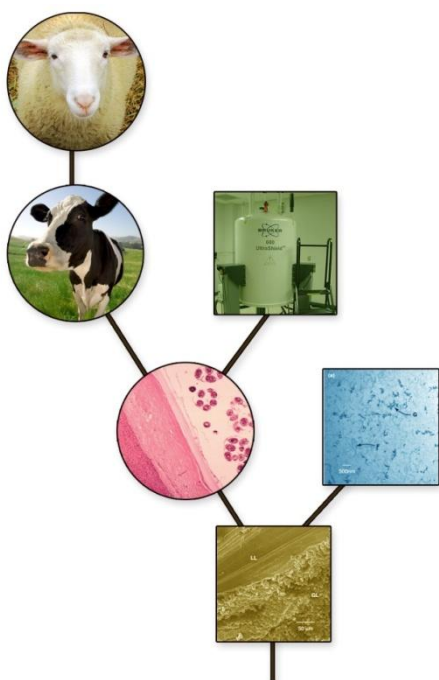




Elucidación de nuevos O-glicanos mucínicos de la capa laminar de *Echinococcus granulosus*

Tesis de Maestría en Química de Q.F. Gerardo Lin

Tutor: Dr. Álvaro Díaz

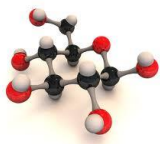
Octubre de 2012



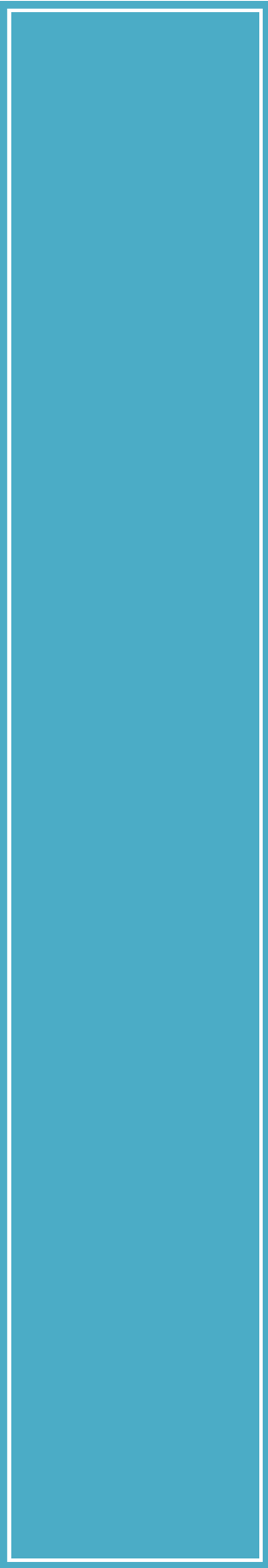


Tabla de contenido

Resumen	5
1. Introducción	8
1.1 Zoonosis causadas por el género <i>Echinococcus</i>	8
1.2 Generalidades sobre <i>Echinococcus granulosus</i>	10
1.3 Generalidades de la capa laminar de <i>Echinococcus granulosus</i>	13
1.4 Consideraciones para la elucidación de oligosacáridos	15
1.5 Principales clases de glicanos en animales	20
1.5.1 Glicanos conjugados a proteínas	20
1.5.2 Glicanos conjugados a lípidos	22
1.6 Glicobiología de cestodos ciclofilídeos	24
1.6.1 N-glicanos	24
1.6.2 Glicolípidos	27
1.6.3 O-glicanos	28
1.7 Glicanos mucínicos de la capa laminar de <i>Echinococcus granulosus</i>	31
1.8 Posibles esqueletos peptídicos de las mucinas de la CL	33
1.9 El anticuerpo monoclonal E492 y su aplicación en el estudio de la capa laminar de <i>E. granulosus</i>	37
2. Objetivos	40
3. Materiales y Métodos	42
3.1 Material parasitario	42
3.2 Glicanos de la Capa laminar y glicanos sintéticos	43
3.3 Glicanos de síntesis	46
3.4 Análisis de glicanos permetilados por espectrometría de masas	47
3.5 Análisis de posiciones de sustitución (análisis de metilación)	49
3.6 Resonancia Magnética Nuclear (NMR)	50
3.7 Estrategia general de elucidación de nuevos O-glicanos de la CL	51
3.8 Determinación de la especificidad del anticuerpo monoclonal E492	52



3.9 Corroboración inmunoquímica de estructuras utilizando el anticuerpo monoclonal E492	53
4. Resultados	55
4.1 Comparación de <i>O</i> -glicanos de la capa laminar de hidátides de hospedero bovino y ovino.	55
4.1.1 Purificación por <i>gel-filtración</i> y análisis por MS ¹ de <i>O</i> -glicanos de la capa laminar de hidátides de hospedero bovino y ovino.	55
4.1.2 Análisis por HPLC y MS ² de <i>O</i> -glicanos de la capa laminar de hidátides de hospedero bovino y ovino	57
4.3 Elucidación estructural completa de nuevos <i>O</i> -glicanos de la capa laminar de <i>E. granulosus</i>	80
4.4 Determinación de la especificidad del anticuerpo monoclonal E492	105
4.5 Uso del anticuerpo monoclonal E492 como herramienta de elucidación estructural parcial	108
5. Discusión y conclusiones	112
5.1 Repertorio estructural de <i>O</i> -glicanos de la capa laminar de <i>Echinococcus granulosus</i> .	112
5.1.1 Glicoma de la CL de <i>E. granulosus</i> en distintos hospederos	112
5.1.2 Conjunto de posibilidades estructurales de <i>O</i> -glicanos la CL	113
5.2 Comparación de los <i>O</i> -glicanos de la CL con otros glicanos mucínicos conocidos	117
5.2.1 <i>Cores</i> desnudos o truncados y glicanos cortos	117
5.2.2 Glicanos largos	118
5.3 Los glicanos de la CL en comparación en relación a la glicobiología de otros platelmintos parásitos de interés	121
5.4 Relación entre los motivos estructurales glucídicos de la CL y el reconocimiento por anticuerpos	122
5.4.1 Reactividad anti- P1 en la CL	122
5.4.2 Anticuerpos que reconocen carbohidratos la CL de <i>Equinococcus spp.</i> como herramienta de elucidación estructural.	123
5.4.3 El <i>cap</i> de Gal(1-4) como epítipo relevante en inmunodiagnóstico	124
5.5 Perspectivas	126
6. Agradecimientos	129
7. Referencias Bibliográficas	131



RESUMEN

Resumen

La capa laminar (CL) de la hidátide, correspondiente al estadio larvario del cestodo *Echinococcus granulosus* es una estructura acelular rica en glúcidos que define la interfaz parásito-hospedero. La CL, además de actuar como barrera para el pasaje de células del sistema inmune, contribuye al control ejercido por el parásito sobre la respuesta inflamatoria del hospedero.

Resultados precedentes revelaron que la CL contiene una serie de O-glicanos mucínicos relacionados entre sí, principalmente *cores* mucínicos 1 y 2 desnudos y glicanos pequeños derivados de la elongación sobre el residuo de Gal(β 1-3) de estos *cores* con más residuos de Gal(β 1-3), y la posibilidad de decoración en la posición 4 del residuo de GlcNAc del *core* 2 con el disacárido Galp(α 1-4)Galp(β 1-). La elucidación de las posibilidades estructurales de glicanos de la CL no estaba completada, ya que se habían encontrado glicanos mayores analizados anteriormente solo por MS¹, con hasta 4 residuos de HexNAc, los cuales no quedaban contemplados dentro del repertorio estructural hallado hasta el momento.

Otra interrogante pendiente del trabajo precedente surge del hecho que la cepa en estudio del parásito (G1), no está bien adaptada al hospedero bovino, del cual se obtuvieron las muestras analizadas originalmente. Esto planteaba la posibilidad que dichas muestras no fuesen representativas de la biología de la hidátide en términos de los glicanos presentes.

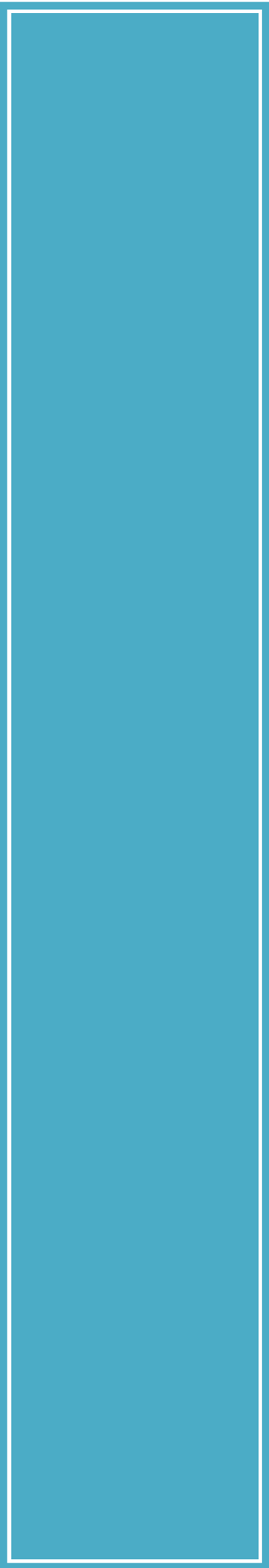
En primer lugar se compararon los resultados de las muestras provenientes del hospedero bovino contra muestras del hospedero ovino, en el cual la hidátide se desarrolla normalmente. La comparación entre las muestras provenientes de ambos hospederos, en términos de distribución de tamaños por *gel*-filtración, perfiles cromatográficos por HPLC, y secuencias (de aproximadamente 30 glicanos individuales) reveló solo diferencias triviales entre los mismos, lo que valida el uso de material de origen bovino para elucidación estructural.

En segundo lugar, mediante análisis de metilación se determinó que en los glicanos más largos no elucidados previamente existían ramificaciones sobre la posición 6 de residuos de Gal; el primer residuo de la rama corresponde a GlcNAc, terminal o sustituida en posición 4. Se determinaron las anomeridades y se confirmaron las configuraciones y posiciones de sustitución mediante 1H-NMR, 2D-COSY, 2D-TOCSY, 2D-ROESY de 6 nuevos glicanos, compuestos por 6 a 8 residuos. Se determinó la identidad de las ramificaciones como GlcNAc(β 1-6) y su derivado Galp(α 1-4)Galp(β 1-4)GlcNAc(β 1-6). Estos motivos, junto con los previamente conocidos, parecen alcanzar para explicar todos los componentes del glicoma de la CL, detectados a nivel de MS¹, y/o estudiados a nivel de MS², tanto en esta Tesis como en el trabajo

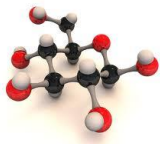
precedente. En suma, es probable que se haya completado la descripción del repertorio de motivo estructurales de los *O*-glicanos mucínicos de la CL.

Finalmente, se determinó la especificidad, dentro de la CL, del anticuerpo monoclonal E492, generado por colaboradores contra otra estructura del parásito (protoescólices). El anticuerpo reconoce el motivo del grupo sanguíneo P1, $\text{Galp}(\alpha 1-4)\text{Galp}(\beta 1-4)\text{GlcNAcp}(\beta 1-6)$, identificado en la CL originalmente como formado a partir del residuo de GlcNAc del *core* 2, e identificado en esta Tesis además como formando ramificaciones del esqueleto principal de $\text{Gal}(\beta 1-3)$.

Estos resultados, en conjunto los del antecedente directo a esta Tesis, constituyen el trabajo más exhaustivo de elucidación estructural formal de glúcidos de cestodos, y sienta las bases para responder preguntas históricas sobre los determinantes antigénicos de la CL, sus propiedades mecánicas, su biosíntesis y su interacción con el sistema inmune innato del hospedero.



INTRODUCCIÓN



1. Introducción

1.1 Zoonosis causadas por el género *Echinococcus*

La equinococosis es una enfermedad zoonótica causada por parásitos cestodos del género *Echinococcus*, pertenecientes a la familia *Taeniidae*, orden *Cyclophyllidea*. Tradicionalmente, se reconocían cuatro especies: *Echinococcus granulosus*, *E. multilocularis*, *E. vogeli*, *E. oligarthrus*, [1]; recientemente se incorporaron a este género cuatro especies más: *E. equinus*, *E. ortleppi*, *E. shiquicus* y *E. felidis*, habiendo sido las primeras dos previamente consideradas cepas dentro de la especie *E. granulosus* [2-4].

La equinococosis quística, la forma más común de la enfermedad en personas y animales domésticos, es ocasionada por *Echinococcus granulosus*. Esta enfermedad está globalmente distribuida, con particular endemidad en el cono sur de América latina, el norte de África y el litoral mediterráneo, y zonas a lo largo de Asia central (**Figura 1**). Las larvas de este organismo se desarrollan como vesículas uniloculares independientes llenas de líquido (líquido hidático), lo que lo hace la forma menos grave y de más fácil tratamiento. No obstante, hidátides múltiples pueden producir daño irreversible a los órganos, y la ruptura o perforación de la hidátide puede sembrar de larvas a varios órganos (hidatidosis secundaria) y/o causar reacciones anafilácticas. Por lo general, la sintomatología en seres humanos surge muchos años luego de establecida la infección. La mayoría del ganado muere antes de que la larva se desarrolle lo suficiente como para causar signos clínicos, pero el ciclo se perpetúa si sus vísceras crudas se utilizan para alimentar perros. Además, la equinococosis quística provoca pérdidas económicas por el decomiso de los órganos internos en la inspección de la carne. En algunos casos, también puede ocasionar una disminución en la producción de carne y leche, o una disminución del valor del vellón a causa del debilitamiento.

Tradicionalmente, la especie *E. granulosus* ha sido dividida en cepas, denominadas G1 a G10, que presentan diferente especificidad de hospedero. Las cepas pueden diferenciarse en su morfología, grado de desarrollo, virulencia, alcance geográfico y otros factores. Dos cepas, la cepa G1-oveja y la cepa de Tasmania G2-oveja, utilizan principalmente a las ovejas como su hospedero intermediario, pero también pueden infectar a otras especies. La cepa G1 es la más ampliamente distribuida en todos los continentes y es prevalente en nuestro país (Gustavo Mourglia, comunicación personal), en tanto que la cepa G2 se ha encontrado en Australia y Tasmania. La cepa



G3 infecta búfalos y se transmite por el agua, y se ha registrado en Asia del sur. La cepa G4, que sólo utiliza équidos como hospederos intermediarios, no madura en medios que estimulan el crecimiento de las cepas de ovejas, no parece ser zoonótica, y en la clasificación actual más moderna se la considera una especie, *E. equinus*, ya nombrada. Su distribución se limita al Mediterráneo y a regiones de Sudáfrica. A la cepa de bovinos, G5, también se ha designado como una nueva especie, *Echinococcus ortleppi*, ya nombrada; se encuentra en los cinco continentes y es inusual que infecte a seres humanos. Las restantes cepas no están bien diferenciadas entre sí, pero son claramente distintas de la cepa de oveja-G1; estas comprenden a la cepa camello G6, de cerdo G7, una cepa pobremente definida G9, y 2 cepas de cérvido, G8 y G10. Solamente se ha informado la cepa G9 en casos de humanos en Polonia, y algunos autores consideran que es una variante de la cepa cerdo G7.

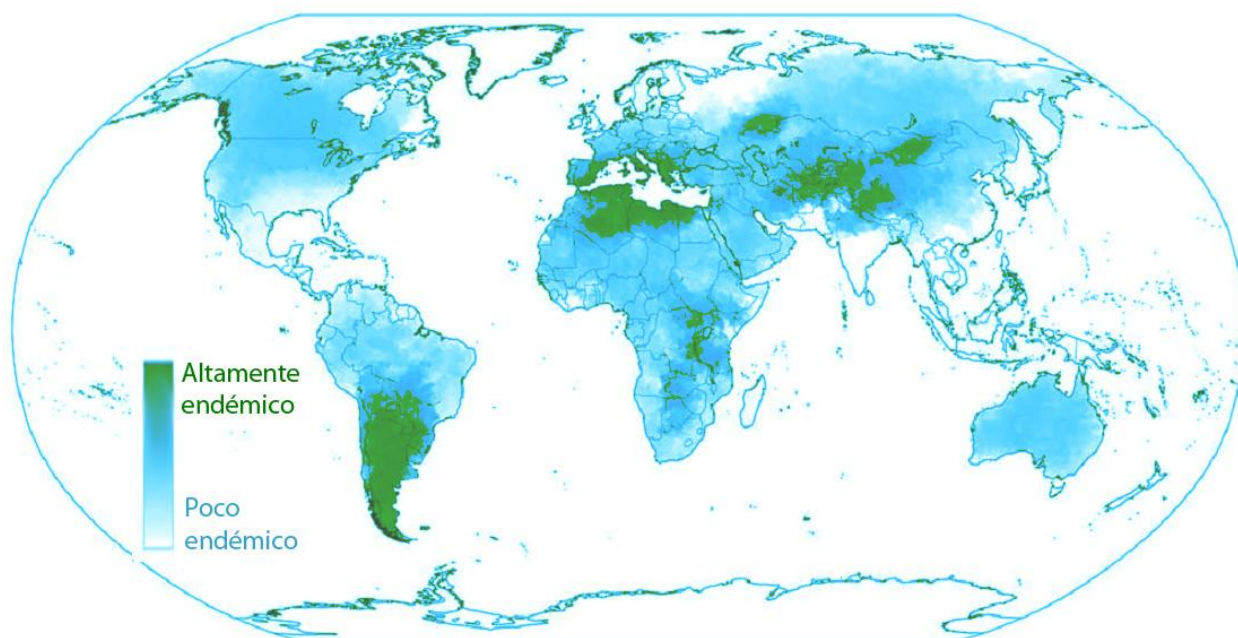


Figura 1: Distribución geográfica de zonas endémicas para *E. granulosus*. Adaptado de [4]

La equinococosis alveolar, causada por *E. multilocularis* (la especie más cercanamente emparentada a *E. granulosus*), de distribución geográfica más restringida, es más grave y difícil de tratar. Las larvas de este organismo se extienden como una red de vesículas conectadas, que, a partir del sitio de instalación primario, el hígado, no solo invaden este órgano sino que pueden diseminarse a lugares del cuerpo alejados, como el cerebro. La equinococosis poliquística, por lo



general causada por *Echinococcus vogeli* en humanos, es intermedia a las anteriormente mencionadas con respecto al crecimiento de las larvas.

1.2 Generalidades sobre *Echinococcus granulosus*

El ciclo de vida de *E. granulosus* involucra un hospedero definitivo (cánido) en cuyo intestino delgado se encuentra la forma adulta, y hospederos secundarios (generalmente ungulados) en cuyas vísceras se desarrolla la forma larvaria (metacestodo o hidátide). Los hospederos definitivos se infectan cuando ingieren hidátides de los tejidos del hospedero intermediario infectado (**Figura 2**). El estadio adulto hermafrodita se desarrolla y reproduce en el intestino delgado; sus proglótidas grávidas liberan huevos embrionados que se eliminan en las heces del perro, e inmediatamente son infecciosas para los potenciales hospederos secundarios.

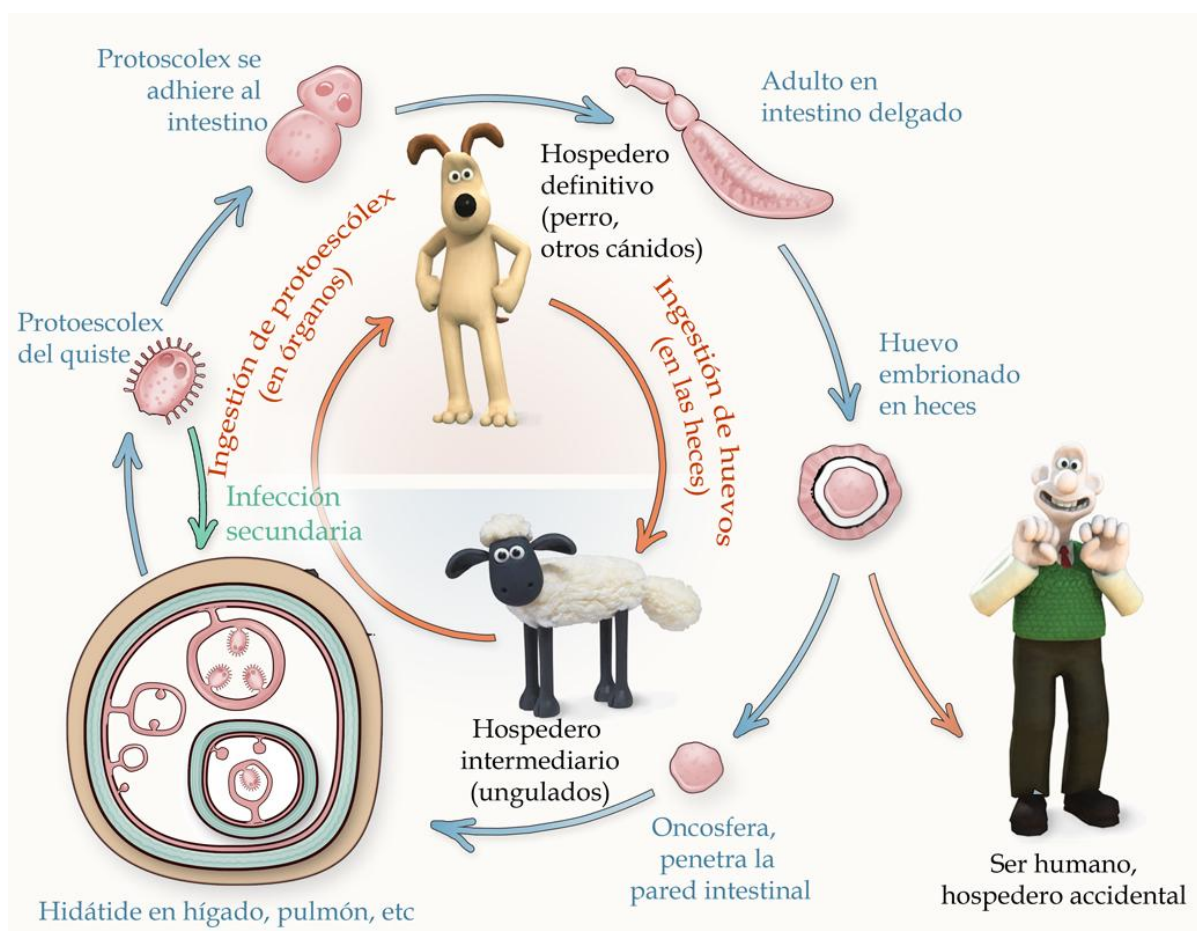


Figura 2: Ciclo de vida de *Echinococcus granulosus* Las flechas celestes indican la progresión entre los distintos estadios del parásito; las flechas rojas muestran la alternancia entre hospederos, y la flecha verde indica diferenciación reversa que da lugar a infección secundaria en el hospedero intermediario. Adaptado de www.cdc.gov/parasites/echinococcosis/biology.html



Los hospederos intermediarios comprenden un gran número de animales silvestres y domésticos, en especial herbívoros, y accidentalmente el ser humano. Si un hospedero intermediario ingiere los huevos, estos eclosionan y se liberan las oncosferas, las cuales penetran la pared del intestino, y son transportadas por el torrente sanguíneo o la linfa a los órganos blanco. Los parásitos pueden desarrollarse a hidátides en distintos órganos, pero se encuentran con mayor frecuencia en el hígado y en segundo lugar en los pulmones [5]. Las hidátides se desarrollan lentamente por crecimiento concéntrico. Las mismas están rodeadas por la reacción del hospedero, denominada capa adventicia; en su conjunto, la hidátide más la capa adventicia se denomina quiste hidático. La hidátide está delimitada por una pared que consta de dos capas ambas provenientes del parásito: capa exterior laminada, llamada la capa laminar (CL) y una capa interior denominada capa germinativa (**Figura 3A**) [1]. La capa germinativa es la parte celular viva del parásito, que sintetiza a la CL hacia el exterior y al líquido hidático hacia el interior.

