhance their migration through KCa3.1 channel activation, *Cell Calcium.* 59(4), 198-207.
123. Shao Z, Gaurav R, Agrawal DK. (2015) Intermediate-conductance Calcium-activated Potassium Channel KCa3.1 and Chloride Channel Modulate Chemokine Ligand (CCL19/CCL21)-induced Migration of Dendritic Cells, *Transl Res.* 166(1), 89-102.
124. Vicente R, et al. (2003) Differential voltage-dependent K⁺ channel responses during proliferation and activation in macrophages, *J Biol Chem.* 278(47), 46307-46320.
125. Villalonga N, et al. (2010) Immunomodulation of voltage-dependent K⁺ channels in macrophages: molecular and biophysical consequences, *J Gen Physiol.* 135(2), 135-147.
126. Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. (2010) Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles, *Physiol Rev.* 90(1), 291-366.

127. Kan XH, Gao HQ, Ma ZY, Liu L, Ling MY, Wang YY. (2016) Kv1.3 potassium channel mediates macrophage migration in atherosclerosis by regulating ERK activity, *Arch Biochem Biophys.* 591, 150-156.
128. Zhu H, Yan L, GU J, Hao W, Cao J. (2015) Kv1.3 channel blockade enhances the phagocytic function of RAW264.7 macrophages, *Sci China Life Sci.* 58(9), 867-875.
129. Nesai BN, Leitinger N. (2014) Purinergic and Calcium Signaling in Macrophage Function and Plasticity, *Front Immunol.* doi: 10.3389/fimmu.2014.00580.
130. Di A, et al. (2018) The TWIK2 Potassium Efflux Channel in Macrophages Mediates NLRP3 Inflammasome-Induced Inflammation, *Immunity.* 49(1), 56-65.
131. Schroeder ME, et al. (2017) Pro-inflammatory Ca⁺⁺-activated K⁺ channels are inhibited by hydroxychloroquine, *Sci Rep.* doi: 10.1038/s41598-017-01836-8.
132. Toyama K, et al. (2008) The intermediate-conductance calcium-activated potassium channel KCa3.1 contributes to atherogenesis in mice and humans, *J Clin Invest.* 118(9), 3025-3037.
133. Xu R, et al. (2016) Role of KCa3.1 Channels in Macrophage Polarization and Its Relevance in Atherosclerotic Plaque Instability, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 37(2), 226-236.
134. Rangaraju S, gearing M, Jin LW, Levey A. (2015) Potassium channel Kv1.3 is highly expressed by microglia in human Alzheimer's disease, *J Alzheimers Dis.* 44(3), 797-808.
135. Nguyen HM, et al. (2017) Differential Kv1.3, KCa3.1, and Kir2.1 expression in "classically" and "alternatively" activated microglia, *Glia.* 65(1), 106-121.
136. Nguyen HM, Blomster LV, Christophersen P, Wulff H. (2017) Potassium channel expression and function in microglia: Plasticity and possible species variations, *Channels (Austin).* 11(4), 305-315.
137. Chen YJ, et al. (2016) The potassium channel KCa3.1 constitutes a pharmacological target for neuroinflammation associated with ischemia/reperfusion stroke, *J Cereb Blood Flow Metab.* 36(12), 2146-2161.
138. Chandy KG, Norton RS. (2017) Peptide blockers of Kv1.3 channels in T cells as therapeutics for autoimmune disease, *Curr Opin Chem Biol.* 38, 97-107.
139. Shen B, Cao Z, Li W, Sabatier JM, Wu Y. (2017) Treating autoimmune disorders with venom-derived peptides, *Expert Opin Biol Ther.* 17(9), 1065-1075.
140. Hanukoglu I. (2017) ASIC and ENaC type sodium channels: conformational states and the structures of the ion selectivity filters, *FEBS J.* 284 (4), 525-545.
141. Gründer S, Pusch M. (2015) Biophysical properties of acid-sensing ion channels (ASICs), *Neuropharmacology* 94, 9-18.
142. Boscardin E, Alijevic O, Hummler E, Frateschi S, Kellenberger S. (2016) The function and regulation of acid-sensing ion channels (ASICs) and the epithelial Na(+) channel (ENaC): IUPHAR Review 19, *Br J Pharmacol.* 173(18), 2671-701.
143. Kweon HJ, Suh BC. (2013) Acid-sensing ion channels (ASICs): therapeutic targets for neurological diseases and their regulation, *BMB Rep.* 46(6), 295-304.
144. Rash DL. (2017) Acid-Sensing Ion Channel Pharmacology, Past, Present, and Future, *Adv Pharmacol.* 79, 35-66.
145. Dorofeeva NA, Barygin OI, Staruschenko A, Bolshakov KV, Magazanik LG. (2008) Mechanisms of non-steroid anti-inflammatory drugs action on ASICs expressed in hippocampal interneurons, *J Neurochem.* 106, 429-441.

146. Kong X, *et al.* (2013) Extracellular acidosis modulates the endocytosis and maturation of macrophages, *Cell Immunol.* 281(1), 44-50.
147. Ni L, *et al.* (2018) Identification and Function of Acid-sensing Ion Channels in RAW 264.7 Macrophage Cells, *Curr Med Sci.* 38(3), 436-442.
148. Tong J, Wu WN, Kong X, Wu PF, Tian L, Du W, Fang M, Zheng F, Chen JG, Tan Z, Gong F. (2011) Acid-Sensing Ion Channels Contribute to the Effect of Acidosis on the Function of Dendritic Cells, *J Immunol.* 186, 3686-3692.
149. Cristofori-Armstrong B, Rash LD. (2017) Acid-sensing ion channel (ASIC) structure and function: Insights from spider, snake and sea anemone venoms, *Neuropharmacology.* 127, 173-184.
150. Rodríguez de la Vega RC, Merlino E, Becerril B, Possani LD. (2003) Novel interactions between K⁺ channels and scorpion toxins, *Trends Pharmacol Sci.* 24(5), 222-227.
151. Mouhat S, De Waard M, Sabatier JM. (2005) Contribution of the functional dyad of animal toxins acting on voltage-gated Kv1-type channels, *J Pept Sci.* 11(2), 65-68.
152. Jin L, Wu Y. (2011) Molecular mechanism of δ -dendrotoxin-potassium channel recognition explored by docking and molecular dynamic simulations, *J Mol Recognit.* 24(1), 101-107.
153. Yuan CH, *et al.* (2008) Discovery of a distinct superfamily of Kunitz-type toxin (KTT) from tarantulas, *PLoS One.* doi: 10.1371/journal.pone.0003414.
154. Harvey AL, Robertson B. (2004) Dendrotoxins: structure-activity relationships and effects on potassium ion channels, *Curr Med Chem.* 11(23), 3065-3072.
155. Chen ZY, *et al.* (2012) Hg1, novel peptide inhibitor specific for Kv1.3 channels from first scorpion Kunitz-type potassium channel toxin family, *J Biol Chem.* 287(17), 13813-21.
156. Rodríguez AA, *et al.* (2014) A novel sea anemone peptide that inhibits acid-sensing ion channels, *Peptides.* 53, 3-12.
157. Diochot S, *et al.* (2004) A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons, *EMBO J.* 23, 1516-25.
158. Escoubas P, *et al.* (2000) Isolation of a tarantula toxin specific for a class of proton-gated Na⁺ channels, *J Biol Chem.* 275, 25116-21.
159. Dawson RJ, *et al.* (2012) Structure of the acid-sensing ion channel 1 in complex with the gating modifier Psalmotoxin 1, *Nat Commun.* doi: 10.1038/ncomms1917.
160. Kooyman FN, van Balkom BW, de Vries E, van Putten JP. (2008) Identification of a thrombospondin-like immunodominant and phosphorylcholine-containing glycoprotein (GP300) in *Dictyocaulus viviparus* and related nematodes, *Mol Biochem Parasitol.* 163(2), 85-94.
161. Milstone AM, Harrison LM, Bungiro RD, Kuzmic P, Cappello M. (2000) A broad spectrum Kunitz type serine protease inhibitor secreted by the hookworm *Ancylostoma ceylanicum*, *J Biol Chem.* 275(38), 29391-29399.
162. Bozas SE, *et al.* (1995) Characterisation of a novel Kunitz-type molecule from the trematode *Fasciola hepatica*, *Mol Biochem Parasitol.* 74(1), 19-29.
163. Falcón CR, Masih D, Gatti G, Sanchez MC, Motrán CC, Cervi L. (2014) *Fasciola hepatica* Kunitz type molecule decreases dendritic cell activation and their ability to induce inflammatory responses, *PLoS One,* 9(12), doi: 10.1371/journal.pone.0114505.

164. Smith D, *et al.* (2016), Unexpected Activity of a Novel Kunitz-type Inhibitor: INHIBITION OF CYSTEINE PROTEASES BUT NOT SERINE PROTEASES, *J Biol Chem*, 291(37), 19220-19234.
165. Ranasinghe SL, Fischer K, Gobert GN, McManus DP. (2015) A novel coagulation inhibitor from *Schistosoma japonicum*, *Parasitology*. 142(14), 1663-1672.
166. Ranasinghe SL, Fischer K, Gobert GN, McManus DP. (2015) Functional expression of a novel Kunitz type protease inhibitor from the human blood fluke *Schistosoma mansoni*, *Parasit Vectors*. doi: 10.1186/s13071-015-1022-z.