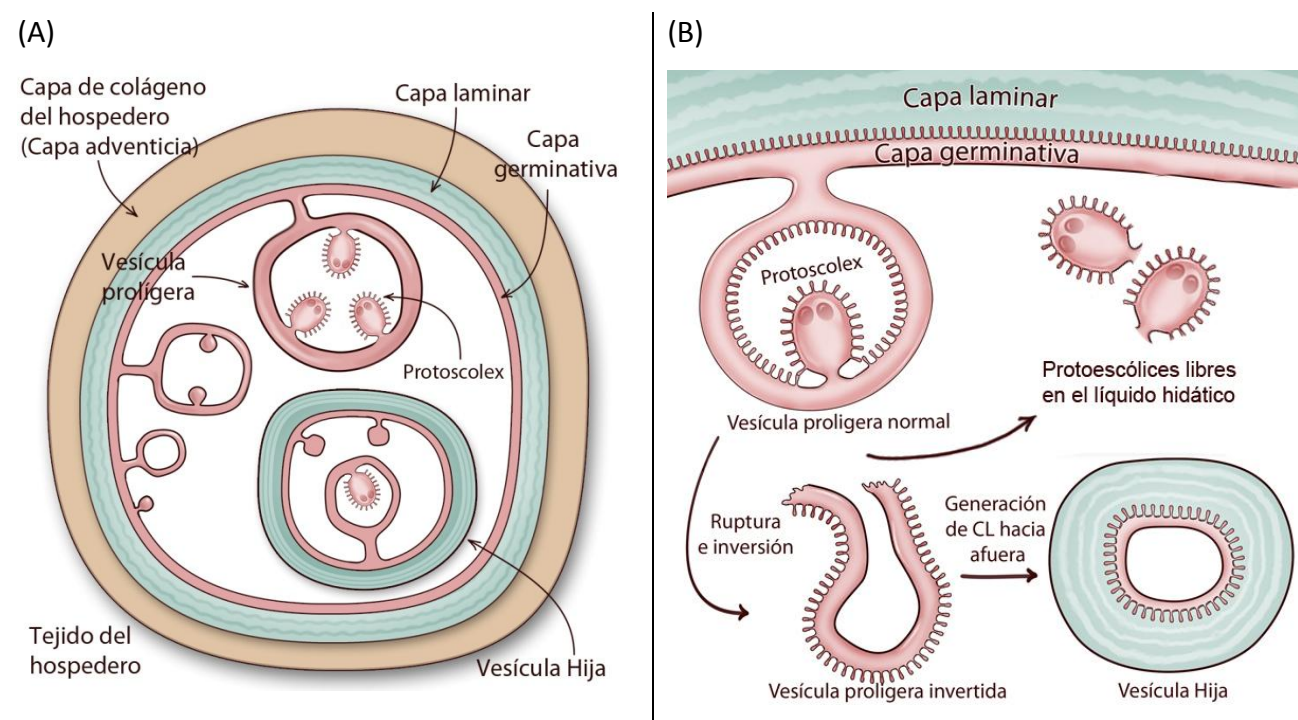


Figura 3: Estadíos larvarios de *E. granulosus* (A) Esquema de las estructuras que componen al metacestodo de *E. granulosus*. (B) Mecanismo propuesto de generación de vesículas hijas.

A partir de la capa germinativa se desarrollan vesículas prolíferas, que contienen protoescolices y eventualmente pueden dar lugar a vesículas hijas dentro de la hidátide principal por ruptura, inversión y síntesis de CL propia (**Figura 3B**). Las vesículas y los protoescolices flotan libremente en



el líquido hidatídico o se adhieren a la pared a través un pedúnculo. Si un quiste se rompe, los protoescolices libres pueden sufrir diferenciación reversa hacia nuevas hidátides, lo que se conoce como infección secundaria (**Figura 2**, flecha verde).

Típicamente, cuando el parásito está bien establecido y tiene la respuesta inflamatoria del hospedero bajo control, la capa adventicia que rodea a la hidátide es de colágeno y no está infiltrada con células del sistema inmune. Asimismo, estas hidátides suelen ser fértiles, es decir que contienen protoescolices y eventualmente vesículas hijas. Sin embargo, algunas hidátides son estériles (nunca producen vesículas con protoescolices) o se vuelven estériles después de una infección bacteriana o calcificación. El porcentaje de hidátides estériles varía con el hospedero intermediario y su susceptibilidad a una cepa particular. Visto de otro modo, probablemente depende de cuán eficaz sea esa cepa del parásito en controlar la respuesta inmunológica de ese hospedero intermediario [6]. Es preciso aclarar que una hidátide puede no ser fértil simplemente porque el metacestodo no se ha desarrollado lo suficiente aún para albergar protoescolices, no siendo esto indicativo del grado de adaptación de esa cepa particular al hospedero. También se pueden observar hidátides con distintos estatus de fertilidad en un mismo órgano para un hospedero dado, expresando niveles diferenciales de antígenos parasitarios (antígeno B, fosfatasa alcalina [7, 8]. Esto sugiere que el control inmunológico podría ser un fenómeno local que parecería involucrar un mayor nivel de apoptosis en hidátides infértiles [9, 10]. aunque los mecanismos precisos no están del todo claros.

Desde el punto de vista de la interacción parásito-hospedero, la hidátide se caracteriza por control inmunológico y resolución de la respuesta inflamatoria local cuando la cepa se desarrolla en el hospedero al cual está adaptada. En estos casos, se genera en torno al metacestodo la capa adventicia compuesta de colágeno, que no está infiltrada con leucocitos. Por el contrario, cuando el hospedero no es el indicado, el metacestodo no es capaz de ejercer el mismo control sobre la inflamación del hospedero, por lo que en lugar de la capa de colágeno del hospedero se encuentra una reacción inflamatoria activa, generalmente de tipo granulomatoso [11]. En estos casos se observan células gigantes multinucleadas (macrófagos especializados) y células epitelioides en empalizada circunvalando a la hidátide en contacto directo, seguidas más externamente, por un infiltrado de células mononucleadas interdigitadas por fibroblastos y capas de colágeno [11, 12]. Se encuentran eosinófilos pero estos no son dominantes, y la reacción granulomatosa es dependiente de células T $CD4^+$, como se ha demostrado al menos para la infección con *E. multilocularis* [13].



Estos dos escenarios se observan para la cepa en estudio, G1, en el hospedero ovino (resolución de la inflamación) y en el hospedero bovino (granuloma)[6].

1.3 Generalidades de la capa laminar de *Echinococcus granulosus*

La CL es una estructura acelular rica en glúcidos de hasta varios milímetros de espesor. Dentro del género *Echinococcus* esta estructura está particularmente desarrollada en *E. granulosus*, en donde puede alcanzar unos pocos milímetros de espesor [14, 15]. Macroscópicamente, la CL es un gel hidratado cohesivo (no es fluido pero sí deformable) de gran resistencia mecánica, lo cual, junto con la presión hidrostática que ejerce el líquido hidático hacia afuera, le confiere turgencia a la hidátide. Esto probablemente es crucial para permitir el desarrollo concéntrico del metacestodo, en oposición a la resistencia que ofrece tejido circundante del hospedero (parénquima hepático o pulmonar). La CL es un elemento central en la interacción parásito hospedero ya que, si bien es permeable a biomoléculas solubles (como inmunoglobulinas y seroalbúmina, por ejemplo), constituye una barrera para el pasaje de células del sistema inmune innato, no activa el sistema de complemento [16], y su formación coincide con la resolución de la inflamación inicial [16].

A nivel de microscopía electrónica de transmisión, la CL de *E. granulosus* se compone de dos tipos de estructuras bien diferenciadas: un entramado de tridimensional fibrillas altamente hidratadas, de aproximadamente 10 nm de diámetro, y gránulos densos a los electrones, ya sea dispersos o en racimos (Figura 4) [17].

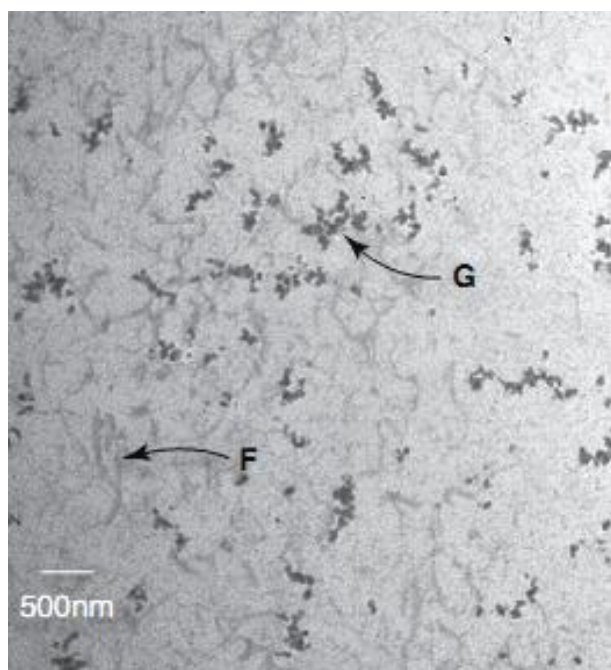
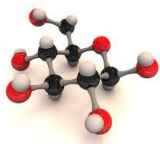


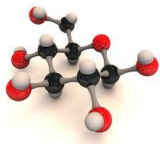
Figura 4: Micrografía electrónica de transmisión de la CL de *E. granulosus*. Se indican las fibrillas (F) y gránulos densos a los electrones (G). Figura tomada de [18]



Nuestro grupo determinó que los gránulos están compuestos por depósitos de la sal cálcica de *myo*-inositol hexakisfosfato (InsP_6 cálcico) [19, 20]. El InsP_6 se caracterizó inicialmente en vegetales, en los cuales fue denominado ácido fítico, siendo la principal reserva de fósforo en semillas, aunque también se acumula en polen, raíces y tubérculos [21, 22]. Posteriormente se demostró que el InsP_6 es ubicuo en eucariotas y es de hecho el inositol fosfato más abundante en las células [23]. Curiosamente, excepto por *E. granulosus*, la localización del InsP_6 es intracelular (nuclear o citosólica) [21], lo que hace que su función biológica en la CL sea más enigmática.

Dado que los gránulos están compuestos por depósitos insolubles de InsP_6 cálcico, se desprende que la parte de la CL que contiene macromoléculas (de naturaleza glucídica al menos en parte) es la red de fibrillas, lo que coincide con datos reportados anteriormente [24]. Los antecedentes históricos a nuestro trabajo [25-28] demostraban que los monosacáridos constituyentes de la CL eran **galactosa**, ***N*-acetilglucosamina** y ***N*-acetilgalactosamina** (en una relación aproximada de 9:3:1), que la CL poseía una porción proteica rica en treonina, y que las porciones glucídica y proteica no se podían separar por métodos bioquímicos que no implicaran ruptura de enlaces covalentes [25, 26, 28]. Estos hallazgos son compatibles con la hipótesis que el componente principal de la capa laminar es de tipo mucínico. Las mucinas son proteínas altamente *O*-glicosiladas, cuyos glicanos pueden contener galactosa (Gal), *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), fucosa (Fuc), ácido siálico, pero no manosa (Man) ni glucosa (Glc) [29]. La usencia de niveles detectables de Man implica que la CL no contiene cantidades apreciables de *N*-glicanos, ya que estos contienen a este residuo en su secuencia *core* ($\text{Man}(\alpha 1-6)\text{Man}(\alpha 1-3)\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-))$ [30].

La composición de monosacáridos de la CL es incompatible también con glicosaminoglicanos (GAGs) del tipo queratán sulfato I, que se unen a sus respectivos esqueletos peptídicos mediante *core* de *N*-glicanos y por lo tanto contienen Man, o del tipo heparan sulfato, condroitin sulfato y dermatán sulfato los cuales están unidos a la apoproteína por residuos de xilosa. Sin embargo, la composición de la CL no es estrictamente incompatible con la posibilidad de glicosaminoglicanos del tipo queratán sulfato II (KS II), que están unidos a los esqueletos peptídicos del proteoglicano mediante un *core* mucínico 2 y por lo tanto contienen GalNAc, GlcNAc y Gal. De todos modos, este GAG contiene residuos monosulfatados (Gal6S y GlcNAc6S) que conforman la cadena característica de poli-*N*-acetilactosamina sulfatada [31], y que no se hallaron en la CL. Además, como se



comentará en la [sección 1.7](#), los glicanos de la CL contienen unos pocos residuos de longitud, a diferencia de los GAGs, cuya naturaleza es polisacáridica, lo que descarta esta posibilidad.

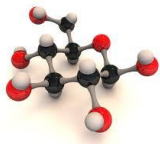
1.4 Consideraciones para la elucidación de oligosacáridos

Antes de comentar nuestro enfoque a la glicobiología de la CL, primero es necesario introducir cuáles son las particularidades y dificultades de elucidar estructuras glucídicas, y cuáles son las herramientas experimentales que se han diseñado para sortear estos obstáculos. La diversidad estructural de los carbohidratos es sustancialmente mayor a la de otras biomoléculas como proteínas y ácidos nucleicos.

Por un lado los “bloques de construcción” mismos, los monosacáridos, pueden ser estructuralmente muy diversos. En principio los monosacáridos son cadenas de unidades quirales de hidroximetileno, terminadas en un grupo hidroximetilo en un extremo, y en el otro en un grupo aldehído (aldosas) o en un grupo α -hidroxicetona (cetosas). Los monosacáridos en solución típicamente existen como un equilibrio entre la forma acíclica y formas cíclicas, originadas por la condensación del grupo carbonilo con un hidroxilo del propio monosacárido, formando un hemiacetal. Esto da lugar a anillos, generalmente de 5 o 6 miembros, que poseen un nuevo centro quiral, el centro anomérico. Asimismo, los monosacáridos pueden tener una variedad de grupos funcionales distintos al grupo hidroxilo, particularmente el grupo acetamido [32]. En organismos procariotas es posible encontrar una enorme diversidad de monosacáridos con grupos funcionales y configuraciones inusuales [33]. Sin embargo, en eucariotas superiores el panorama es más restringido; particularmente, a los efectos de esta Tesis es pertinente acotar que en parásitos helmintos no se encuentran las rutas biosintéticas del ácido siálico (al igual que en el resto de los invertebrados), por lo que la presencia del mismo en muestras de glicanos de muestras parasitarias suele ser indicativo de que provienen del hospedero.

En resumen, la diversidad estructural de monosacáridos abarca diferencias en:

- el número de átomos de carbono,
- la posición del grupo carbonilo (**aldosa o cetosa**)
- la configuración del residuo, que involucra la serie (**D** o **L** dependiendo de la configuración absoluta del centro estereogénico más alejado del grupo carbonilo), y las relaciones estereoquímicas entre los centros quirales (por ejemplo: **Gluco**, **Galacto**,



Mano, Alo, Altro, Gulo, Talo e Ido para monosacáridos de 6 átomos de carbono, véase **Figura 5**).

- El número de átomos del anillo (formas **furanosa** o **piranosa**, por analogía a los oxo-heterocícllos furano y pirano)
- El centro anomérico (α si el hidroxilo en posición 1 posee igual orientación al grupo terminal en el monosacárido ciclado, o β si la orientación es opuesta)
- Los grupos funcionales que presente el monosacárido (grupos hidroxilo libres o metilados, acetilados, sulfatados, fosfatados; grupos amino libres o *N*-acetilados; posiciones deoxigenadas, etc)

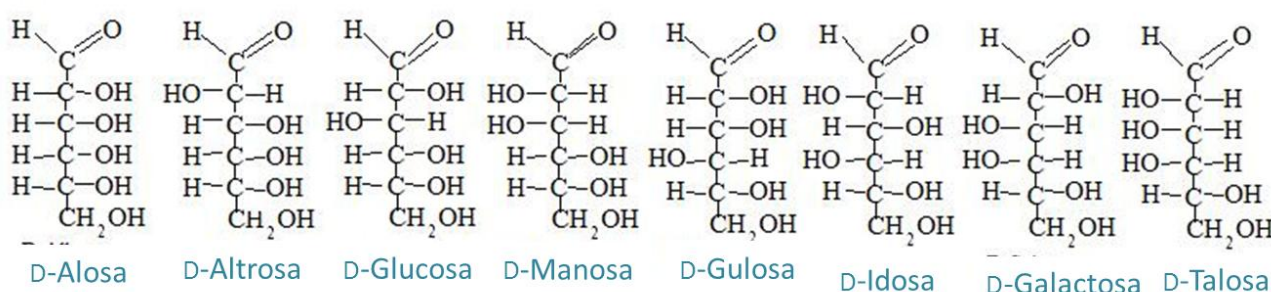
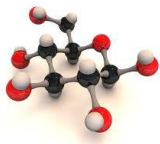


Figura 5: Configuraciones de (+)-D-hexosas. Proyecciones de Fischer de las formas acíclicas de D-hexosas

Por otro lado, en carbohidratos existe posible diversidad de unión entre los monómeros. A diferencia del enlace peptídico o el enlace fosfodiéster, en proteínas y ácidos nucleicos respectivamente, para los cuales usualmente solo existe una posibilidad de unión entre dos monómeros; el enlace glicosídico se da entre la posición anomérica de un residuo ciclado y cualquiera de los hidroxilos libres de otro residuo. Más aún, a diferencia de las otras biomoléculas mencionadas, los carbohidratos presentan la posibilidad de que más de un monosacárido forme enlace glicosídico con hidroxilos de un mismo monosacárido, dando así lugar a ramificaciones.

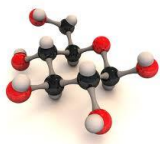
El orden en que se disponen los residuos dentro del glicano, considerando la presencia de ramificaciones, lo denominaremos de ahora en más como la **secuencia** del glicano. Al igual que las proteínas y ácidos nucleicos poseen una direccionalidad, de amino a carboxilo y de 5' a 3' respectivamente, la secuencia de carbohidratos se puede definir desde extremo no-reductor a extremo reductor, si bien es opuesta a la dirección de biosíntesis. En principio, el extremo reductor es aquel residuo que está en equilibrio con su forma abierta reductora; aunque por extensión se denomina extremo reductor aun cuando esté formando un enlace glicosídico con otra molécula



(aglicona) o esté reducido (alditol), en cuyo caso el extremo carece de poder reductor. Nótese que un glicano puede contener más de un extremo no reductor (en caso de ramificaciones), pero solo un extremo reductor [34].

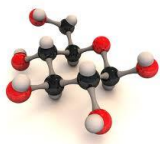
Todos los factores antedichos conducen a que la elucidación completa de un oligosacárido sea una tarea mucho más ardua que la secuenciación de proteínas, o ácidos nucleicos, ya que el alfabeto de los carbohidratos es más flexible, existe diversidad de unión entre los monómeros, no se puede asumir que exista linealidad en la secuencia, y no existe un código (como en código genético) que correlacione en forma directa el lenguaje de los carbohidratos con el de otras macromoléculas. Tampoco es posible incrementar la cantidad de muestra disponible, como en el caso de proteínas (por clonado y expresión transgénica) o en ácidos nucleicos (por PCR) ya que su biosíntesis no es dependiente de un modelo o molde (*template*) y generalmente depende de numerosas actividades enzimáticas concertadas. La implicancia práctica de todo esto es que la elucidación total de un glicano debe recurrir al uso de muchas herramientas experimentales en combinación y aplicarlas a muestras purificadas a partir del material biológico nativo. Se debe destacar además que, dentro del universo de los glúcidos, los oligosacáridos suelen ser más complejos que los polisacáridos, que están compuestos por unidades repetitivas.

Una de las herramientas más útiles para este fin es la espectrometría de masas (MS), que permite determinar el número de residuos de un glicano, el número de átomos de carbono y grupos funcionales de sus monosacáridos, y la secuencia de los residuos. Usualmente se derivatiza el glicano en estudio (por permetilación) para obtener una fragmentación más predecible en torno a los enlaces glicosídicos, casi sin fragmentación de los monosacáridos mismos. Estos fragmentos corresponden a las series B y C desde el extremo no reductor, e Y y Z desde el extremo reductor (véase en más detalle en *Materiales y Métodos*). La información surge entonces de la masa del ión pseudomolecular y del patrón de fragmentación del mismo. Si bien es una técnica destructiva, la espectrometría de masas posee una gran sensibilidad, permitiendo el uso de pequeñísimas cantidades de muestra. La desventaja para aplicar en carbohidratos es que no provee ninguna información estereoquímica. La existencia de fragmentos minoritarios generados por rupturas a través del anillo (fragmentos *crossring*) permite hacer inferencias sobre las posiciones de sustitución de cada residuo, pero las mismas no son del todo rigurosas, ya que muchas veces se apoyan en la ausencia de un fragmento, el cual podría simplemente no haberse detectado ya que son señales débiles, salvo en condiciones experimentales particulares [35].



Es por esto que se han desarrollado métodos para determinar las posiciones de sustitución de los glicanos, que se basan en la derivatización de los grupos hidroxilo libres en el glicano nativo, seguida de escisión de los enlaces glicosídicos y una nueva derivatización, con otro agente, de los grupos hidroxilo previamente comprometidos en estos enlaces. Usualmente se eligen métodos que produzcan derivados volátiles, a fin de analizar la muestra por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas. La comparación con estándares y confirmación por el espectro de fragmentación simultáneamente permite identificar las posiciones sustituidas (diferencialmente derivatizadas) y la configuración relativa de los residuos, ya que esta última también influye sobre la presión de vapor del derivado y por consiguiente, en el tiempo de retención en cromatografía gaseosa [36].

Otra técnica ampliamente utilizada en la elucidación de carbohidratos es la espectroscopia de resonancia magnética nuclear. Los núcleos magnéticos que se utilizan son el protón ^1H y carbono ^{13}C , tanto en experimentos monodimensionales como bi- y multi-dimensionales, que pueden ser homo- o heteronucleares. Conociendo los grupos funcionales presentes en el glicano (hidroxilo, acetal, acetamido, metilo, etc) y los entornos químicos de cada núcleo magnético, es posible determinar todos los parámetros de un glicano, incluyendo las configuraciones relativas y particularmente las anomeridades de los residuos, lo cual la convierte en la herramienta espectroscópica más completa para el estudio de carbohidratos. Es importante mencionar que varias de las deducciones que surgen de este tipo de experimentos se apoyan en el hecho que los anillos de piranosa poseen una conformación preferencial (para configuraciones *gluco* y *galacto* corresponde al confórmero denominado “silla $^4\text{C}_1$ ”), en las que se minimizan las interacciones transdiaxiales. Ya que los equilibrios conformacionales se encuentran muy desplazados, se pueden asumir relaciones espaciales entre los protones del oligosacárido, despreciando las contribuciones de las otras conformaciones (en las sillas $^1\text{C}_4$, las posiciones axiales y ecuatoriales están invertidas respecto a las correspondientes sillas $^4\text{C}_1$, véase [Figura 6](#)). Una de las ventajas es que no implica derivatización de la muestra y no es un método destructivo, lo que permite utilizar la muestra para otros ensayos. En contrapartida, su sensibilidad es muy inferior a la de la espectrometría de masas y, ya que la mayoría de los grupos funcionales en un glicano típico son hidroxilos, los desplazamientos químicos suelen presentar considerable superposición [37].



Confórmers de β -D- glucopiranososa

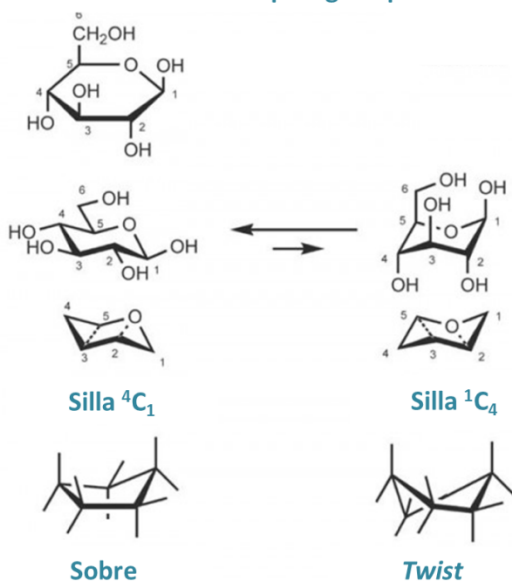


Figura 6. Equilibrio conformacional de β -D-glucopiranososa. En la parte superior se muestra la representación de Haworth, debajo los confórmers 4C_1 y 1C_4 . Nótese que los sustituyentes axiales son ecuatoriales en el otro confórmer y viceversa. La silla 1C_4 posee todos sus grupos voluminosos en posición axial, por lo que el equilibrio se encuentra francamente desplazado hacia la silla 4C_1 . Otros confórmers poco favorecidos son las formas sobre y twist.

Finalmente, ninguno de los métodos comentados permite determinar la configuración absoluta de los monosacáridos. Para esto es necesario conjugar cada residuo una sustancia enantioméricamente pura de configuración conocida (usualmente se forman glicósidos de alcohol isobutílico enantioméricamente puro, ya sea *R* o *S* [36]) y comparar contra la pareja diastereomérica de estándares de la sustancia enantioméricamente pura unida al residuo L- o D- .

Existen infinidad de otros métodos químicos para la elucidación de carbohidratos (degradación de Smith, hidrólisis parciales, acetólisis, etc) que han caído en desuso por ser más trabajosas, utilizar demasiada muestra o no ser tan informativas como los métodos descritos arriba. También se pueden utilizar tratamientos secuenciales con combinaciones de exoglicosidasas y/o endoglicosidasas, reconocimiento por lectinas específicas, o especificidad de las enzimas utilizadas para liberar los glicanos, por ejemplo el caso de la PNGasa F, que no es capaz de liberar *N*-glicanos α -fucosilados en la posición 3 del primer residuo de GlcNAc del *core* de quitobiossa. Estas aproximaciones experimentales son útiles para determinar la presencia de motivos particulares o confirmar la configuración, posiciones de sustitución y anomericidad de residuos concretos en un glicano, pero son menos versátiles, algunos de ellos son destructivos (glicosidasas), y generalmente consumen mayor cantidad de muestra.



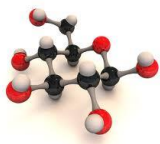
1.5 Principales clases de glicanos en animales

El universo de carbohidratos en la naturaleza es extremadamente diverso, abarcando estructuras independientes y sub-estructuras en el contexto de glicoconjugados. En esta Tesis se utilizará el término *glicano* para englobar todos aquellos polímeros de carbohidratos, especialmente oligosacáridos. En esta sección se describirán muy brevemente algunas de las clases de glicanos relevantes en esta Tesis.

1.5.1 Glicanos conjugados a proteínas

En organismos eucariotas se encuentran tres grandes grupos de glicanos unidos covalentemente a proteínas, los *N*-glicanos, los *O*-glicanos y los glicosaminoglicanos (GAGs, esta denominación abarca también al hialuronano, que es una molécula libre).

Los *N*-glicanos son carbohidratos unidos a proteínas generalmente por un enlace *N*-glicosídico entre un residuo de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y un residuo de asparagina. Existe una secuencia peptídica consenso para la *N*-glicosilación, dada por Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser, en principio, cualquier aminoácido. Todos los *N*-glicanos poseen un *core* compartido conteniendo $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, esquematizado en la [Figura 7](#). La decoración subsiguiente de este *core* da lugar a tres tipos de *N*-glicanos: (i) de alta manosa u oligomanosa, en los cuales solo existen residuos de manosa unidos al *core*, (ii) complejos, en los que las “antenas” comienzan por un residuo de GlcNAc, e (iii) híbridos, en los que la rama de $\text{Man}(\alpha 1-6)$ del *core* está decorada exclusivamente con residuos de manosa, mientras que la rama de $\text{Man}(\alpha 1-3)$ puede portar una o dos antenas de tipo complejo ([Figura 7](#)). Este tipo de glicanos se encuentra muy distribuido en glicoproteínas eucariotas, y cumple funciones muy variadas, incluyendo contribuir a la estructura espacial de la glicoproteína, disminuir su susceptibilidad a proteasas, y modular la interacción con otras proteínas [30]. La biosíntesis de *N*-glicanos comienza en la cara citoplasmática del retículo endoplasmático con la adición de un residuo de GlcNAc a un precursor lipídico, el dolicol fosfato (Dol-P), dando lugar a dolicol pirofosfato GlcNAc (GlcNAc-PP-Dol). Este precursor es luego elongado secuencialmente hasta $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$, el cual es luego translocado a través de la membrana del retículo endoplasmático para quedar orientado hacia el lumen del mismo, donde su biosíntesis continúa hasta la formación de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$. Este precursor es transferido al residuo de asparagina del polipéptido naciente, y es luego procesado desde el retículo endoplasmático hasta el



aparato de Golgi, por remoción y agregado de residuos monosacáridicos, hasta generar el glicano definitivo.

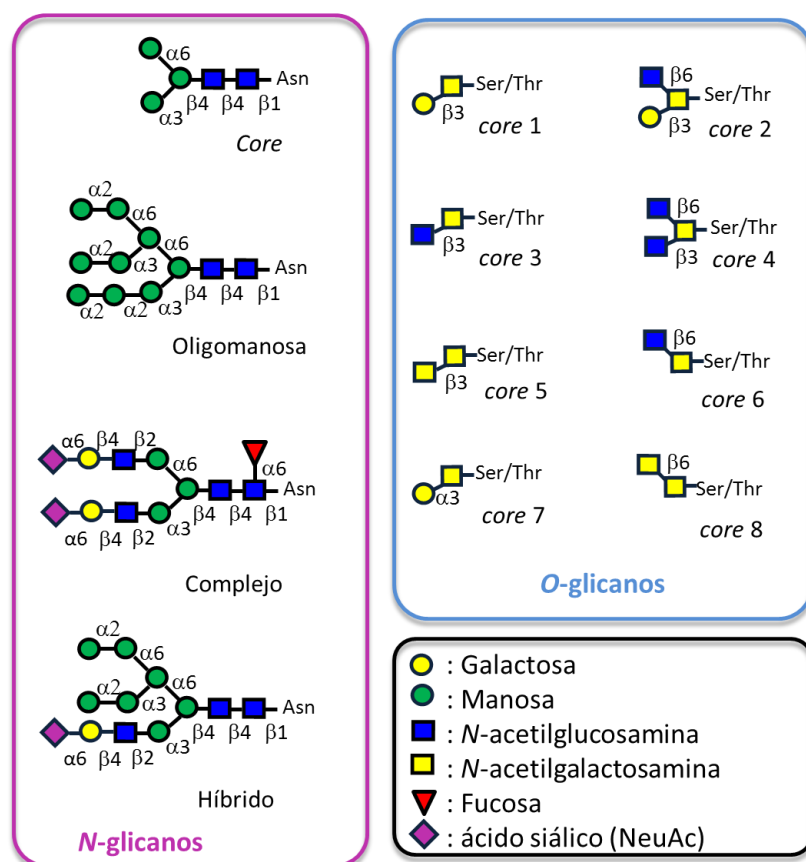
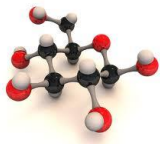


Figura 7: Estructura general de N- y O-glicanos. En el recuadro fucsia presenta la estructura del *core* de N-glicanos, así como ejemplos de los tres principales tipos de N-glicanos: oligomanosa (o alta manosa), complejo e híbrido. En el recuadro celeste se indican los 8 *cores* de O-glicanos mucínicos conocidos. Se utilizó la nomenclatura del CFG (*Consortium for Functional Glycomics*), presentada en el recuadro negro. [29]

Otro gran grupo lo constituyen los glicanos O-GalNAc o glicanos de tipo mucínico. Estos glicanos se unen al esqueleto peptídico mediante un enlace O-glicosídico α entre el residuo de GalNAc y un residuo de serina o treonina, y pueden encontrarse en glicoproteínas poco glicosiladas o muy altamente glicosiladas; estas últimas se denominan mucinas. A diferencia de los N-glicanos, no existe una secuencia consenso perfectamente definida para los sitios aceptores de O-glicosilación, aunque en las mucinas suelen existir regiones de repetidos en tándem de número variable (VNTRs) ricas en sitios aceptores de serina y treonina. Los glicanos mucínicos se basan en estructuras prototípicas o *cores*; se han identificado 8 de estas estructuras, de los cuales los *cores* 1 a 4 son los más comunes (Figura 7). Muchas mucinas se encuentran revistiendo epitelios, por su capacidad de hidratarse extensamente y protegerlos. Los O-glicanos mucínicos, a diferencia de los N-glicanos, se sintetizan directamente sobre el polipéptido aceptor, por la acción secuencial de glicosiltransferasas distribuidas a lo largo del aparato de Golgi. El primer paso de esta síntesis es realizado por UDP-GalNAc polipéptido-N-acetilgalactosaminiltransferasas (pp-GalN-Ts). Luego



actúan enzimas específicas de la síntesis de los *cores*. Las decoraciones ulteriores se deben en parte a glicosiltransferasas específicas de *O*-glicanos y en parte a glicosiltransferasas que participan en la biosíntesis de otras clases de glicanos. Existen otros tipos de *O*-glicosilación con funciones muy distintas a las de los glicanos *O*-GalNAc; particularmente cabe destacar la glicosilación en compartimientos nuclear o citoplasmático del tipo *O*-GlcNAc, que desempeña funciones similares a la fosforilación de proteínas, y que escapan al foco de esta Tesis.

Finalmente existe otro tipo de carbohidrato, de tipo polisacárido, unido a proteínas conocido como glicosaminoglicanos (GAGs). Los GAGs forman parte de proteoglicanos y están constituidos por unidades repetitivas conteniendo residuos de Gal, GalNAc, GlcNAc y/o ácidos urónicos, muchos de los cuales presentan sulfatación. La unión de los GAGs a la proteína usualmente es a través de un residuo de β -xilosa unida a residuos de serina, aunque hay ejemplos de uniones a través del *core* de *N*-glicanos (queratán sulfato I) o de *cores* mucínicos (queratán sulfato II).

1.5.2 Glicanos conjugados a lípidos

Los glicolípidos se encuentran en la monocapa externa de las membranas plasmáticas de las células, donde pueden mediar interacciones célula-célula, y se estima que componen más de un 80% de los glicoconjugados del organismo. El primer glicolípidos caracterizado fue la galactosilceramida, que consiste en un único residuo de galactosa unido por enlace β al hidroxilo en C1 de ceramida (la cual está compuesta por un aminoalcohol de larga cadena hidrocarbonada, la esfingosina, formando una amida con un ácido graso), y es una de las moléculas más abundantes en el cerebro (**Figura 8A**). Los glicolípidos que tienen ceramida por porción lipídica se conocen como glicoesfingolípidos. Otra clase de glicolípidos, menos abundante, la componen glicanos unidos al hidroxilo en C3 de diacilglicerol (**Figura 8A**), llamados glicoglicerolípidos.

A pesar que las variaciones en el grupo ceramida aportan diversidad a los glicoesfingolípidos, la principal clasificación estructural y funcional se basa tradicionalmente en la porción glucídica. Las estructuras de los *cores* neutros más representativos en mamíferos se muestran en la **Figura 8B**.

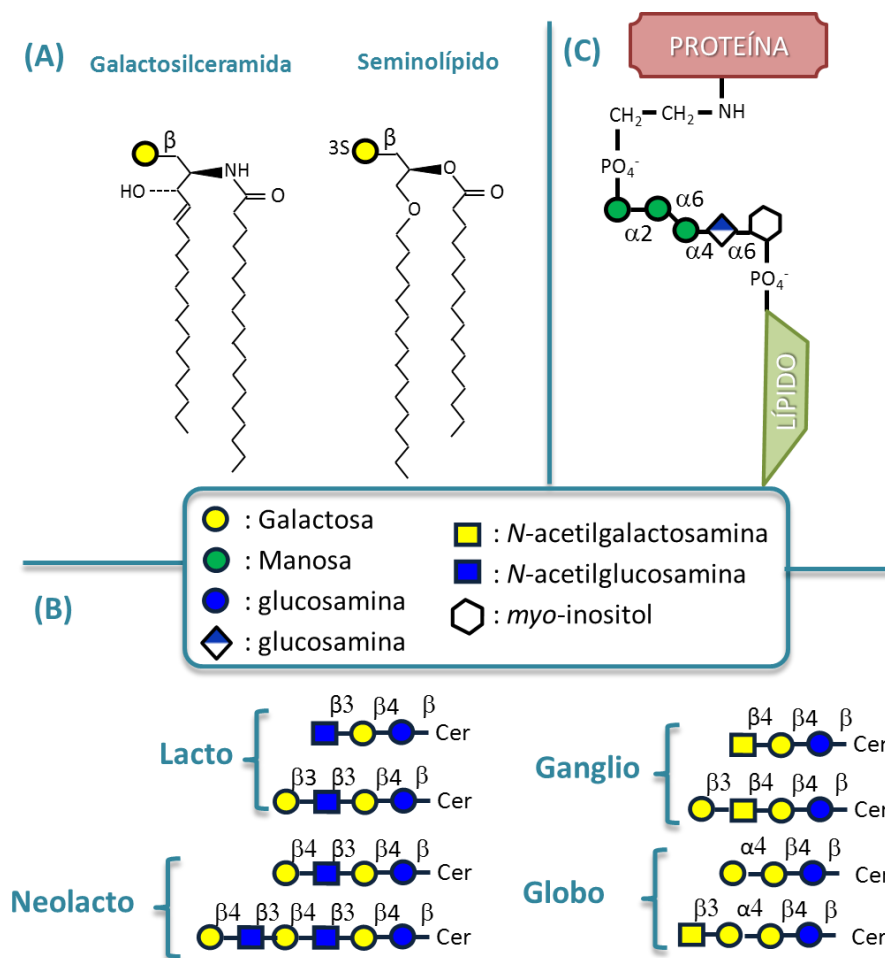
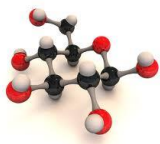
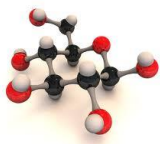


Figura 8: Estructura de glicanos conjugados a lípidos. (A) Ejemplos de estructuras de glicolípidos. Se muestra la estructura de la galactosilceramida como ejemplo de glicoesfingolípido y el seminolípido como ejemplo de glicoglicerolípido. (B) Estructuras de los principales *cores* de glicoesfingolípidos. (C) Estructura general de anclas GPI. Se utilizó la nomenclatura del CFG (*Consortium for Functional Glycomics*), presentada en el recuadro central [29].

Estos *cores* pueden extenderse dando sub-familias de glicoesfingolípidos (**Figura 8B**), cuya expresión es específica de tejido.

Otro gran grupo de glicolípidos corresponde a las anclas de glicofosfatidilinositol (GPI). Estos glicanos se unen al extremo C-terminal de proteínas, sirviendo de anclas a la membrana plasmática de modo que la proteína queda orientada hacia el medio extracelular. Las anclas GPI poseen una estructura general compartida, que incluye un residuo de fosfoetanolamina que hace de puente entre la proteína y la porción glucídica del ancla GPI (**Figura 8C**). Esta porción glucídica está compuesta por $\text{Man}(\alpha 1-2)\text{Man}(\alpha 1-6)\text{Man}(\alpha 1-4)\text{GlcN}(\beta)$, unida al hidroxilo en posición 6 de un residuo de *myo*-inositol. Este a su vez está unido mediante un grupo fosfato en posición 1 al lípido, el cual usualmente es un diacil- o acilalquil- glicerol [38]. Las anclas GPI pueden presentar gran diversidad estructural, incluyendo esterificación del hidroxilo en C2 del residuo de *myo*-inositol con



un ácido graso, y decoraciones adicionales de la porción glucídica con oligosacáridos o fosfoetanolamina sobre el primer residuo de manosa.

1.6 Glicobiología de cestodos ciclofilídeos

Para poner en contexto los hallazgos estructurales de carbohidratos de la CL, es preciso revisar brevemente algunas de las estructuras glucídicas relevantes de los *fila* relacionados y del propio *E. granulosus*. Dentro de la Glicobiología de parásitos helmintos, *Schistosoma mansoni* es sin lugar a dudas la especie que más atención ha recibido, ya que sus glicoconjugados se han relacionado a fenómenos de mimetismo molecular y evasión o polarización de la respuesta inmune, como se comentará más adelante en la [sección 5.3](#). Sin embargo, la clase Cestoda no ha recibido tanto interés por parte de los investigadores, a pesar de que algunos de sus miembros, como *E. granulosus* sean notables ejemplos de parásitos que exponen en forma masiva estructuras glucídicas al hospedero sin por eso ser controlados efectivamente por el sistema inmune. Los *N*-glicanos y glicolípidos probablemente sean los carbohidratos mejor caracterizados en cestodos, probablemente por su facilidad de obtención/liberación.