167. Fló M, *et al.* (2017) Functional diversity of secreted cestode Kunitz proteins: Inhibition of serine peptidases and blockade of cation channels, *PloS Pathog*. doi: 10.1371/journal.ppat.1006169.
168. Zheng *et al.* (2013) The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*, *Nature Genetics*. 45, 1168-1175.
169. Tsai IJ *et al.* (2013) The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism, *Nature*. 496, 57-63.
170. González S. (2004) Inhibidores tipo Kunitz en *Echinococcus granulosus*, Tesis de Doctorado en Química.
171. Ranasinghe SL, Fischer K, Zhang W, Gobert GN, McManus DP. (2009) Cloning and Characterization of Two Potent Kunitz Type Protease Inhibitors from *Echinococcus granulosus*, *PloS Negl Trop Dis*. doi: 10.1371/journal.pntd.0004268.
172. Ranasinghe SL, Boyle GM, Fischer K, Potriquet J, Mulvenna JP, McManus DP. (2018) Kunitz type protease inhibitor EgKI-1 from the canine tapeworm *Echinococcus granulosus* as a promising therapeutic against breast cancer, *PloS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0200433.
173. Copeland RA. (2000) Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis.
174. Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*. 227, 680-685.
175. Backovic M, Krey T. (2016) Stable Drosophila Cell Lines: An Alternative Approach to Exogenous Protein Expression, *Methods Mol Biol*. 1350, 349-358.
176. Correa A, Ortega C, Obal G, Alzari P, Vincentelli R, Oppezzo P. (2014) Generation of a vector suite for protein solubility screening, *Front Microbiol*. doi: 10.3389/fmicb.2014.00067.
177. Unger T, Jacobovitch Y, Dantes A, Berheim R, Peleg Y. (2010) Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression, *J Struct Biol*. 172(1), 34-44.
178. Kirkpatrick RB. (1995) Heavy chain dimers as well as complete antibodies are efficiently formed and secreted from *Drosophila* via a BiP-mediated pathway, *J Biol Chem*. 270(34), 19800-19805.
179. Bunch TA, Grinblat Y, Goldstein LS. (1988) Characterization and use of the *Drosophila* metallothionein promoter in cultured *Drosophila melanogaster* cells, *Nucleic Acids Res*. 16(3), 1043-1061.
180. Fló M. (2015) Estudio de la diversidad funcional de una familia de inhibidores Kunitz de *Echinococcus granulosus*, Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas.
181. Lutz MB, *et al.* (1999) An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow, *J Immunol Methods*. 223(1), 77-92.

182. Nozach H, *et al.* (2013) High throughput screening identifies disulfide isomerase DsbC as a very efficient partner for recombinant expression of small disulfide-rich proteins in *E. coli*, *Microb Cell Fact.* doi: 10.1186/1475-2859-12-37.
183. Schneider I. (1972) Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*, *J Embryol Exp Morphol.* 27(2), 353-365.
184. Johansen H, van der Straten A, Sewwt R, Otto E, Maroni G, Rosenberg M. (1989) Regulated expression at high copy number allows production of a growth-inhibitory oncogene product in *Drosophila* Schneider cells, *Genes Dev.* 3(6), 882-889.
185. Jorge SAC, Santos AS, Spina A, Pereira CA. (2008) Expression of the hepatitis B virus surface antigen in *Drosophila* S2 cells, *Cytotechnology.* 57(1), 51-59.
186. March ME, Gross CC, Long EO. (2013) Use of transfected *Drosophila* S2 cells to study NK cell activation, *Methods Mol Biol.* doi: 10.1007/978-1-60761-362-6_6.
187. Dixon M, Webb EC. (1964) Enzymes.
188. Bhattachary A, Mazumdar S, Leighton SM, Babu CR. (2006) A Kunitz proteinase inhibitor from *Archidendron ellipticum* seeds: purification, characterization, and kinetic properties, *Phytochemistry.* 67, 232-241.
189. Kolkenbrock H, Tschesche H. (1987) A new inhibitor of elastase from the sea anemone (*Anemonia sulcata*), *Biol Chem Hoppe Seyler.* 368(2), 93-99.
190. Zani ML, *et al.* (2004) Kinetics of the inhibition of neutrophil proteinases by recombinant elafin and pre-elafin (trappin-2) expressed in *Pichia pastoris*, *Eur J Biochem.* 271(12), 2370-2378.
191. Vincent JP, Lazdunski M. (1972) Trypsin-pancreatic trypsin inhibitor association. Dynamics of the interaction and role of disulfide bridges, *Biochemistry.* 11(16), 2967-77.