1.6.1 *N*-glicanos

Las primeras estructuras elucidadas parcialmente de la pared de la hidátide de *E. granulosus* fueron *N*-glicanos (EG1 a EG3 en la [Figura 9](#)) [39]. Los mismos se liberaron de muestras de pared de la hidátide mediante PNGasa F y se estudiaron por electroforesis de carbohidratos asistida por fluoróforo (FACE) sobre glicanos enteros para determinar aproximadamente el número de residuos y luego sobre sus hidrolizados para identificar sus monosacáridos constituyentes. La secuencia de estos glicanos se obtuvo mediante *fast atom bombardment* (FAB) MS, y algunas posiciones de sustitución y anomeridades se dedujeron por tratamientos con α y β galactosidasas (exoglicosidasas) y tomando en cuenta la especificidad de PNGasa F como se anteriormente. Se halló una colección de *N*-glicanos relacionados, todos fucosilados en el *core* a excepción del más pequeño, y ninguno de ellos del tipo de alta manosa. Es interesante destacar que en los extremos reductores se hallaron dos motivos, Gal β GlcNAc y Gal α Gal β GlcNAc (ambos en EG3, [Figura 9](#)), que podrían corresponder respectivamente al motivo *N*-acetilactosamina (Gal(β 1-4)GlcNAc) y al motivo P1 (Gal(α 1-4)Gal(β 1-4)GlcNAc, un antígeno del grupo sanguíneo P, presente en glicolípidos de eritrocitos en algunos seres humanos, aunque sin conocer las posiciones de sustitución no es

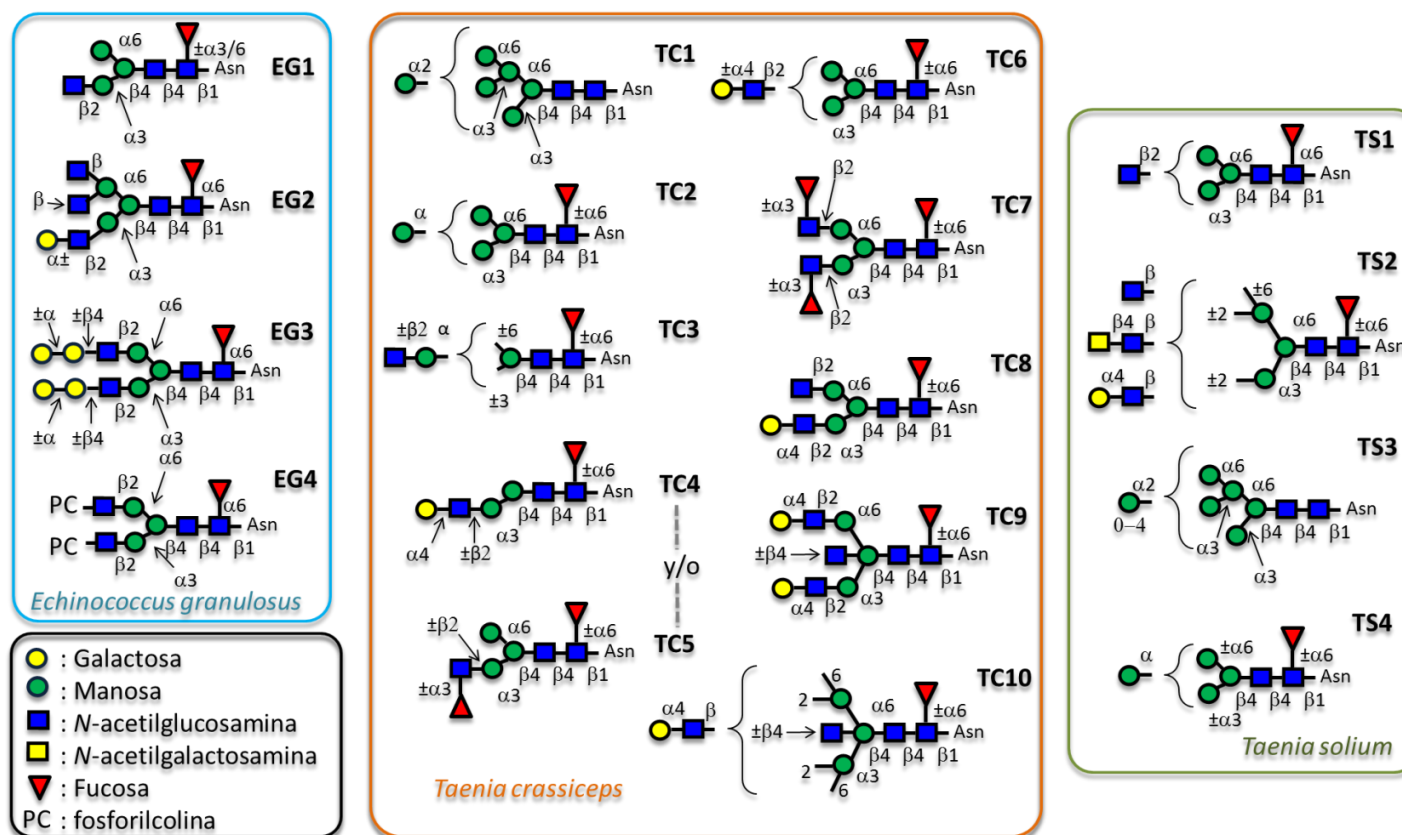
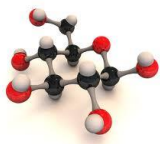


Figura 9. Resumen estructural de N-glicanos de *E. granulosus*, *T. crassiceps* y *T. solium*. Las estructuras presentadas son un resumen de los N-glicanos de estos tres cestodos; en algunos casos representan más de una posibilidad estructural, en términos de decoraciones terminales, indicadas como llaves (la decoración puede estar presente en alguna de las diferentes posiciones abarcadas por la llave) o indicadas como $\pm$ (la decoración puede estar presente o ausente). Estos cestodos presentan similitudes en cuanto a la posibilidad de fucosilación del *core*, residuos terminales de β -GlcNAc (EG1, EG2, TC3, TC5-TC8, TS1 y TS2; excluyendo residuos de GlcNAc bisectantes) o α -Gal (EG2, EG3, TC4, TC6, TC8, TC9 y TS2). Como características salientes, *E. granulosus* presenta un glicano, obtenido de un antígeno de líquido hidático, (EG4) con decoración con fosforilcolina en los extremos no reductores [40], y glicanos de la CL (representados en conjunto como EG3) con posibles motivos P1 (Galp(α 1-4)Galp(β 1-4)GlcNAcp) [39]. En *T. crassiceps* se destaca la posibilidad de fucosilación periférica de las antenas (TC5 y TC7) y la presencia de *cores* truncados (TC3) [41]. Finalmente en *T. solium* se observa la existencia del motivo terminal LacDiNAc (GalNAcp(β 1-4)GlcNAcp, TS2) [42]. No se presentan los glicanos hallados conteniendo ácido siálico, los cuales fueron considerados provenientes del hospedero por los autores de estos trabajos. Se utilizó la nomenclatura del CFG (*Consortium for Functional Glycomics*), presentada en el recuadro negro [29].

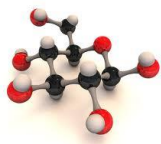


posible asegurarlo. Este segundo motivo, en trabajos previos, había sido inmunolocalizado en la CL así como en el líquido hidático y el tegumento de protoescolices [28, 43-46].

Más recientemente, se caracterizó un glicano presente en el antígeno 5, un antígeno soluble del líquido hidático, de aplicación en inmunodiagnóstico de equinocosis (EG4 en la [Figura 9](#)) [40]. Este glicano, también fucosilado en el *core*, presenta la particularidad de estar decorado en sus extremos no reductores con fosforilcolina, siendo este el primer glicano de este tipo reportado en cestodos. La decoración con fosforilcolina ya ha sido descrita en varios nematodos y reviste interés por estar asociada al sesgo de las respuestas inmunes hacia Th2 y efectos antiinflamatorios [47-49].

Por otro lado, se han descrito *N*-glicanos del género *Taenia* que presentan algunas similitudes con los *N*-glicanos de *E. granulosus*. Tanto en *T. crassiceps* como en *T. solium* se encontraron estructuras con presencia (o ausencia) de fucosilación del *core* y con extremos no reductores de β -GlcNAc o α -Gal ([Figura 9](#)). Estos extremos no reductores de galactosa, están en configuración α , y por lo tanto no forman parte de motivos *N*-acetilactosamina terminales (Gal(β 1-4)GlcNAc), como parecería ser el caso en *E. granulosus* [39]. En ambas especies de *Taenia* se encontraron ejemplos de *N*-glicanos de alta manosa (TC1), aparentemente ausentes en *E. granulosus*; en *T. crassiceps* se destacan los glicanos truncados (TC3) y fucosilación periférica (TC5 y TC7). En un trabajo reciente sobre glicanos del gusano adulto de *E. multilocularis* también se ha descrito al menos un glicano que podría contener residuos de fucosa periférica, si bien solo se dispone de datos de secuencia [50]. Para *T. solium* se halló el motivo LacDiNAc (GalNAc(β 1-4)GlcNAc) en glicanos de tipo complejo minoritarios (TS2).

Para ninguno de estos cestodos se encontró el motivo Lewis^x (Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc(β 1-) o el motivo pseudo Lewis^y (Fuc(α 1-3)Gal(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc(β 1-), determinantes antigénicos relacionados a grupos sanguíneos que han sido descritos en todos los estadios de *Schistosoma mansoni* (en *N*-glicanos y glicolípidos) y que parecen estar vinculados a modulación de la respuesta inmune del hospedero [51-53]. Por lo tanto, la evasión/modulación del sistema inmune en cestodos podría involucrar la participación de determinantes antigénicos glucídicos esencialmente distintos al de los congéneres trematodos.



1.6.2 Glicolípidos

El segundo grupo de glicanos que se ha estudiado corresponde a los glicolípidos neutros provenientes de metacestodos de *E. multilocularis* [54, 55], *Taenia crassiceps* [56], y *Taenia solium* [57], así como de adultos de *Metroliaesthes coturnix* [58]. Estos organismos expresan casi exclusivamente carbohidratos de la serie neogala (Gal(β 1-6)Gal(β 1)), elongados con unidades de Gal(β 1-6) y conjugados a ceramida (glicolípidos 5 a 7, **Figura 10**). Al igual que en *N*-glicanos de cestodos, se encuentran ejemplos de α -Gal terminal (glicolípidos 3 y 4 subrayados en violeta, **Figura 10**), en un contexto que se asemeja más al de *N*-glicanos de *E. granulosus*, que a los *N*-glicanos conocidos de *Taenia* (véanse EG2, EG3, TC4, TC6, TC8, TC9 y TS2 en la **Figura 9**). En el caso de *E. multilocularis*, existe además decoración por α -fucosilación en posición 3 del segundo residuo de galactosa el *core* de neogala (glicanos 8 y 9, **Figura 10**). Se ha encontrado que uno de estos glicanos fucosilados, el glicano 9, presenta potencial en inmunodiagnóstico para diferenciar casos de equinocosis alveolar de equinocosis quística [59].

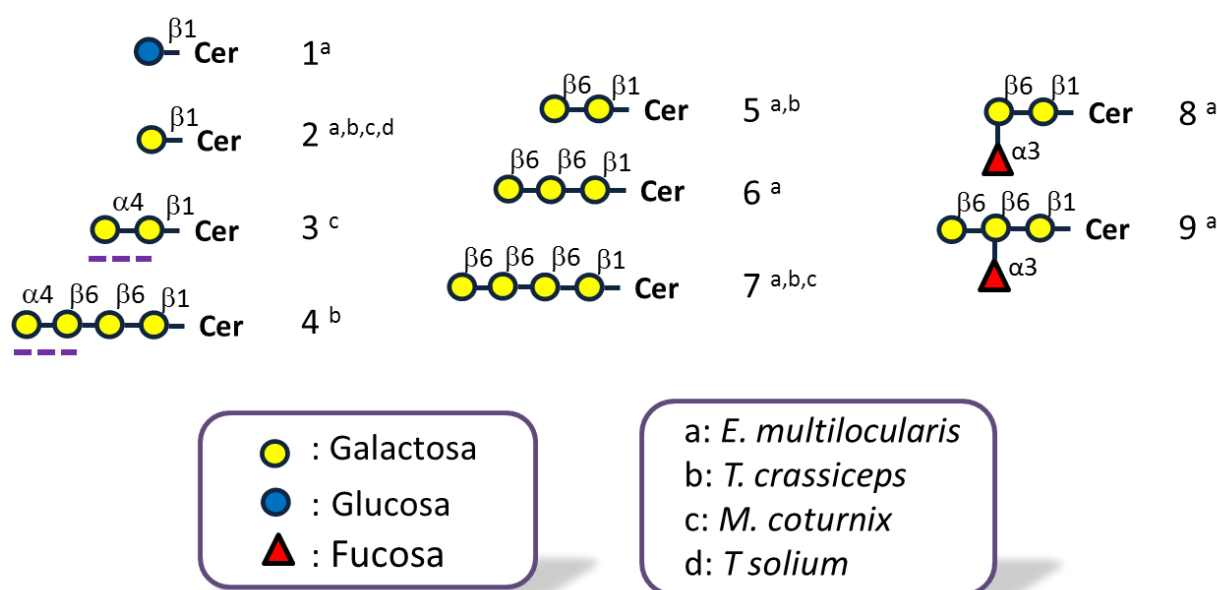
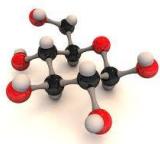


Figura 10: Glicosfingolípidos de cestodos ciclofilídeos. Se indican con superíndices las especies en las que se describió cada glicano, utilizando el código de letras indicado en el recuadro inferior. También se subraya en línea violeta punteada el motivo Gal(α 1-4)Gal(1-), que también se encuentra en *O*-glicanos de la capa laminar elucidados antes de esta Tesis, ya sea en el extremo no reductor del esqueleto principal (*cap*) o en decoraciones del residuo de GlcNAc del *core* (ver **sección 1.7** a continuación). Se utilizó la nomenclatura del CFG (*Consortium for Functional Glycomics*), presentada en el recuadro inferior izquierdo [29].



Los glicolípidos de *E. granulosus* no se han elucidado formalmente, pero sí se han estudiado sus características de serorreactividad cruzada con otras helmintiasis (por *F. hepatica*, *T. crassiceps*, *T. solium*, *S. mansoni*, *S. haematobium* y *E. multilocularis*) y su reactividad con sueros anti-P1 [45]. Los autores de este último estudio concluyeron que los glicolípidos (de protoescólices y capa germinativa) corresponden también a la serie neogala, con decoraciones con unidades de Gal(β 1-6), y que presentan también el determinante antigénico P1 (lo que es consistente con la inmunolocalización de este motivo al tegumento de protoescólices [44]). Adicionalmente, se podría inferir que estos glicolípidos probablemente no presentan fucosilación, como se desprende del párrafo anterior.

1.6.3 O-glicanos

Comparado con los grupos anteriores de carbohidratos, los O-glicanos han sido menos estudiados en cestodos. Los primeros reportes de O-glicanos en cestodos se realizaron en base a reactividad con lectinas vegetales, para discriminar los posibles monosacáridos constituyentes.

Un trabajo pionero realizado sobre el recubrimiento de los huevos de *Hymenolepis microstoma* es consistente con una composición de O-glicanos [60]. En este trabajo se determinó que los monosacáridos constituyentes de la cubierta de los huevos y los glóbulos de vitelocitos (estructuras que dan origen a esta cubierta) eran galactosa, N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina, en tanto que fucosa, manosa y glucosa no eran detectables por las lectinas utilizadas. Particularmente, se demostró la presencia de unidades de lactosamina (Gal(β 1-4)GlcNAc) mediante el marcado con la lectina de *Erythrina cristagalli*, específica de este motivo. Curiosamente, solo los glóbulos de los vitelocitos mostraron una unión marginal por la lectina PNA, lo que sugiere la presencia del antígeno T (core mucínico 1 Gal(β 1-3)GalNAc desnudo) en estadios tempranos de la síntesis de la cubierta del huevo. La ausencia de tinción por un colorante catiónico se consideró indicativa de que estos glicanos no correspondían a GAGs, en tanto que la poca tinción por ácido periódico, indicativa de escasez de dioles vecinales, podría ser atribuible a predominancia de enlaces glicosídicos 1-3 entre residuos piranósicos.

En el caso de *E. granulosus*, las primeras evidencias de O-glicanos de tipo O-GalNAc también se basaron en la reactividad con lectinas vegetales, particularmente la presencia del antígeno Tn (GalNAc α 1-Ser/Thr) en protoescólices y en gusanos adultos y sus productos de excreción-secreción



[61]. A partir de protoescólices se purificó una fracción de glicoproteínas con reactividad para lectinas que reconocen al antígeno T (Gal(β1-3)GalNAc α1-Ser/Thr) o *core* 1 desnudo.

Un punto clave para confirmar la existencia de *O*-glicanos convencionales en cestodos era demostrar la existencia y actividad de algún miembro de la familia de enzimas que realiza el primer paso de la síntesis de los *O*-glicanos, conocidas como UDP-GalNAc:polipéptido-N-acetilgalactosaminiltransferasas (pp-GalNAcTs). Se demostró la actividad de esta enzima en extractos de helmintos de taxones diversos, particularmente cestodos (*E. granulosus*, *Mesocestoides corti* y *Taenia hydatigena*) [62]. También se identificó el antígeno Tn, producto directo de la actividad de estas enzimas, en estos parásitos mediante un anticuerpo monoclonal, 83D4, que reconoce *clusters* de al menos dos antígenos Tn sobre aminoácidos consecutivos [63]. Poco después, se clonó y caracterizó una pp-GalNAc-T de la capa germinativa de *E. granulosus*, que se denominó Eg-pp-GalNAc-T1; esta enzima posee un dominio de lectina inusual, considerablemente más largo que el de otros miembros de la familia, y un fragmento con similitud a un dominio especializado en la unión de fosfatos orgánicos [64].

En lo que hace a la CL de *E. multilocularis*, fue la reactividad con lectinas vegetales específicas lo que sugirió por primera vez que la CL de *E. multilocularis* estaba compuesta por *O*-glicanos de en lugar de *N*-glicanos [65], lo que se confirmó posteriormente por métodos químicos y espectroscópicos por Hülsmeyer *et. al* [66]. En ese último trabajo se purificó, por afinidad con un anticuerpo con reactividad por carbohidratos de la CL de *E. multilocularis* (anticuerpo monoclonal G11), un antígeno caracterizado como mucina (denominado Em2G11), por su alto contenido de treonina y por el perfil de glicanos que presentaba, constitutivo de la CL de *E. multilocularis*. Los glicanos se liberaron por β-eliminación reductiva y se analizaron por espectrometría de masas en forma conjunta, sin aislarse glicanos individuales ni elucidarse las anomeridades de los residuos. El panorama estructural hallado consistió en dominancia de los *cores* 1 y 2 sin decorar (glicanos (2) y (4) respectivamente en la [Figura 11](#)), habiendo además glicanos relacionados de mayor número de residuos, presentando decoraciones que incluyen la adición de un residuo de Gal(1-4) sobre la Gal de los *cores* (glicanos (3) y (5)), y la introducción de Gal(1-4) o Gal(1-4)Gal(1-4) sobre el residuo de GlcNAc del *core* 2 (glicanos (6) y (7)). También se encontró GalNAc sin decorar correspondiente al antígeno Tn (glicano (1)).

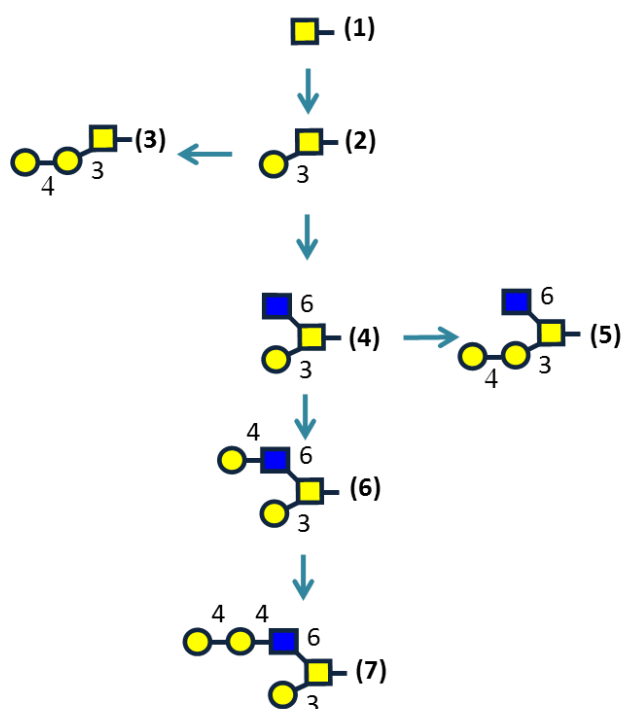
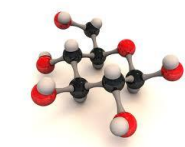
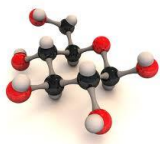


Figura 11: Glicanos liberados de la mucina Em2G11 de *E. multilocularis*. Se indican los glicanos de la mucina Em2G11 obtenida a partir de metacestodos de *E. multilocularis*, y el orden biosintético propuesto por los autores [66]. Se utilizó la nomenclatura del CFG (*Consortium for Functional Glycomics*) [29].

Basándose en estos resultados, Koizumi *et al* sintetizaron un panel de 6 oligosacáridos con un grupo trimetilsililetilo (TMSEt) como aglicona [67, 68]. En un principio, dado que el trabajo de Hülsmeyer no incluía las anomeridades de los residuos, se sintetizaron compuestos con extremos de Galp(β1-4) sobre el residuo de Gal del *core*, y con el motivo Galp(β1-4)Galp(β1-4)GlcNAcp(β1-6); estos motivos no serían los esperados asumiendo que las anomeridades en glicanos de *E. multilocularis* son análogas a las halladas en *E. granulosus*. (véase la [sección 1.7](#), a continuación). Posteriormente, a raíz de información brindada por nuestro grupo, el grupo mencionado sintetizó los glicanos con extremos de Galp(α1-4) sobre el residuo de Gal del *core*, y el motivo Galp(α1-4)Galp(β1-4)GlcNAcp(β1-6), como α-glicósidos como portando una aglicona formada por una molécula de biotina y un brazo espaciador [15]. Estos reactivos fueron utilizados en la presente Tesis.

Todos los ejemplos anteriores se enfocaron en *O*-glicanos del tipo mucínico, es decir, con extremos reductores GalNAc α1-Ser/Thr, sin embargo un trabajo reciente sobre el gusano adulto de *E. multilocularis* reveló la presencia de *O*-glicanos inusuales, con uniones Gal-Ser/Thr [50]. Estos glicanos estaban decorados con 1 a 4 residuos de βHexNAc, (sensibles a degradación por la β-*N*-acetilgalactosaminidasa de *Jack Bean*), que posiblemente corresponden a GlcNAc, dada la alta



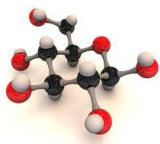
abundancia de este residuo en el análisis composicional de los glicanos. La expresión del antígeno que contiene estos glicanos, caracterizada por tinción por inmunofluorescencia con el anticuerpo monoclonal EmA9, parecería estar regulada en el desarrollo de los estadios larvarios, ya que se detectó en toda la superficie de los gusanos adultos, pero solo en las cabezas de protoescolices estimulados con pancreatina.

Las funciones biológicas de los *O*-glicanos en cestodos siguen siendo elusivas, si bien a nivel de hipótesis se han postulado diversos papeles en la interacción parásito hospedero incluyendo reconocimiento por el hospedero, adhesión a tejidos del hospedero, protección de estructuras tegumentarias vitales y evasión inmunológica, según la fase del ciclo de vida en la que se expresan [69].

1.7 Glicanos mucínicos de la capa laminar de *Echinococcus granulosus*

Los trabajos comentados en la sección anterior tomados en conjunto con antecedente históricos (sección 1.3), aportaron algunos indicios, que si bien eran inconexos y heterogéneos en cuanto a sus aproximaciones experimentales, apuntaban a que la CL de *E. granulosus* podría de hecho estar compuesta por mucinas.

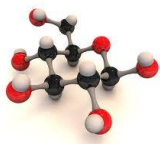
Dada la dificultad que plantea realizar estudios de tipo proteómico sobre proteínas tan densamente glicosiladas, el trabajo de nuestro grupo se ha centrado en los glicanos, los cuales representan al menos un tercio de la masa seca total de la CL, y son en principio los primeros candidatos a ser reconocidos por receptores del sistema inmune innato y consecuentemente contribuir al control de la respuesta inmunitaria antes mencionado. En el trabajo que constituye el antecedente directo de la presente Tesis [70], se liberaron los *O*-glicanos de la CL cruda por β -eliminación reductiva, y se purificaron por gel filtración seguida por HPLC sobre columna de carbono poroso grafitizado [71]. Se enfocó en esa etapa sobre los glicanos de menor tamaño molecular y más abundantes. Se identificaron así algunos de los glicanos mayoritarios de la CL, demostrándose que efectivamente corresponden a *O*-glicanos mucínicos, basados en los *cores* 1 y 2 convencionales de los *O*-glicanos animales (ver la Figura 7). Si bien la estrategia de β -eliminación reductiva implica que en la práctica los residuos de GalNAc reductores terminales se recuperan en forma alditol, se acepta, dados los muy extensos antecedentes biológicos [29], que se trata efectivamente de residuos de GalNAc α 1-Ser/Thr, es decir de los puntos de inserción en los esqueletos peptídicos.



Las estructuras más abundantes encontradas corresponden entonces a los *cores* 1 y 2 desnudos, así como glicanos cortos generados por decoración de estos *cores* con Galp(β 1-3). Los glicanos de tamaño creciente son progresivamente menos abundantes, y sus estructuras se basan en combinaciones de motivos de un repertorio estructural acotado que incluye: lo que denominamos un “esqueleto principal” de unidades repetidas de Galp(β 1-3), incluyendo al residuo de Galp(β 1-3) del *core* 1 o 2 al que está unidas; la adición de un extremo Galp(α 1-4) (actuando como “*cap*”) al esqueleto principal mencionado; la decoración del residuo de GlcNAc del *core* 2 con el disacárido Galp(α 1-4)Galp(β 1-4); la introducción de ramificaciones HexNAc sobre el esqueleto principal, y decoración de las mismas con un disacárido Hex-Hex ([70] y Alvaro Díaz, resultados no publicados). Cabe acotar que el trisacárido formado por la decoración del residuo de GlcNAc del *core* 2 por Galp(α 1-4)Galp(β 1-4) genera el motivo P1 (Galp(α 1-4)Galp(β 1-4)GlcNAc) [70]. Esto es consistente con los reportes de reactividad en materiales de la CL con anticuerpos anti-P1 [28]. Las ramificaciones de HexNAc sobre el esqueleto principal de Galp(β 1-3)_n, tanto decoradas con el disacárido Hex-Hex como no decoradas, solo fueron estudiadas por espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF (MS²), método por el cual solo es posible deducir la secuencia del oligosacárido, pero no así la configuración de sus residuos, sus posiciones de sustitución, ni la anomeridad de sus enlaces glicosídicos.

Al contrastar estos resultados con los glicanos de la mucina purificada de la CL de *E. multilocularis*, descritos en la [sección 1.6.3](#) (los cuales no necesariamente representan la totalidad del glicoma de la CL), surgen 4 diferencias significativas: (i) el enmascaramiento de algunos motivos expuestos en *E. multilocularis* (GalNAc sin decorar o antígeno Tn; Gal(1-4)GlcNAc, potencialmente una unidad terminal de *N*-acetil lactosamina, Gal(β 1-4)GlcNAc, representados como los glicanos 1 y 6 en la [Figura 11](#)), (ii) la ausencia de decoración con Gal(1-4) directamente sobre el residuo de Gal de los *cores*, (iii) la existencia de glicanos mayores a 5 residuos (aparentemente ausentes en la mucina de *E. multilocularis*), e (iv) la presencia de ramificaciones sobre el esqueleto principal de Galp(β 1-3)_n (no reportadas en la mucina de *E. multilocularis*).

En la [Figura 12](#) se muestra un resumen de la diversidad estructural de glicanos de CL de *E. granulosus* basado en los datos previos a esta Tesis, es decir basado en estructuras totalmente elucidadas de glicanos de hasta 6 residuos monosacáridicos y en datos de secuencia obtenidos por MS² de glicanos mayores. Es importante aclarar que el trabajo citado se realizó exclusivamente sobre hidátides provenientes de hospedero bovino. Como se comentó en la [sección 1.2](#) la cepa G1,



la más prevalente mundialmente así como en nuestro país, adaptada al hospedero ovino, no es capaz de controlar la respuesta inflamatoria en el hospedero bovino [6, 11]. Existe entonces la posibilidad de que el repertorio estructural de carbohidratos observado esté influenciado por el entorno inflamatorio, potencialmente por impedimento de la capacidad biosintética del parásito o por modificaciones extracelulares que podrían sufrir los glicanos en tal contexto.

1.8 Posibles esqueletos peptídicos de las mucinas de la CL

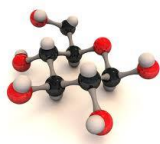
Habiendo determinado la estructura de los *O*-glicanos mucínicos principales de la CL, quedaría pendiente la ardua tarea de elucidar la identidad de la(s) apomucina(s). No obstante, el material de la CL es difícil de solubilizar [72] y como se comentará en la **sección 3.1** en Materiales y Métodos, la liberación de los *O*-glicanos no es lo suficientemente efectiva para remover todos los glicanos, debido al altísimo grado de glicosilación que poseen estas glicoproteínas. Tampoco es posible remover los *O*-glicanos por β -eliminación sin provocar ruptura sustancial de los esqueletos peptídicos. Al no poder generar esqueletos peptídicos lo suficientemente desnudos solubles, estos no son pasibles de separar por métodos bioquímicos convencionales (separaciones cromatográficas, electroforesis en geles de poliacrilamida), ni de secuenciar por degradación de Edman o analizar por herramientas proteómicas de espectrometría de masas (digestión trípica seguida del análisis espectrométrico y comparación contra bases de datos conteniendo secuencias proteicas de apomucinas traducidas *in silico*).

En cambio, los datos que poseemos sobre las apomucinas de la CL son indirectos, como la composición de aminoácidos o datos transcriptómicos. El transcriptoma de la capa germinativa (<http://www.compsysbio.org/partigene>) contiene numerosas secuencias de apomucinas, algunas de las cuales se encuentran en la capa germinativa pero no en otros tejidos que no participan en la biosíntesis de la CL (por ejemplo protoescólices) y por tanto son buenas candidatas a ser apomucinas estructurales de la CL. Estas comprenden a los *clusters* EGC0000317, EGC0004254, EGC0002904 y EGC0005092, que son las más expresadas por la capa germinativa (**Figura 13**) [73]. Como se aprecia en la figura, la mayor parte estas secuencias está formada por residuos de treonina que podrían estar glicosilados. Esto deja solo unos tramos relativamente cortos en los extremos *N*-terminales no glicosilados, que podrían participar en asociaciones entre mucinas (por enlaces disulfuro por ejemplo, para EGC04254 y EGC02904), responsables, al menos en parte, de la cohesividad de la CL [72].

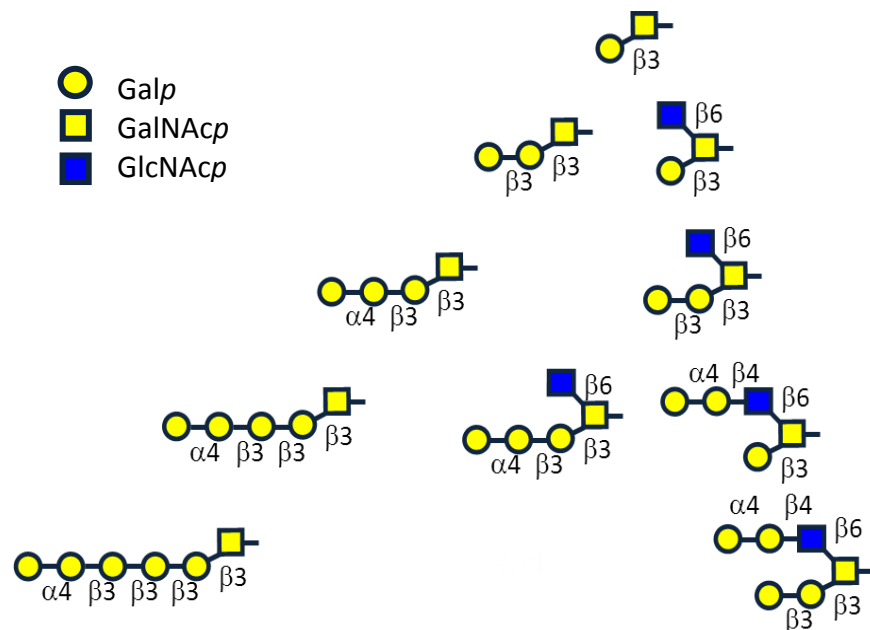


Si se pudiera confirmar que algunas de estas secuencias corresponden a apomucinas estructurales de la CL, surgirían nuevas interrogantes sobre la organización de los *O*-glicanos sobre los esqueletos peptídicos, tales como cuál es la ocupación de sitios de glicosilación (macroheterogeneidad), y cuáles glicanos se encuentran en cada sitio (microheterogeneidad). Más aún, surgiría la posibilidad de que exista segregación de determinados grupos de glicanos (o grupos de motivos estructurales) hacia determinadas apomucinas, tal vez confiriéndole propiedades fisicoquímicas y/o inmunológicas distintivas a cada molécula de mucina.

Por último, cabe acotar que los extremos C-terminales de estas apomucinas se encuentran señales posibles de incorporación de anclas GPI, lo que abriría la posibilidad de que las mucinas fuesen sintetizadas de forma asociada a la membrana plasmática de las células sinciales de la capa germinativa, y fuesen luego liberadas por una actividad fosfolipasa C o D. Sin embargo, el análisis composicional de monosacáridos de la CL no mostró cantidades detectables de manosa, y el tratamiento de la CL con ácido fluorhídrico (que escinde el ancla por hidrólisis de sus dos grupos fosfato), seguido de purificación de posibles glicanos del tipo GPI liberados, arrojó resultados negativos (A. Díaz, comunicación personal), por lo cual, de existir dichas anclas en la CL como tal, su abundancia sería despreciable.



(A)



(B)

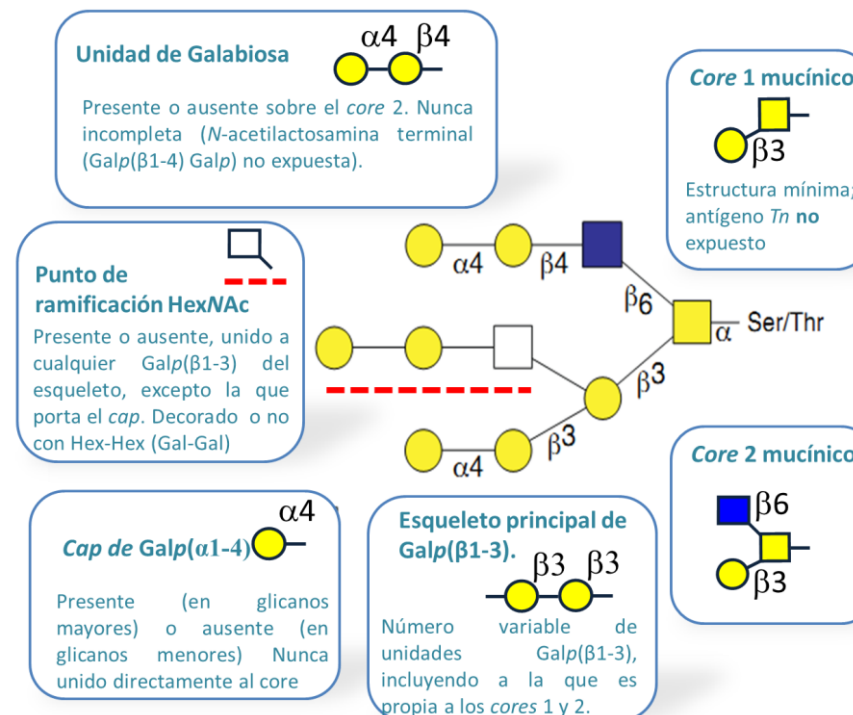
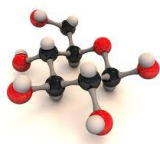


Figura 12: Estructura de los glicanos de la CL de *E. granulosus* conocidos previamente al comienzo de esta tesis. (A) Glicanos plenamente elucidados (B) Estructura general propuesta de los glicanos de CL, contemplando productos parcialmente elucidados por MS². No todos los motivos estructurales esquematizados en la figura necesariamente se encuentran en un glicano dado, sino cada glicano representa una combinación de motivos entre todos los posibles. Nótese que la deducción de ramificaciones sobre el esqueleto principal de Galp($\beta 1-3$)_n surge de glicanos mayores a los de la parte A, para los cuales solo se dispone de información de secuencia (es decir por MS²). Los motivos estructurales no elucidados al comienzo de esta tesis se subrayan en rojo punteado; debido a la ausencia de otras hexosas detectables en la CL, se infiere que el dímero Hex-Hex corresponde a Gal-Gal. Se utilizó la nomenclatura del CFG (*Consortium for Functional Glycomics*), indicadas en la esquina superior izquierda [29]. Figuras adaptadas de [18].



EGC00317

YSH^EYYGE^EDDLTTSTTTTSTTQTTVA^KATS



EGC04254

HAC^KQSPPPMTTAAPATTGATTTTP^RPTTTTT^RRPSTTT
TTR^PTTTAAPLTTTSPTATSTMQASSEM^TTS



EGC02904

HAC^KQSPPPMTTAALTTT^RATTTAPTTT^KATT^KFPATTQ^K
TITTP^RTT^RTTT^KATTTT^RTTTTTP^RTTATTTT^RRPSTTA
TTR^PTTTAAPL^KTTSP^IATSI^IQASSEM^TTS



EGC05092

HASQSNPPP^TTTTAPTTTGTTT^KAPMTTEATTEAPTT^RAT
T^IAS^KPTGATTTTPTTT^ETTTTPTTTEATTTTPTTTEATT
TTPMTIEATTTTPTTTEATTEAPMTTEATTEAPMTTEATT
EAPMTTEAKNT^KAPATTDATTEAPATT^RATTIAS^KPTGAT
TTNP^TTTTEATTTTPMTIEATTTTPITT...

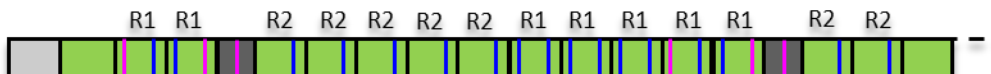
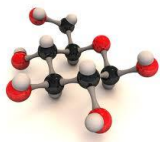


Figura 13: Secuencias de posibles apomucinas de la CL: A la izquierda se presentan en el código de una letra, y a la derecha en forma de diagrama. Los residuos ácidos se muestran en azul, los básicos en rosado, los puntos de glicosilación predichos en verde (*Net-O-Glyc*) y los residuos de cisteínas desapareadas en naranja, sobresaliendo hacia abajo. Los péptidos N-terminales no glicosilados se recuadran en gris. Solo se muestran secuencias maduras, es decir luego de la eliminación de la secuencia del péptido líder y señales posibles de incorporación de anclas GPI. La porción C-terminal de la secuencia de EGC05092 se desconoce. Nótese que los péptidos N-terminales de EGC04254 y EGC02904, que portan residuos de cisteína desapareados, son idénticos, y que el de EGC05092 también es homólogo pero carece del residuo de cisteína. Dos tipos de repetidos (R1: XAPMTTXATT; R2: TTTPTTEA; dónde X es un residuo ácido o básico) aparecen en EGC05092. Adaptado de [73]



1.9 El anticuerpo monoclonal E492 y su aplicación en el estudio de la capa laminar de *E. granulosus*

Colaboradores de nuestro laboratorio habían generado un anticuerpo monoclonal denominado E492, empleando como inmunógeno protoescolices [74]. Se encontró reactividad del anticuerpo con muestras de antígenos solubles de protoescolices, con preparaciones de la pared hidatídica (conteniendo la CL), con el líquido hidático, y en menor medida con productos de secreción/excreción de protoescolices [74]. Se había determinado que el epítipo que reconocía era de naturaleza glucídica, mediante el uso de *m*-periodato para oxidar selectivamente azúcares de materiales crudos de *E. granulosus*. Se observó la inhibición de la unión al antígeno por el disacárido sintético Galp(α 1-4)Galp, pero no por Galp(α 1-6)Glc p ni Galp(β 1-4)Glc p [74]. El determinante antigénico Galp(α 1-4)Galp está presente en más de uno de los motivos estructurales de la CL resumidos anteriormente, así como en *N*-glicanos de protoescolices y capa germinativa (Figura 9), y probablemente en glicolípidos de protoescolices [45].

Utilizando este anticuerpo, se aisló una fracción a partir de protoescolices, denominada E4⁺, que presentó actividades relacionadas a la modulación de la respuesta inmune, como la inducción de la expresión de IL-10 por esplenocitos de ratones infectados, inhibición de respuestas linfoproliferativas inducidas por Concavalina A (ConA) [75], así como ser inmunogénico y contener antígenos T-independientes [76]. Con los resultados obtenidos hasta la fecha, no es posible discriminar si estos efectos son atribuibles al determinante antigénico reconocido por el anticuerpo o a otro, presente sobre la misma molécula.

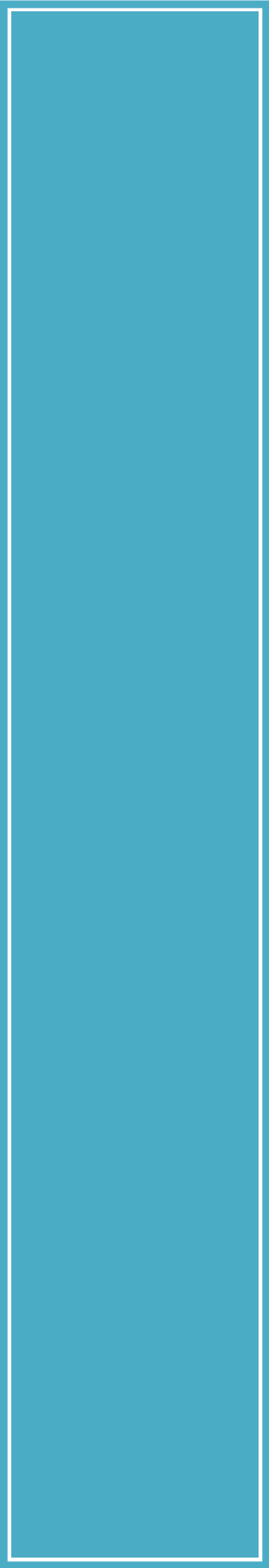
Por otro lado, se demostró que este anticuerpo reconoce a la CL y periferia de vesículas prolíferas de *E. multilocularis* [77]. A partir de metacestodos de *E. multilocularis* se obtuvo una fracción (que se denominó Em492), de manera similar a la obtención previa del antígeno Em2G11, de la cual se caracterizaron sus *O*-glicanos, como se comentó en la [sección 1.6.3](#). La fracción Em492 es reconocida por la lectina vegetal jacalina, lo que revela que también porta al antígeno T o core 1 desnudo. De manera similar a la fracción de protoescolices de *E. granulosus*, esta fracción de *E. multilocularis*, Em492, inhibe respuestas linfoproliferativas frente a estimulación antigénica o con mitógenos [77]. De modo curioso, el anticuerpo E492 reconoce a la fracción purificada de la CL por



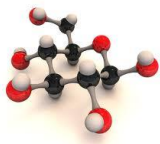
el anticuerpo G11, pero no a la inversa [77], lo que llevó a los autores a sugerir que “son epítopes distintos pero que están inmunológicamente relacionados”.

En base a lo antedicho, y a los datos explicados en la [sección 1.7](#) sobre los glicanos de la CL de *E. granulosus* se pueden postular, a nivel de hipótesis, dos posibles determinantes que podrían ser reconocidos por el anticuerpo E492: (i) el *cap* sobre el esqueleto principal ($\text{Galp}(\alpha 1-4)\text{Galp}(\beta 1-3)$) o (ii) el disacárido de galabiosa presente en el antígeno P1 ($\text{Galp}(\alpha 1-4)\text{Galp}(\beta 1-4)$). Cabría la posibilidad que la especificidad del anticuerpo abarcara monosacáridos adicionales hacia el extremo reductor en ambos casos. En cuanto al antígeno mucínico de la CL de *E. multilocularis*, como se mencionó purificable por el anticuerpo G11 pero reconocido también por el anticuerpo E492 [77], el mismo contiene también extremos de $\text{Galp}(1-4)$ tanto como decoración sobre el residuo de Gal del core y como en el contexto del posible motivo P1; así, a nivel de disacáridos, parecería contener epítopes candidatos a ser reconocidos por el anticuerpo E492 idénticos a los de *E. granulosus*.

En suma, la determinación de la especificidad fina del anticuerpo E492 sobre la CL es necesaria para definir con más precisión la naturaleza de los antígenos glucídicos de relevancia inmunológica, y podría adicionalmente ser de gran utilidad como herramienta inmunoquímica para elucidar los extremos no reductores de glicoconjugados de estos parásitos.

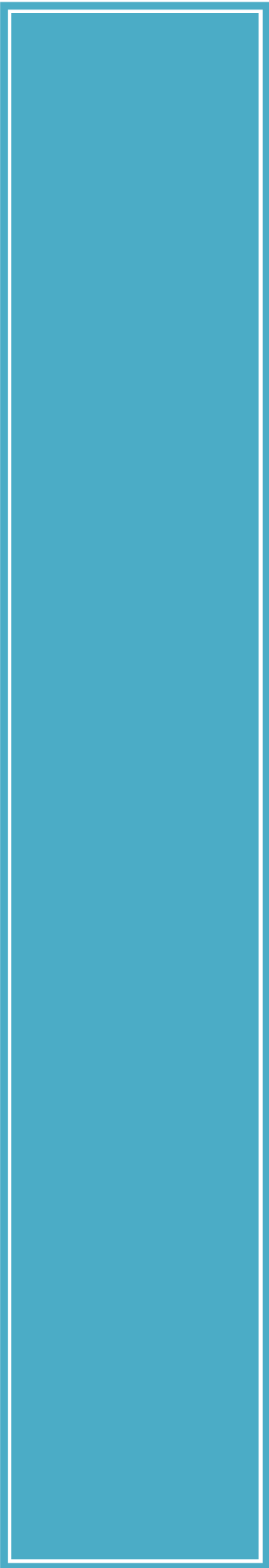


OBJETIVOS



2. Objetivos

- Comparar el perfil de *O-glicanos* de hidátides de orígenes de hospedero ovino y bovino, es decir hospederos permisivos y no permisivos para la cepa más común del parásito.
 - Completar el panorama de motivos estructurales del glicoma de la CL de *Echinococcus granulosus*, elucidando completamente nuevos glicanos purificados de la CL, de 6 a 8 residuos, con énfasis en determinar la estructura de las ramificaciones sobre el esqueleto principal de $\text{Galp}(\beta 1-3)_n$, presentes en algunos de los mismos.
 - Dilucidar la especificidad del anticuerpo monoclonal E492 y evaluar su aplicabilidad como herramienta complementaria a la elucidación por métodos químicos y espectroscópicos convencionales.
-



MATERIALES Y MÉTODOS



3. Materiales y Métodos

3.1 Material parasitario

Se obtuvieron quistes hidáticos provenientes hígado y principalmente de pulmón de hospederos bovinos, de mataderos uruguayos. Se puncionaron los quistes para liberar el líquido hidático, lo que provoca el colapso del quiste, permitiendo remover fácilmente la pared hidática utilizando fórceps. No se hizo ningún intento de separar la capa laminar de la germinativa, ya esta última es despreciable en masa frente a la CL y la separación no es sencilla en este material. La pared hidática se escurrió bien sobre papel de filtro, se registró la masa húmeda inicial y se incubó con EDTA 25 mM en buffer Tris-HCl 150 mM pH 7,5; 2 M NaCl (20 mL/g de masa húmeda inicial), por 2 h a temperatura ambiente con agitación. Esta incubación permite remover gran parte de las proteínas adsorbidas a la CL mediante la alta fuerza iónica, y disolver los depósitos de InsP_6 cálcico mediante la quelación de calcio. La remoción de InsP_6 cálcico se evidencia claramente ya que la pared hidática, originalmente blanquizca, se vuelve traslúcida. El material resultante se escurrió, se descartó el sobrenadante, se lavó con agua destilada (20 mL/g de masa húmeda inicial) y se reservó liofilizado hasta su uso.