192. Xaus J, Cardó M, Valledor AF, Soler C, Lloberas J, Celada A. (1999) Interferon gamma induces the expression of p21waf-1 and arrests macrophage cell cycle, preventing induction of apoptosis, *Immunity.* 11(1), 103-113.
193. Shouwan T, Liang K, Junjie O, Hanfa Z. (2006) Adsorption of Endotoxin on Polymyxin B Immobilized Affinity Matrices, *Chin J Anal Chem.* 34(4), 455-458.
194. Bartok A, *et al.* (2014) Margatoxin is a non-selective inhibitor of human Kv1.3 K⁺ channels, *Toxicol.* 87, 6-16.
195. Schmitz A, *et al.* (2005) Design of PAP-1, a selective small molecule Kv1.3 blocker, for the suppression of effector memory T cells in autoimmune diseases, *Mol Pharmacol.* 68(5), 1254-1270.
196. Wulff H, Miller MJ, Hansel W, Grissmer S, Cahalan MD, Chandy KG. (2000) Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, *IKCa1*: A potential immunosuppressant, *Proc Natl Acad Sci USA.* 97(14), 8151-8156.
197. Strobaek D, *et al.* (2013) NS6180, a new K(Ca) 3.1 channel inhibitor prevents T-cell activation and inflammation in a rat model of inflammatory bowel disease, *Br J Pharmacol.* 168(2), 432-444.
198. Kong, X, *et al.* (2013) Extracellular acidosis modulates the endocytosis and maturation of macrophages, *Cell Immunol.* 281, 44-50.
199. Palsson-McDermott EM and O'Neill LAJ. (2013) The Warburg effect then and now: From cancer to inflammatory diseases, *Bioessays* 35.
200. Masatsugu O, Anjana R. (2009) The calcium/NFAT pathway: role in development and function of regulatory T cells, *Microbed Infect.* 11(5), 612-619.

201. Minematsu H, *et al.* (2011) Nuclear presence of nuclear factor of activated T cells (NFAT) c3 and c4 is required for Toll-like receptor-activated innate inflammatory response of monocytes/macrophages, *Cell Signal.* 23(11), 1785-1793.
202. Zanoni I, Granucci F. (2012) Regulation and dysregulation of innate immunity by NFAT signaling downstream of pattern recognition receptors (PRRs), *Eur J Immunol.* 42(8), 1924-1931.
203. Liu Z, Lee J, Krummey A, Lu W, Cai H, Lenardo MJ. (2011) Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) regulates inflammatory bowel disease through the Nuclear Factor of Activated T cells (NFAT), *Nat Immunol.* 12(11), 1063-1070.
204. Mouchemore KA, Pixley FJ. (2012) CSF-1 signaling in macrophages: pleiotrophy through phosphotyrosine-based signaling pathways, *Crit Rev Clin Lab Sci.* 49(2), 49-61.
205. Schilling T, Miralles F, Eder C. (2014) TRPM7 regulates proliferation and polarisation of macrophages, *J Cell Sci.* 127, 4561-4566.
206. Hailfinger S, Rebeaud F, Thome M. (2009) Adapter and enzymatic functions of proteases in T-cell activation, *Immunol Rev.* 232(1), 334-347.
207. Katoh E, *et al.* (2000) Structural basis for the biological activity of dendrotoxin-I, a potent potassium channel blocker, *Biopolymers.* 54, 44-57.
208. Smith LA, *et al.* (1997) Site-directed mutagenesis of dendrotoxin K reveals amino acids critical for its interaction with neuronal K⁺ channels, *Biochemistry.* 36, 7690-7696.
209. Gasparini S, *et al.* (1998) Delineation of the functional site of α -dendrotoxin: The functional topographies of dendrotoxins are different but share a conserved core with those of other Kv1 potassium channel-blocking toxins, *J Biol Chem.* 273, 25393-25403.
210. Langrish CL, McKenzie BS, Wilson NJ, de Waal Malefyt R, Kastelein RA, Cua DJ. (2004) IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity, *Immunol Rev.* 202, 96-105.
211. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. (2014) IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* doi: 10.1101/cshperspect.a016295.
212. Chaudhryl A, *et al.* (2011) Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation, *Immunity.* 34(4), 566-578.
213. Yao Y, *et al.* (2015) Tr1 Cells, but Not Foxp3⁺ Regulatory T Cells, Suppress NLRP3 Inflammasome Activation via an IL-10-Dependent Mechanism, *J Immunol.* 195(2), 488-497.
214. Sky Ng TH, *et al.* (2013) Regulation of Adaptive Immunity; The Role of Interleukin-10, *Front Immunol.* doi: 10.3389/fimmu.2013.00129.
215. Ditgen D, *et al.* (2014) Harnessing the Helminth Secretome for Therapeutic Immunomodulators, *Biomed Res Int.* doi: 10.1155/2014/964350.