Las hidátides provenientes de hospedero ovino fueron gentilmente cedidos por la Dra Mara Rosenzvit (Departamento de Parasitología, Instituto Nacional de Enfermedades, Buenos Aires, Argentina) y se procesaron de igual manera a las hidátides de origen bovino.

Es importante destacar que en esta Tesis no se verificó experimentalmente el estatus inflamatorio en que se hallaban las muestras. Sin embargo, en la experiencia de nuestro grupo de investigación, las muestras de origen uruguayo o de la provincia argentina de Buenos Aires de material bovino siempre tienen inflamación granulomatosa local, mientras que las muestras de origen ovino muestran resolución total o casi total de la inflamación [78].



3.2 Glicanos de la Capa laminar y glicanos sintéticos

Los glicanos se liberaron de los esqueletos peptídicos en forma de oligosacáridos-alditales, mediante la β -eliminación reductiva de la pared hidatídica realizada durante 135 horas a 45°C en 0,1M NaOH (10 mL/g de masa húmeda inicial) con el agregado de 0,3M NaBH₄, para prevenir la formación de productos de degradación o *peeling* [79] (Figura 14). El tiempo de β -eliminación reductiva para esta muestra es particularmente largo debido a que el material no se disuelve en la mezcla de reacción, y aún después de este período de tiempo, si el residuo insoluble se vuelve a someter a otra ronda de β -eliminación reductiva, libera glicanos con un perfil idéntico al del primer tratamiento (A. Díaz, observaciones no publicadas). La reacción se detuvo con ácido acético 10%, hasta pH 6 al cual ya no se observa desprendimiento de hidrógeno gas. La muestra se centrifugó (durante 30 minutos a 10.000g y 4°C), se descartó el material insoluble y se liofilizó. Luego se eliminó el borato proveniente de la neutralización de NaBH₄ agregando metanol (5 mL/g de masa húmeda inicial) y rotavaporando a sequedad tres veces. El material se reconstituyó en agua destilada (10 mL/g de masa húmeda inicial) y se centrifugó para eliminar remanentes insolubles. Los cationes Na⁺ se removieron mediante una columna de intercambio Dowex (Dow. Chemical Co., 4 mL de resina empacada/g de masa húmeda inicial) en su forma H⁺.

Los glicanos se fraccionaron (sin derivatización previa) por *gel-filtración* en las siguientes condiciones cromatográficas:

Columna:	Marca: BioGel P4, BioRad Relleno: poliacrilamida Dimensiones: 1,6 cm de diámetro interno, 100 cm de largo, 200 mL Tamaño de partícula: 45-90 μ m Rango de fraccionamiento: 800 a 4000 Da
Flujo:	26 mL/h
Volumen de inyección:	1 mL (conteniendo aproximadamente 100 a 150 mg de masa seca)
Detector:	Detector de índice de refracción 133, Gilson
Fase móvil:	ácido acético 0,2% en agua desionizada

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Carbohidratos y Glicoconjugados, Facultad de Química, Udelar.

Las fracciones de *gel-filtración* recogidas se sub-fraccionaron por HPLC en columna de carbono poroso grafitizado (PCG) [71]. Para las muestras de origen bovino, el trabajo se realizó en el



laboratorio de Glicobiología, UFRJ, Río de Janeiro, con las siguientes condiciones cromatográficas (como se describió anteriormente [36] y como se detalla debajo en la **Tabla 1**):

Equipo: HPLC Äkta purifier (GE)
Columna: **Marca:** Hypercarb, ThermoFischer Scientific
Relleno: carbono poroso grafitizado - PGC
Dimensiones: 4,6 mm diámetro interno, 20 cm largo
Tamaño de partícula: 7 µm
Temperatura: Ambiente
Flujo: 1 mL/min
Detección: UV, 214 nm
Volumen de inyección: 100 µL
Fase móvil: **A:** agua desionizada + 0,05% TFA.
B: acetonitrilo + 0,05% TFA

Tabla 1: Gradientes utilizados para el sub-fraccionamiento de material de origen bovino en PGC-HPLC

Fracciones C y D		Fracción E		Fracción F		Fracción G		Fracciones H e IJ	
Tiempo (min)	%B	Tiempo (min)	%B	Tiempo (min)	%B	Tiempo (min)	%B	Tiempo (min)	%B
0	0	0	5	0	6,5	0	6,5	0	10
3		3		3		3		3	
40	15	24	10	32	15	36	20	40	22

Los nombres de fracciones, correspondientes a fracciones de *gel-filtración* de los oligosacáridos-alditales, se explican más adelante

La purificación de los glicanos de quistes hidáticos fértiles de origen ovino fue similar a lo antes descrito, con la diferencia de que se utilizó una columna Hypercarb de 15 cm en lugar de 20 cm, en un equipo HPLC 1100 (Hewlett Packard), a una temperatura de 30±11°C y utilizando los gradientes detallados en la **Tabla 2**. En todos los casos (para el material de ambos hospederos) se lavó la columna durante al menos 5 minutos con 40% de fase móvil B antes de re-equilibrarla. Todo el trabajo de cromatografía en esta Tesis, así como la permetilación de glicanos, se realizó en el Laboratorio de Carbohidratos y Glicoconjugados, DQO/Facultad de Química y DPDB/Instituto de Higiene, UdelaR.



Tabla 2: Gradientes utilizados para el sub-fraccionamiento de material de origen ovino en PGC-HPLC

Fracciones C y D		Fracción E		Fracción F		Fracción G		Fracciones H e IJ	
Tiempo (min)	%B	Tiempo (min)	%B	Tiempo (min)	%B	Tiempo (min)	%B	Tiempo (min)	%B
0	0	0	0	0	5	0	10	0	8
1		3		3		3		5	
31	15	23	15	23	15	23	20	40	28

Los nombres de fracciones, correspondientes a fracciones de *gel-filtración* de los oligosacáridos-alditales, se explican más adelante

Las fracciones de *gel-filtración* de materiales de ambos orígenes de hospedero se identificaron con letras de A a la M, en orden creciente de tamaños. A las sub-fracciones obtenidas por HPLC se les identificó por la letra de la fracción de *gel-filtración* de partida seguida de un número para cada pico glucídico importante (escogido para posterior análisis), en orden creciente según tiempos de retención. Finalmente, a cada glicano detectable e identificable por MS^1 y MS^2 de cada sub-fracción se lo denominó con la letra de la fracción, el número de sub-fracción y una letra en subíndice (A, B, C, etc), en orden de intensidad del ión pseudomolecular en el análisis por espectrometría de masas. Así, el glicano correspondiente al ión más intenso en MS^1 presente en la sub-fracción 3 de la fracción H se denominó H3_A, por ejemplo.

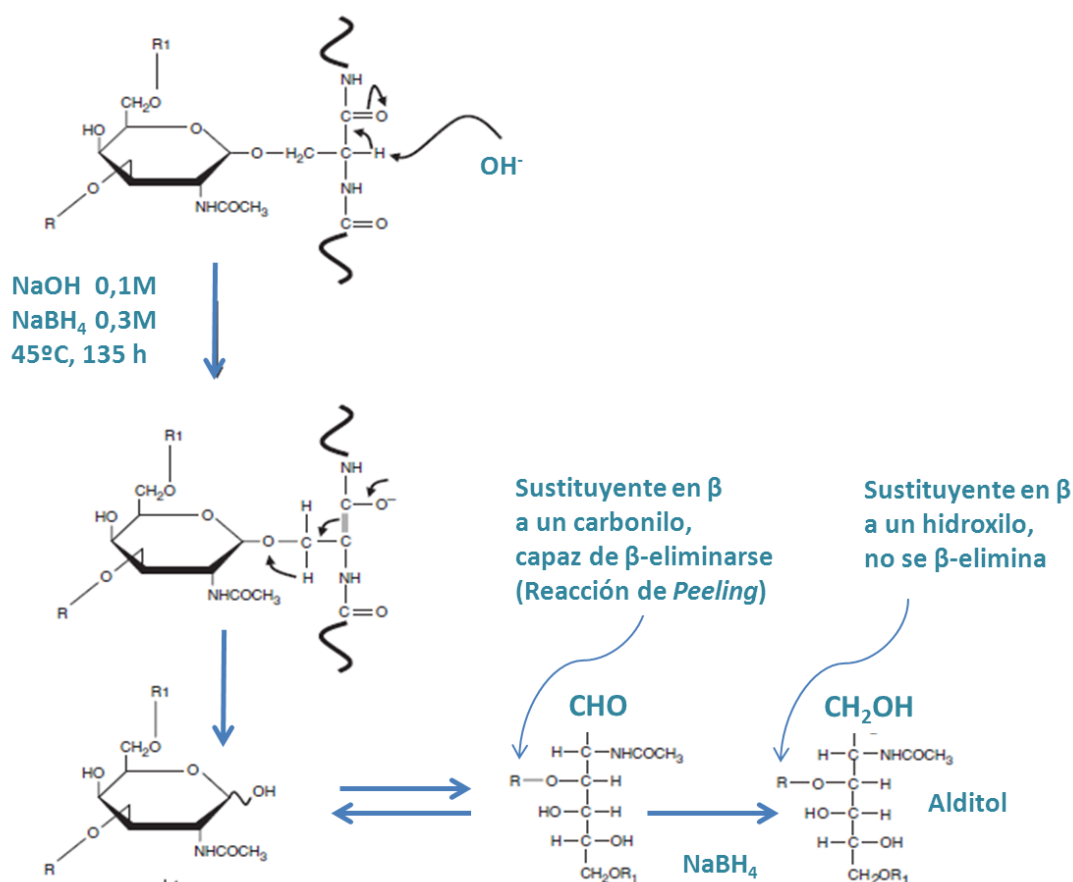


Figura 14: Reacción de β -eliminación reductiva. El producto de la reacción de β -eliminación deja el extremo reductor libre, en equilibrio con la forma acíclica, la cual es susceptible de β -eliminar sustituyentes en posición 3, lo que se previene por reducción con borohidruro de sodio. Adaptado de [80].

3.3 Glicanos de síntesis

Los glicanos de síntesis, tanto en forma de glicósidos marcados con biotina (aglicona conteniendo biotina y un brazo espaciador) o trimetilsililetil glicósidos (TMSEt) fueron gentilmente provistos por el Dr. Noriyasu Hada, Faculty of Pharmacy, Keio University, Japón [68]. Sus estructuras se muestran en la **Figura 15**.

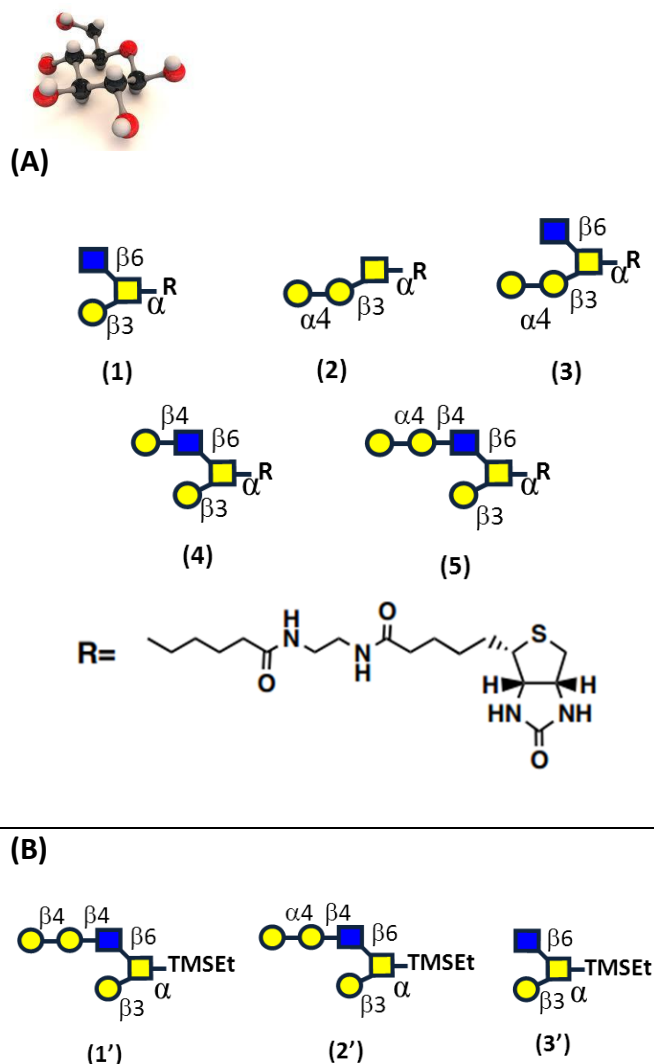


Figura 15: Estructura de glicanos de síntesis. (A) Panel de 5 glicanos sintéticos basados en las estructuras reportadas para la mucina de *E. multilocularis*, como α -glicósidos de a una aglicona (R) que contiene un grupo biotina. Nótese que en este panel están representados los motivos estructurales descritos para la CL de *E. granulosus*. (B) Panel de 3 glicanos sintéticos solubles conjugados a un grupo trimetilsililetilo (TMSEt).

3.4 Análisis de glicanos permetilados por espectrometría de masas

Las sub-fracciones purificadas se permetilaron según el método de Hakomori [81], que emplea CH_3I en DMSO, generándose el carbanión metilsulfínico, que es el verdadero agente metilante. El objeto de la permetilación es aumentar la sensibilidad del método y generar patrones de fragmentación que facilitan la interpretación [80]. La permetilación de los glicanos obtenidos por Álvaro Díaz fue realizada por Humberto González (LCG, Facultad de Química, Udelar). Los glicanos permetilados se analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF MS^1 en modo reflector positivo para determinar su composición en términos de número de hexosas y *N*-acetilhexosaminas y por MALDI-TOF-TOF MS^2 para elucidar su secuencia. Se empleó el equipo *Applied Biosystems 4800* (Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Institut Pasteur Montevideo) con el apoyo técnico de Madelón Portela. Se resuspendieron los glicanos permetilados en 20 μL de agua: metanol (1:1 v/v), se colocó 1 μL de muestra en la placa de MALDI junto con 1 μL de ácido α -ciano-



4-hidroxicinámico (CHCA) como matriz disuelta en metanol:acetato de sodio 1 mM (1:1 v/v). Luego de secas, las muestras se recrystalizaron sobre la placa con 0,5 μ L etanol:agua (1:1).

Se interpretaron los espectros de masa simples y de fragmentación (MS^2) de las sub-fracciones permetiladas [82] mediante el *software Glycoworkbench* [83]. Algunos espectros de fragmentación de muestras de origen bovino fueron calibrados haciendo coincidir la señal del pico principal con el valor calculado por el programa (fragmentación *in silico*). Se utilizó la herramienta *Glycopeakfinder* para hallar los iones pseudomoleculares en espectros de MS simples. En cuanto a los espectros de fragmentación, para cada espectro se obtuvo una lista de picos preliminar, que se depuró mediante la herramienta *Glycopeakfinder* de forma de contener exclusivamente fragmentos de glicanos permetilados con extremo reductor reducido, de modo de excluir señales provenientes de contaminantes no glucídicos.

Luego se propuso una colección de estructuras posibles utilizando la herramienta *Glycanbuilder* [84], a las cuales se le realizó fragmentación *in silico*, para luego anotar los valores de m/z predichos contra la lista de picos depurada [83]. Esto permitió seleccionar la estructura que mejor representa a los valores m/z del espectro, en base al factor de cobertura del espectro, definido como el porcentaje de los picos que corresponden a la estructura propuesta, ponderados por su intensidad. Se tomaron en consideración los iones de fragmentos provenientes de la ruptura de un único enlace glicosídico (series B, C, Y & Z véase [Figura 16](#)) [85], así como iones de fragmentos derivados de la ruptura de dos enlaces glicosídicos (BY, CZ, YY, ZZ, etc), tomando aquellos picos cuya intensidad fuera de al menos un 3% de la del fragmento principal, y con una relación señal/ruido mayor a 10. En el caso de hallarse fragmentos mutuamente incompatibles derivados de un mismo ión pseudomolecular, se consideró la fracción como una mezcla. En los casos que aparentaba tratarse de mezclas binarias sencillas, se propusieron los posibles componentes de dichas mezclas.

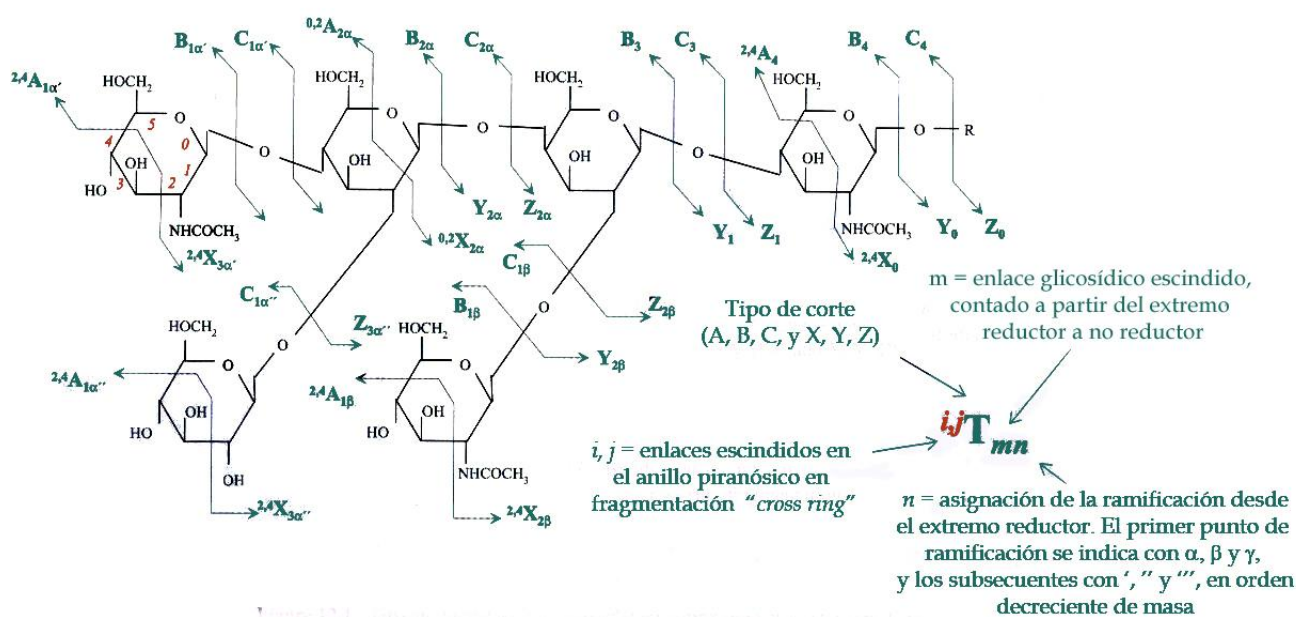


Figura 16: Nomenclatura de Domon y Costello para fragmentación de oligosacáridos [85]. El residuo superior izquierdo muestra la numeración de los enlaces del anillo de piranosa escindidos en fragmentos “cross-ring” en rojo.

3.5 Análisis de posiciones de sustitución (análisis de metilación)

Se determinaron las posiciones de sustitución de 7 sub-fracciones de HPLC seleccionadas, mediante el método de los metilglicósidos parcialmente metilados y acetilados. Brevemente, se permetilaron las muestras mediante el método de Hakomori (ver [sección 3.4](#)), se realizó metanólisis (700 μL de 0,5 M HCl en MeOH anhidro, a 80°C por 18 horas) y finalmente se peracetilaron los grupos hidroxilo liberados durante la metanólisis (100 μL de anhídrido acético:piridina, 9:1 vol/vol, a 37°C por 18 horas).

Las muestras se llevaron a sequedad y se retomaron en 30 μL de MeOH y se analizaron por cromatografía gaseosa acoplada a un detector de espectrometría de masa por ionización química (CG 17A Gas Chromatograph, GC-MS-QP5050A Gas Chromatograph Mass Spectrometer, Shimadzu; en columna DB1 de 0,25 mm x 30 m y 0,25 μm de espesor del recubrimiento, con una rampa de temperatura de 210 a 240°C, a 2°C/minuto). Dado que la reacción de metanólisis produce una mezcla racémica de α y β -metilglicósidos para cada residuo de los glicanos, se utilizaron mezclas de α -metilgalactósidos y β -metilgalactósidos parcialmente metilados y acetilados como estándares de referencia para los tiempos de retención, y se confirmó la identidad de cada pico por su espectro de



fragmentación, siguiendo el algoritmo de interpretación de espectros de metilglicósidos parcialmente metilados y acetilados propuesto por Fournet *et. al* [86]. Este análisis se realizó en el Laboratorio de Glicobiología, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, Río de Janeiro, Brasil, con la ayuda del Prof. Jose O. Previato.

3.6 Resonancia Magnética Nuclear (NMR)

Se analizaron los sub-fracciones seleccionadas de PGC-HPLC en espectrómetros Bruker DRX 400 MHz, Bruker DRX 600 MHz y Bruker Avance III 800 MHz (Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear, UFRJ, Río de Janeiro, Brasil), con la colaboración de la Dra. Adriane Todeschini y el Dr. George L. Neves, del Laboratorio de Glicobiología del IBCCF de dicha Universidad. Los espectros se obtuvieron en D₂O a 25°C, utilizándose TMS como referencia para los desplazamientos químicos de ¹H. Se determinaron los desplazamientos químicos de protón, así como su conectividad y posiciones de sustitución mediante espectros 1D-¹H, así como experimentos bidimensionales homonucleares: 2D-¹H-COSY; 2D-¹H-TOCSY; 2D-¹H-ROESY. Los desplazamientos de ¹³C se obtuvieron mediante 2D-HSQC utilizando los desplazamientos de protón y carbono del grupo *N*-acetamido (2,07 ppm y 22,7 ppm respectivamente) para la calibración. Los espectros se analizaron utilizando el *software NMRnotebook 2.60* (NMRtech).

Se determinó la anomeridad de cada residuo a partir del desplazamiento químico de su protón anomérico (~5 ppm para protones anoméricos α y <4,80 ppm para protones anoméricos β), su constante de acoplamiento H₁-H₂ (~4,0 Hz para protones anoméricos α y 7,0-8,0 Hz para protones anoméricos β, en residuos de configuración *gluco* o *galacto* en los que el protón H₂ es axial), y su desplazamiento químico de carbono (100-102 ppm para carbonos anoméricos α y >102 ppm para carbonos anoméricos β). La determinación de la configuración de cada residuo (*gluco* o *galacto*) se basó en la comparación de los desplazamientos de protón contra datos tabulados (*Glycosciences.de*, anteriormente *SweetDB* [87, 88]) y reportados para productos relacionados [70], y en particular en base al desplazamiento químico del protón H₄ (el subíndice indica la posición del protón dentro del residuo), ecuatorial en los residuos de configuración *galacto* (4.00-4.40 ppm), y en cambio axial en los residuos de configuración *gluco* (~3.70 ppm). Asimismo, se verificó la posición axial de protones H₃ y H₅ por correlaciones H₁(β)-H₃, H₁(β)-H₅ o H₃-H₅ en los respectivos espectros de ROESY.



La asignación del grupo acetamido a su respectivo residuo monosacárido se basó en el desplazamiento de ^{13}C del carbono en posición 2 (~55 ppm para animoazúcares libres o acetilados y 69-72 ppm para hexosas [89]). Las posiciones de sustitución de cada residuo se determinaron mediante acoplamientos por efecto Overhauser (*Nuclear Overhauser effect*, NOE) entre el protón anomérico de un residuo y los protones la posición sustituida en el residuo contiguo, así como mediante el incremento del desplazamiento de ^{13}C del carbono de la posición sustituida (entre 8 y 10 ppm). Finalmente los desplazamientos del residuo de *N*-acetilgalactosaminitol son característicos por tratarse de un residuo reducido y por lo tanto en forma acíclica. Esto se ve reflejado en señales de 2 protones H_1 que acoplan con una señal característica de ~4,40 ppm del protón H_2 . Todos los glicanos de la CL estudiados poseen una sustitución de este residuo en posición 3 por derivarse de los *cores* mucínicos 1 o 2; la diferencia entre glicanos derivados en uno u otro *core* se encuentra en la sustitución en posición 6, que redunda en señales de C_6 de ~63,1 ppm para glicanos basados en *core* 1, o 71,0 - 71,7 ppm para los basados en *core* 2. Otros detalles se dan en *Resultados*.

Hecha la elucidación, se contrastaron los desplazamientos químicos asignados con los estimados por *Glycosciences.de* [88]. Estas estimaciones corresponden a los promedios de los desplazamientos de motivos iguales o similares reportados en la base de datos. En los casos en los que el motivo entero no está reportado, la herramienta utiliza residuos con entornos químicos similares; por ejemplo, el protón H_6 de una galactopiranososa 3,6 disustituida puede estimarse mediante el desplazamiento del protón H_6 de una galactopiranososa 3 monosustituida. Por lo tanto, la exactitud de la estimación depende del número de entradas de la base de datos consideradas para realizarla y la similitud de los entornos químicos de los residuos de la base de datos y los entornos químicos de los residuos en estudio.

3.7 Estrategia general de elucidación de nuevos O-glicanos de la CL

En vista de los resultados del trabajo previo, la CL de *Echinococcus granulosus* presenta un alto número de *O*-glicanos cercanamente emparentados que abarcan un espectro de tamaños moleculares que va desde 2 residuos monosacáridos hasta al menos 18 residuos [70]. Como se mencionó en la introducción, la abundancia de estos glicanos disminuye a medida que aumenta el número de residuos por glicano, lo que hace que los glicanos mayores a 5 residuos, que son el foco



de esta Tesis, se puedan obtener en un tiempo razonable solo en el orden de unos pocos cientos de microgramos. Esto, combinado con la necesidad de aplicar toda la batería de experimentos descrita para elucidar todos los aspectos de un nuevo oligosacárido, hace impráctico pretender purificar y elucidar completamente todos los nuevos componentes detectados.

Por ende, esta Tesis se centró en los principales glicanos presentes en el material de origen bovino de las sub-fracciones H e IJ de *gel-filtración* (véase [Figura 17](#) en la [sección 4.1.1](#)), los cuales no habían sido descritos en el trabajo precedente, pero al mismo tiempo poseían un número de residuos manejable (entre 6 y 8). Todas las sub-fracciones principales de HPLC-PCG provenientes de las fracciones H e IJ mencionadas se analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF MS¹, para determinar las masas moleculares de los glicanos que las componían. No se re-cromatografió ninguna sub-fracción, aún cuando fuera heterogénea por MS¹. Todos los componentes principales de las sub-fracciones se analizaron por MS². De las subfracciones, se seleccionaron para análisis de posiciones de sustitución y NMR aquellas con cantidad de material suficiente (por lo menos 100 µg) y que presentaran en el espectro de MS¹ una única señal o una señal con intensidad mucho mayor a la de los demás. De esta manera se esperaba obtener resultados de MS², análisis de metilación y NMR en los que las señales correspondiesen a un único glicano, o en las que las señales de los glicanos contaminantes fuesen despreciables. Esta estrategia no eliminaba la posibilidad de encontrar glicanos isóbaros compartiendo la misma sub-fracción, posibilidad que se verificó como realidad en algunos casos.

3.8 Determinación de la especificidad del anticuerpo monoclonal E492

Se diluyó el epítipo de la CL reconocido por el anticuerpo E492 (IgG3 de ratón) mediante inmunoensayos directos y de competencia con glicanos de síntesis. Para ello en primer lugar se sensibilizaron placas de ELISA con estreptavidina 5 µg/mL en buffer fosfato salino (PBS), seguido por incubación con una solución de bloqueo libre de carbohidratos (*CarboFree*TM, *Vector Labs*), y luego un segundo paso de sensibilización con glicanos sintéticos marcados con biotina ([Figura 15A](#)) [68] en concentración 2 µM en PBS. Se incubó con el anticuerpo E492 en un rango de concentraciones de 1,25 µg/mL a 10 µg/mL y se reveló mediante un anticuerpo anti-IgGs de ratón acoplado a peroxidasa (Sigma).



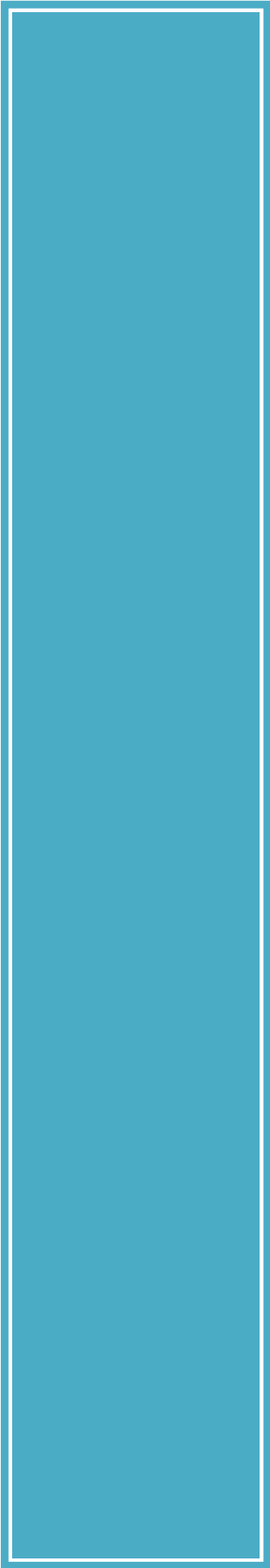
En una segunda etapa, se verificó la especificidad realizando ELISA de competencia, para lo cual se realizaron los mismos pasos de sensibilización (empleando solamente el glicano 5 mostrado en la **Figura 15A**) y de revelado descritos, y se emplearon como competidores a glicanos solubles en forma de α -glicósidos de TMSEt (**Figura 15B**) [68], en un rango de concentraciones de 1,6 $\mu\text{g/mL}$ a 200 $\mu\text{g/mL}$. Se realizó el revelado mediante el anticuerpo anti-IgGs de ratón acoplado a peroxidasa (Sigma).

En todos los casos se utilizó un anticuerpo IgG3 de ratón de especificidad irrelevante (Sigma) como control isotópico, únicamente a la mayor concentración del ensayo (10 $\mu\text{g/mL}$).

3.9 Corroboración inmunoquímica de estructuras utilizando el anticuerpo monoclonal E492

Se corroboró la presencia del motivo estructural reconocido por el anticuerpo E492 en glicanos provenientes de las dos fracciones de *gel-filtración* que contienen a los glicanos en estudio (fracción H y fracción I). Se realizó un ensayo de competencia análogo al descrito anteriormente, ensayando las sub-fracciones obtenidas por PGC-HPLC de hidátides de hospedero ovino, en un rango de concentraciones aproximado de 0,5 μg a 100 μg . La concentración de carbohidratos en cada sub-fracción se estimó mediante el método del orcinol sulfúrico [90], utilizando para cada una un estándar compuesto por una mezcla de galactosa y *N*-acetilglucosamina en la misma proporción que la presente en el glicano predominante de cada sub-fracción.

Las concentraciones se expresaron en términos de masa y no en concentración molar ya que se utilizaron para la inhibición sub-fracciones completas, que en algunos casos están compuestas por más de un glicano detectable (de distinta masa molar).



RESULTADOS



4. Resultados

4.1 Comparación de O-glicanos de la capa laminar de hidátides de hospedero bovino y ovino.

Como primer interrogante a responder, nos planteamos si el panorama estructural descrito previamente para los O-glicanos presentes en el material de origen bovino es comparable o no al de los O-glicanos en el material de origen ovino, tomando en cuenta que el ovino es un hospedero permisivo para la cepa común de este parásito en tanto que el bovino no lo es. Existía entonces la posibilidad que lo hallado anteriormente en el bovino fuese consecuencia de la interacción parásito-hospedero desfavorable para la hidátide, más que un reflejo fidedigno de su biología.

En efecto, a nivel de hipótesis, la falta de adaptación al hospedero bovino podría tener repercusiones sobre la capacidad biosintética de *E. granulosus*, lo que podría redundar en alteraciones en la estructura de sus glicanos tales como:

- Los glicanos no alcanzan su tamaño definitivo
- Algunos motivos estructurales están ausentes o pobremente representados
- Las estructuras glucídicas son aberrantes

La primera posibilidad podría ser una explicación de la dominancia de estructuras cortas (*cores* desnudos o decorados con 1 solo residuo). Más allá de los tamaños, si en el material de hospedero ovino se encontrara un repertorio estructural significativamente diferente al hallado en el de origen bovino, la elucidación de nuevas estructuras debería centrarse en los glicanos provenientes de origen ovino.

4.1.1 Purificación por *gel-filtración* y análisis por MS¹ de O-glicanos de la capa laminar de hidátides de hospedero bovino y ovino.

En términos de distribución de tamaños determinada por *gel-filtración*, los glicanos de la CL de hidátides ovinas resultaron muy similares a los glicanos provenientes de quistes bovinos (**Figura 17**). Para ambos hospederos, las fracciones dominantes son las denominadas C, D y E, que



corresponden a glicanos de 2, 3 y 3-4 residuos respectivamente (**Tabla 3, Figura 17**). La abundancia de los demás glicanos de la CL disminuye a medida aumenta el tamaño, hasta culminar en la fracción M, la exclusión, que probablemente consista en glicopéptidos sin β -eliminar o parcialmente β -eliminados (A. Díaz, observaciones no publicadas). Cabe aclarar que las fracciones de elución más tardía, denominadas A y B, están compuestas por productos que presumiblemente derivan de reacciones de *peeling* secundarias a la β -eliminación, dadas las condiciones drásticas utilizadas para la liberación de los glicanos [70]. Para todas las fracciones analizadas (C a J), la composición de glicanos a nivel de MS¹ resultó igual o similar para el hospedero ovino que para el hospedero bovino, analizado previamente a esta Tesis (**Tabla 3**).

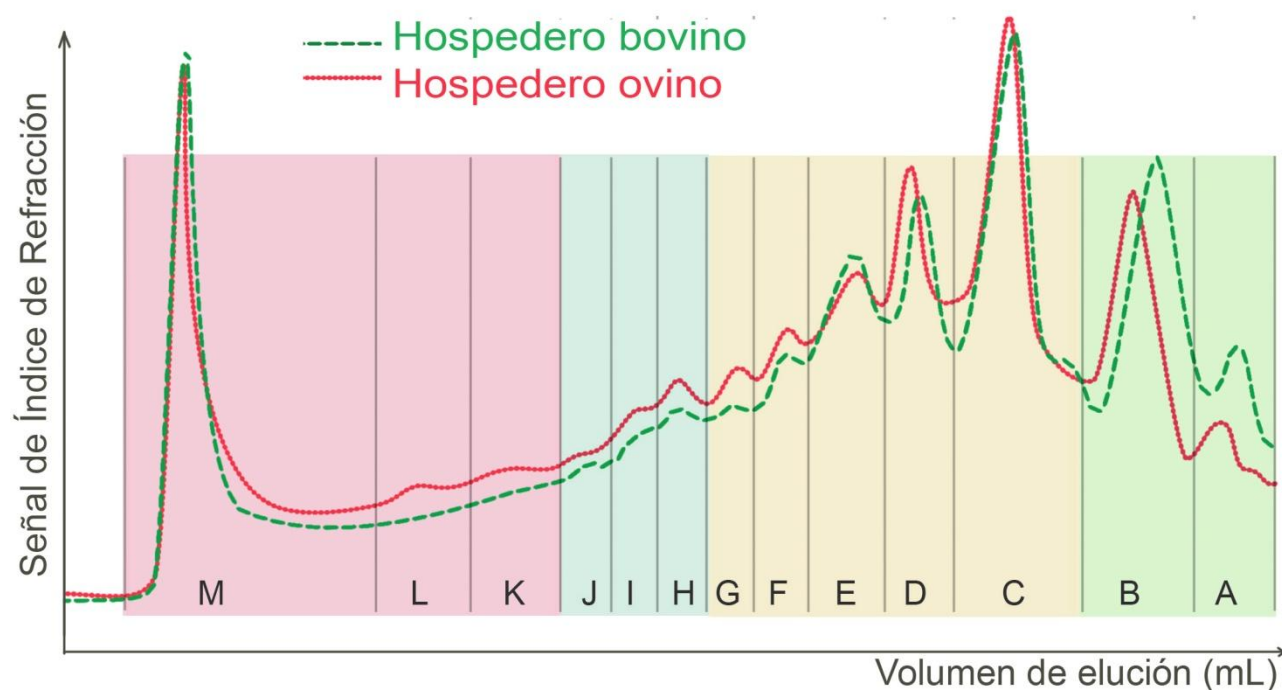


Figura 17: Perfiles de gel-filtración de O-glicanos de la CL de hidátides de hospedero bovino y ovino. Para ambos hospederos existe predominancia de estructuras pequeñas (fracciones C y D) y abundancia decreciente de estructuras de mayor número de residuos (F a L). En verde están sombreados las fracciones correspondientes a productos de degradación, en beige las fracciones estudiadas en detalle previamente solo para el hospedero bovino [70], y estudiadas en esta Tesis para el material de origen ovino, y en celeste las fracciones analizadas en detalle en esta Tesis; en rosado se indican las fracciones cuyos productos componentes no se han analizado.



Tabla 3: Caracterización por MALDI-TOF MS¹ de las fracciones de gel-filtración de los hospederos bovino y ovino

Fracción	m/z experimental		m/z teórico	Composición
	Hospedero bovino	Hospedero ovino		
C	534,26	534,28	534,29	HexHexNAc-ol
D	738,46	738,38	738,39	Hex ₂ HexNAc-ol
E	779,46	779,40	779,42	HexHexNAcHexNAc-ol
	942,44	942,48	942,49	Hex ₃ HexNAc-ol
F	983,46	983,44	983,52	Hex ₂ HexNAcHexNAc-ol
	1146,59	1146,49	1146,59	Hex ₄ HexNAc-ol
G	1187,57	1187,52	1187,52	Hex ₃ HexNAcHexNAc-ol
	1350,65	1350,59	1350,59	Hex ₅ HexNAc-ol
H	1391,69	1391,69	1391,71	Hex ₄ HexNAcHexNAc-ol
	1554,75	-	1554,79	Hex ₆ HexNAc-ol
I	1432,76	1432,71	1432,74	Hex ₃ HexNAc ₂ HexNAc-ol
	1595,82	1595,78	1595,81	Hex ₅ HexNAcHexNAc-ol
	1758,91	-	1758,89	Hex ₇ HexNAc-ol
	1963,02	-	1962,99	Hex ₈ HexNAc-ol
J	1636,82	1636,79	1636,84	Hex ₄ HexNAc ₂ HexNAc-ol
	1799,90	1799,86	1799,91	Hex ₆ HexNAcHexNAc-ol
	2004,01	2003,95	2004,01	Hex ₇ HexNAcHexNAc-ol
	2045,03	2044,96	2045,04	Hex ₆ HexNAc ₂ HexNAc-ol

Los nombres de las fracciones son los que se indican en la **Figura 17**. Todos los valores de m/z corresponden a aductos de sodio monoisotópicos de glicanos permetilados. Las señales que se encuentran en más de una fracción se presentan exclusivamente en la fracción en la que poseen mayor intensidad relativa en el material bovino. Los datos del material proveniente de hospedero bovino fueron tomados de [70].

4.1.2 Análisis por HPLC y MS² de O-glicanos de la capa laminar de hidátides de hospedero bovino y ovino

Las fracciones C a G, que fueron centro del trabajo que es precedente directo a esta Tesis, se sub-fraccionaron por HPLC y se estudiaron por MS¹ y MS², ahora para el hospedero ovino. Se observó que los productos principales previamente elucidados para el hospedero bovino se encuentran también estaban presentes en el material de origen ovino (**Figura 18 A y B**; los datos de MS² se presentan solo en el Anexo porque son cualitativamente idénticos a los del hospedero bovino, ya reportados). En cuanto a los resultados cromatográficos, es importante tener presente que dada la detección por UV a 214 nm del sistema de HPLC, que aprovecha por cromóforo al grupo acetamido de GlcNAc y GalNAc-ol, el área de cada pico depende tanto de la abundancia del



glicano correspondiente como del número de residuos de HexNAcHexNAc-ol presentes en la molécula. Por lo tanto, un glicano con dos residuos de HexNAc tendrá aproximadamente el doble de factor de respuesta en la detección que un glicano con un único residuo de HexNAc (por ejemplo, E1_A respecto a E3_A, **Figura 18A**).

Más en detalle, las primeras dos fracciones C y D, presentan un componente principal cada una, el *core* 1 desnudo y el *core* 1 decorado con un residuo Galp(β1-3), respectivamente. En estas fracciones, cada sub-fracción se corresponde con un único glicano detectable. Nótese que en el hospedero bovino, la fracción C presenta al glicano de la fracción D como componente secundario, en tanto que para el hospedero ovino sucede lo inverso (**Figura 18A**), lo que se debe a pequeñas diferencias en la recolección de las fracciones en cada caso. La fracción E, en ambos casos, presenta como componente principal al *core* 2 desnudo (E1_A, **Figura 18A**), seguido en abundancia aparente por Galp(α1-4)Galp(β1-3)Galp(β1-3)GalNAc-ol (E3_A), luego el glicano de la fracción D (E2_A = D1_A) y finalmente el *core* 2 decorado con Galp(β1-3) (el glicano principal de la fracción F, ver más adelante). Estas tres fracciones representan la gran mayoría de los *O*-glicanos de la CL de *E. granulosus*, y no presentan variaciones entre los dos hospederos estudiados.

Las siguientes fracciones, F y G, presentan glicanos de 4 a 6 residuos, y también son prácticamente iguales en composición entre los dos hospederos (**Figura 18B**). Se observan diferencias entre los cromatogramas debido a que se utilizaron columnas distintas y se inyectaron distintas cantidades de muestra para el análisis de material proveniente de uno y otro hospedero, lo que se refleja en diferencias en tiempos de retención y en resolución de los picos, pero no en el orden de elución de los oligosacáridos. Solo dos glicanos (G4_B y G6_B) se detectan en el hospedero bovino pero no en el ovino, aunque sus estructuras no revelan diferencias biológicas demostrables (G4_B es igual en secuencia a G3_A, aunque por su tiempo de retención debe tener diferencias en alguna de sus posiciones de sustitución y/o anomeridad; sin embargo este glicano no se estudió por NMR; G6_B es un producto relacionado G6_A, conteniendo un residuo más de hexosa). Globalmente surgen pocas diferencias entre los hospederos, y estas son probablemente atribuibles a diferencias en abundancias relativas, más que a contrastes con relevancia biológica.

(A)

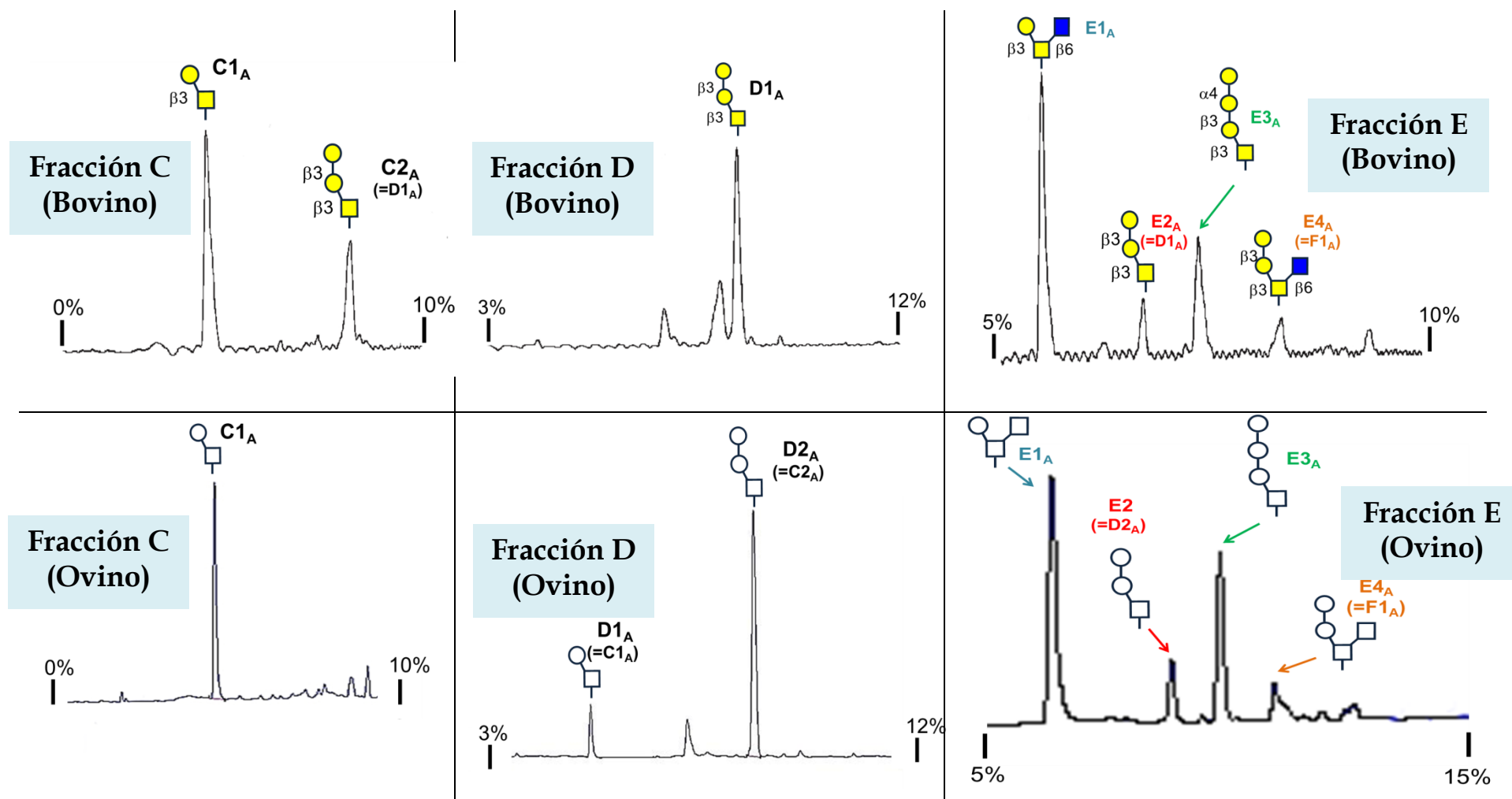


Figura 18 : Comparaciones de los cromatogramas de PCG-HPLC de las fracciones de gel-filtración C a G de material de origen bovino y ovino. Ver leyenda al final de la figura (parte B).

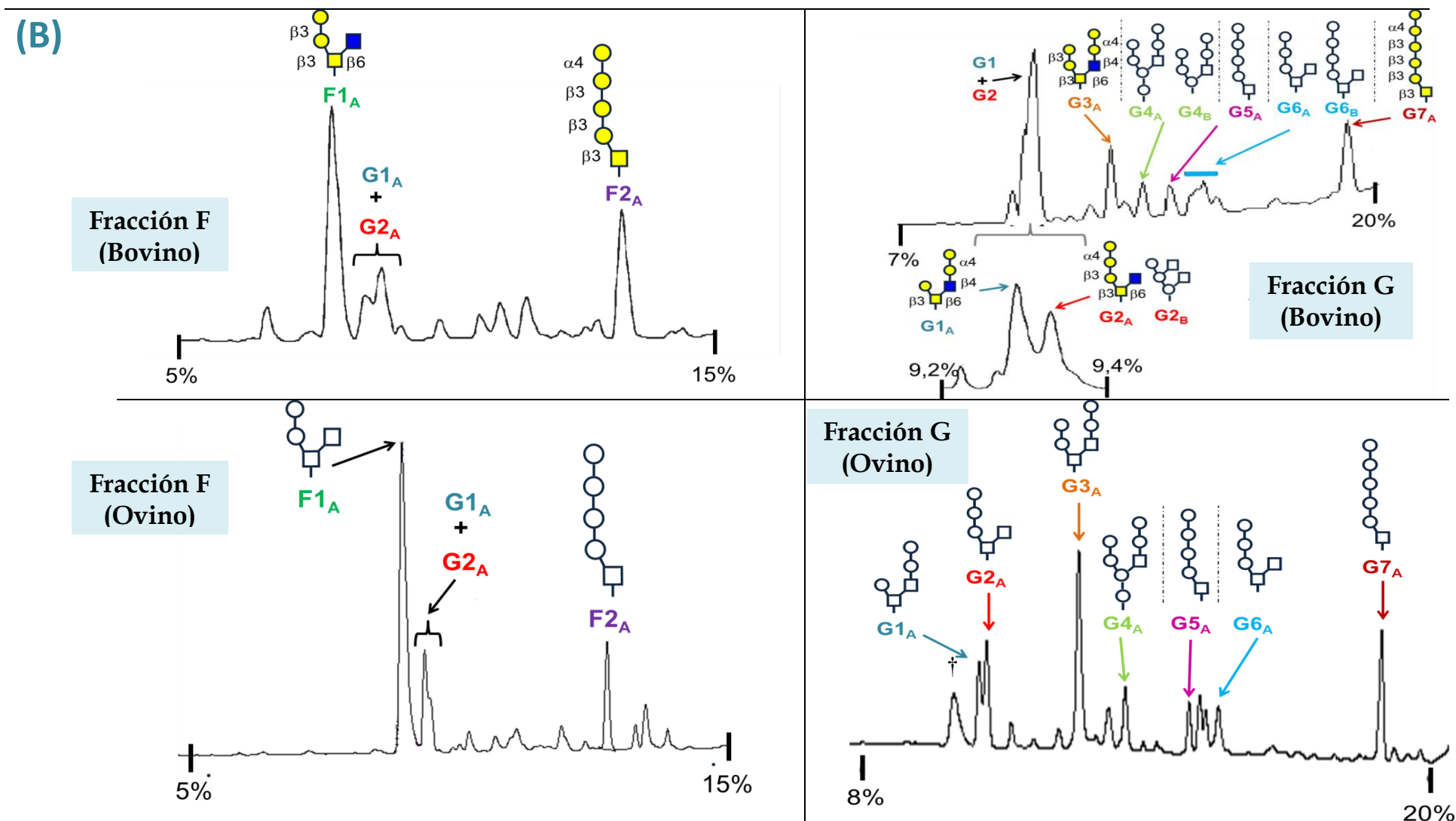


Figura 18: Comparaciones de los cromatogramas de PCG-HPLC de las fracciones de gel-filtración C a G de material de origen bovino y ovino. A cada sub-fracción de naturaleza glucídica (positiva para orcinol-sulfúrico) se le asignó un nombre compuesto por la letra de la fracción y un número correspondiente al orden de elución. La sub-fracción $G1+G2$ se re-cromatografió solo en el caso del bovino, indicado con una llave. Dentro de cada pico, se nombraron los distintos componentes detectables por MS^1 con letras correlativas (A, B, C, etc) según el orden de abundancias en el hospedero bovino. Cuando se comprobó igual secuencia por MS^2 entre hospedero bovino y ovino, se usaron los mismos nombres. Las estructuras mostradas corresponden a elucidación total previa al comienzo de la Tesis (estructuras en color) o a secuencia por MS^2 solamente (trabajo realizado en esta Tesis). †no glucídico.



La presente Tesis se centró principalmente en las fracciones denominadas H, I y J, que como se mencionó anteriormente contienen glicanos con las estructuras aún no elucidadas en el trabajo anterior; las fracciones I y J se juntaron generando una única fracción "IJ". No se podía esperar que la similitud en composición en materiales de los dos orígenes de hospedero observada para las fracciones C a G se mantuviera necesariamente para las fracciones H e IJ, en las que se esperaba una mayor diversidad, ya que al haber más residuos surgen más posibilidades de combinarlos entre sí, aun estando restringido a un grupo acotado de posibilidades biosintéticas.

Las fracciones H e IJ se sub-fraccionaron por PGC-HPLC, se permitilaron y se analizaron por MALDI-TOF MS¹ y MALDI-TOF-TOF MS². Las mismas son complejas, ya que están compuestas por 8 a 10 sub-fracciones cada una, y cada sub-fracción puede contener hasta 4 componentes (**Figura 20**). Excepto por el glicano H2_A, no existen estructuras particularmente dominantes dentro de estas fracciones, lo que apoya la tendencia previamente observada que el tamaño de glicano creciente se ve acompañado de mayor complejidad combinatoria, sin haber vías biosintéticas preferenciales que sesguen hacia un determinado tipo de estructura dominante. Las fracciones H de hospederos bovino y ovino (**Figura 20 A y B**) presentan similitud en cuanto al perfil cromatográfico y las secuencias de los glicanos presentes (**Tabla 4** y **Tabla 5**). En cambio, la fracción IJ presenta diferencias considerables en las abundancias relativas de sus componentes entre los materiales de ambos hospederos.

La asignación de los espectros de MS² de estos nuevos productos más complejos que los analizados en el trabajo precedente [70], se realizó con la ayuda del *software Glycoworkbench* como se ejemplifica para el producto H1_A (**Figura 19**). Además de los fragmentos principales derivados de la ruptura de un único enlace glicosídico, se consideraron por ser informativos los aquellos que surgen de la ruptura de dos enlaces glicosídicos, en los casos que tenían una intensidad superior al 3% de la del pico principal. La nomenclatura adoptada se comenta en la **Figura 19**; por ejemplo, el fragmento con $m/z = 653,33$ C_{3α}X_{Y2α''} proviene de la ruptura de dos enlaces glicosídicos y corresponde a la intersección del ión 912,44 C_{3α} con el ión 1117,54 Y_{2α''}.

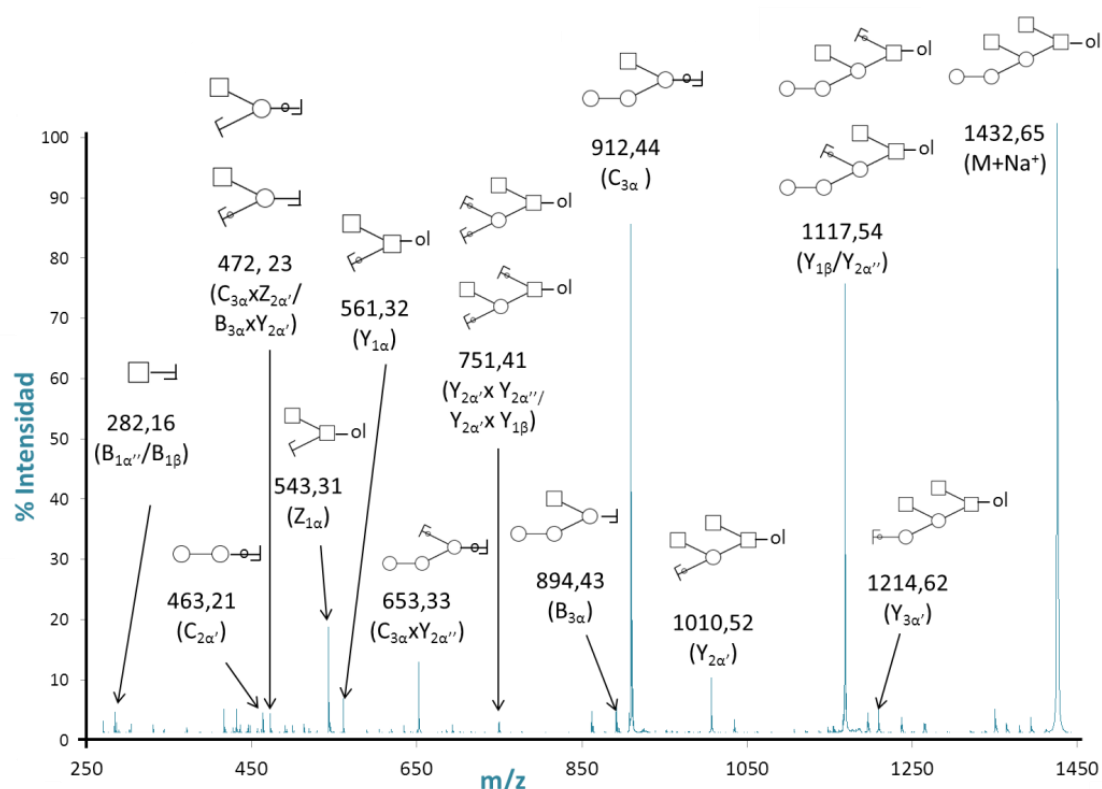


Figura 19: Ejemplo de espectros de MS² MALDI-TOF-TOF. Ejemplo de fragmentación del glicano H1_A. Se indican los fragmentos que surgen de la escisión de uno o dos enlaces glicosídicos. Se utilizó la nomenclatura de Domon y Costello [85], asignándole el subíndice 1 al residuo de alditol. En el caso de fragmentos de doble escisión, los mismos se indicaron como la intersección de los dos fragmentos un corte mediante “x”. En el caso de existir más de un posible fragmento para un valor de m/z dado, se indicaron todas las posibilidades, separadas por “/”, sin ningún orden particular. Los fragmentos de las series Y y C se indican con “o” sobre el enlace escindido. Se aplican además todas las consideraciones de la **Tabla 4**.

La primera sub-fracción que se observa en material de ambos hospederos, H1, está compuesta por un único glicano, H1_A (**Figura 20 A y B**, **Tabla 4** y **Tabla 5**), que es triantenario y presenta 6 residuos monosacarídicos. La sub-fracción H2, idéntica en ambos hospederos, también está compuesta por un único glicano, H2_A, cuya secuencia es igual a la del glicano G3_A, descrito anteriormente [70], y presumiblemente se trate de la misma estructura, considerando que los espectros de MS² arrojan idénticos resultados. H2_A es el glicano más abundante de la fracción H. Las siguientes sub-fracciones, H3 a H5, contienen glicanos biantenarios de 6 o 7 residuos, en los que una antena consiste en Hex-Hex-HexNAc (m/z=690,3, **Tabla 4** y **Tabla 5**), lo que explica en parte que posean similares tiempos de retención. Una observación relevante es que la sub-fracción H5 contiene un glicano con extremo reductor hexitol, que podría ser un producto de una reacción de



peeling. Este tipo de glicanos se encuentra, en baja proporción, en varias sub-fracciones (indicados en la [Figura 20](#) con ‡).

Las sub-fracciones H3 a H5 se corresponden en tiempos de retención entre los dos hospederos, y sus glicanos componentes son muy similares, salvo por dos estructuras adicionales en la sub-fracción H3 de origen bovino (H3_{B'} y H3_C), y por el extremo reductor hexitol en el glicano H5_{A'} de origen ovino. Por otra parte los glicanos H6_A y H7_A ([Tabla 4](#)), componentes únicos de sus respectivas sub-fracciones, son glicanos biantenarios de 6 residuos en los cuales, a diferencia de los glicanos de las sub-fracciones H2-H5, una antena corresponde a un único residuo HexNAc ($m/z=282,2$), por lo que el largo total de la cadena principal es mayor, lo que se correlaciona con un mayor tiempo de retención (ver discusión sobre tiempos de retención más abajo). Ambos glicanos poseen idénticos espectros de fragmentación en los dos hospederos ([Tabla 4](#) y [Tabla 5](#)).

La última sub-fracción estudiada en la fracción H del hospedero bovino, H8, está compuesta por un único glicano monoantenario de 6 residuos, que consistentemente con las tendencias discutidas más adelante, posee mayor tiempo de retención que las estructuras anteriormente mencionadas ([Figura 20A](#)). Su contraparte en el hospedero ovino no es un pico bien definido ([Figura 20B](#)), y está compuesto por un glicano con extremo reductor de HexNAc-ol de 7 residuos con una ramificación Hex₂HexNAc sobre el esqueleto principal de hexosas (H8_B), y un glicano con el extremo reductor de Hexitol decorado con una ramificación Hex₂HexNAc (H8_C). Finalmente en el hospedero ovino se estudió una sub-fracción que se denominó H9, de la cual se pudo identificar un glicano triantenario basado en *core 2*, cuya ramificación por sobre el esqueleto principal se encuentra decorada con 2 hexosas.

Las siguientes dos fracciones de *gel-filtración*, I y J, como se mencionó antes se analizaron como una única fracción. Es importante destacar, que dada la enorme complejidad de la muestra, las fracciones de *gel-filtración* **no** están resueltas, por lo que existen algunas sub-fracciones, como IJ1 e IJ3, que se corresponden con las subfracciones H1 y H3. Para la fracción IJ, la complejidad impide una sistemática tan clara como para la fracción anterior, y las comparaciones entre los materiales provenientes de dos hospederos son menos evidentes. En efecto, existe una gran variedad de picos, de los cuales ninguno es particularmente dominante, y que presentan variaciones significativas en abundancia relativa entre distintas muestras, incluso para un mismo hospedero



(datos no mostrados). De esta fracción se resaltan las sub-fracciones IJ3, IJ6, IJ8, IJ9 e IJ10, por ser las más abundantes de esta fracción presentes en el material del hospedero bovino (**Figura 20C**). En el hospedero ovino, las sub-fracciones IJ3, IJ8 e IJ10 también son abundantes, pero los equivalentes de las sub-fracciones IJ6 e IJ9 no están presentes (**Figura 20D**); cabe acotar que en otras muestras bovinas la fracción IJ9 también está ausente (datos no presentados), por lo que es posible que esta sub-fracción sea una particularidad de esta muestra bovina en concreto.

Los componentes de la primera sub-fracción, IJ3, se corresponden con los ya descritos de la sub-fracción H3, con la cual se corresponden en tiempos de retención según análisis hechos para los dos hospederos. La siguiente sub-fracción, IJ4, es en el material de origen bovino una mezcla de 2 glicanos de 7 residuos (IJ4_C, triantenario e IJ4_B, biantenario) y uno de 8 residuos (IJ4_A, triantenario), todos ellos portando una ramificación de HexHexHexNAc sobre el residuo de Hex del *core* (**Tabla 5, Figura 20C**). En el hospedero ovino solo se halló el glicano triantenario de 8 residuos (IJ4_A). Curiosamente, a nivel de la secuencia de hexosas y *N*-acetilhexosaminas, este glicano coincide con el componente elucidado en la sub-fracción H9_A ovina; a nivel de hipótesis, la notoria diferencia en los tiempos de retención de ambas sub-fracciones se deba a diferencias en la posición de sustitución y/o anomeridad de los residuos terminal y sub-terminal del esqueleto principal de hexosas (según exista o no un *cap*), redundando en una distinta capacidad de adsorción a la fase estacionaria.

La sub-fracción IJ5, purificada solo en material bovino, se diferencia de las anteriores y las siguientes por contener un único glicano cuyos 2 residuos de *N*-acetilhexosamina se encuentran sin decorar con HexHex. En cambio, las sub-fracciones IJ6 e IJ7 en el material de origen bovino están compuestas por glicanos que en todos los casos portan ramas decoradas (HexHexHexNAc). Nótese que IJ6_A se corresponde con un homólogo elongado de IJ3_A, mientras uno de los glicanos de la fracción IJ7, IJ7_B corresponde con IJ6_A pero con extremo hexitol en lugar de HexNAc-ol. En el material ovino, las sub-fracciones IJ5 e IJ6 son menos predominantes (**Figura 20D**), por lo que no se analizaron, en tanto que la sub-fracción IJ7 está compuesta un glicano (IJ7_B) de igual secuencia que el presente en la sub-fracción IJ5 en el material bovino (IJ5_A), y su homólogo con extremo reductor hexitol (IJ7_A). La discordancia en los tiempos de retención podría deberse nuevamente a diferencias en posiciones de sustitución y/o anomeridades, las cuales no se ven reflejadas en el espectro de MS².

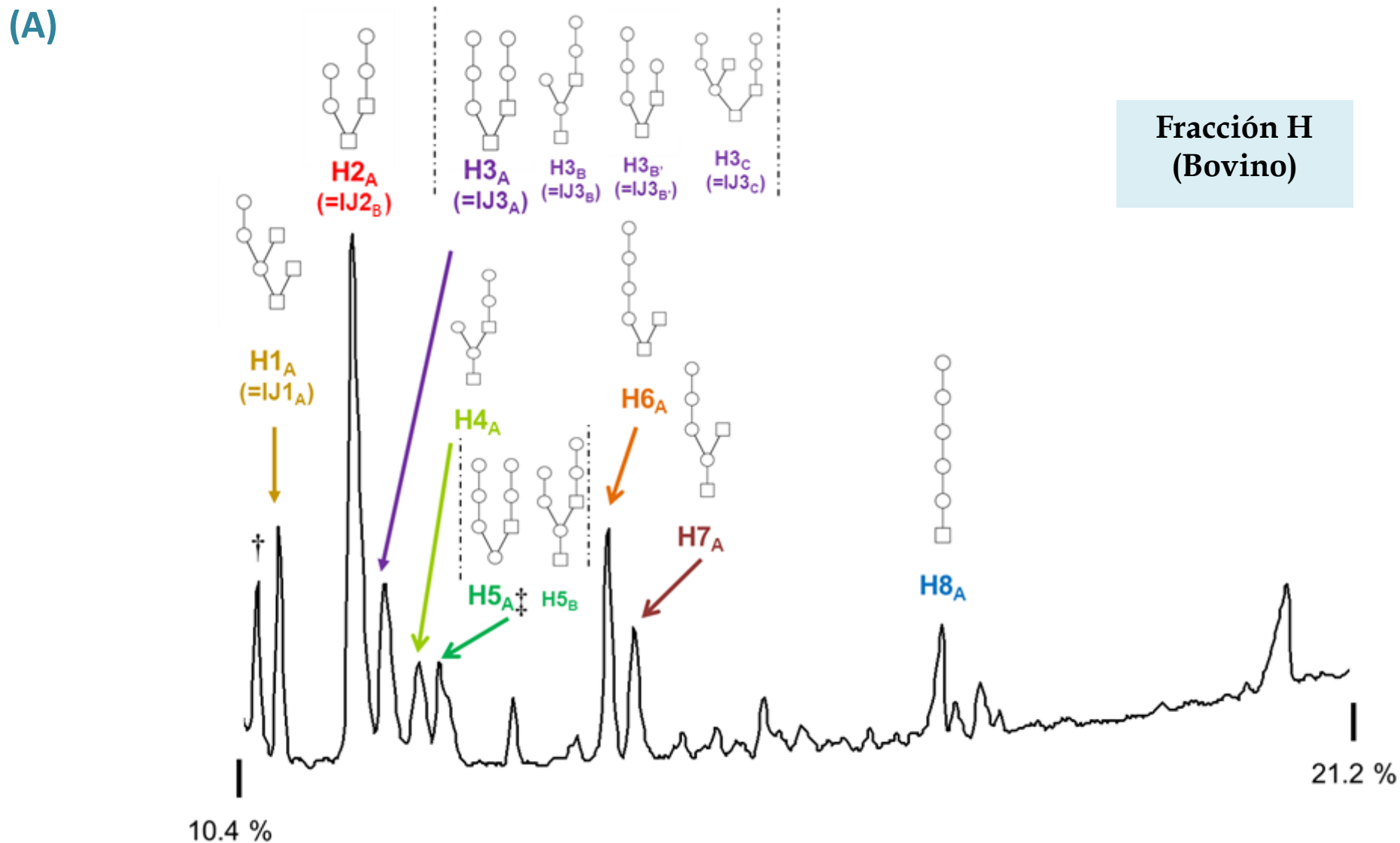


Figura 20: Comparaciones de los cromatogramas de PCG-HPLC de fracciones H e IJ de orígenes bovino y ovino. Ver leyenda al final de la figura (parte D).

(B)

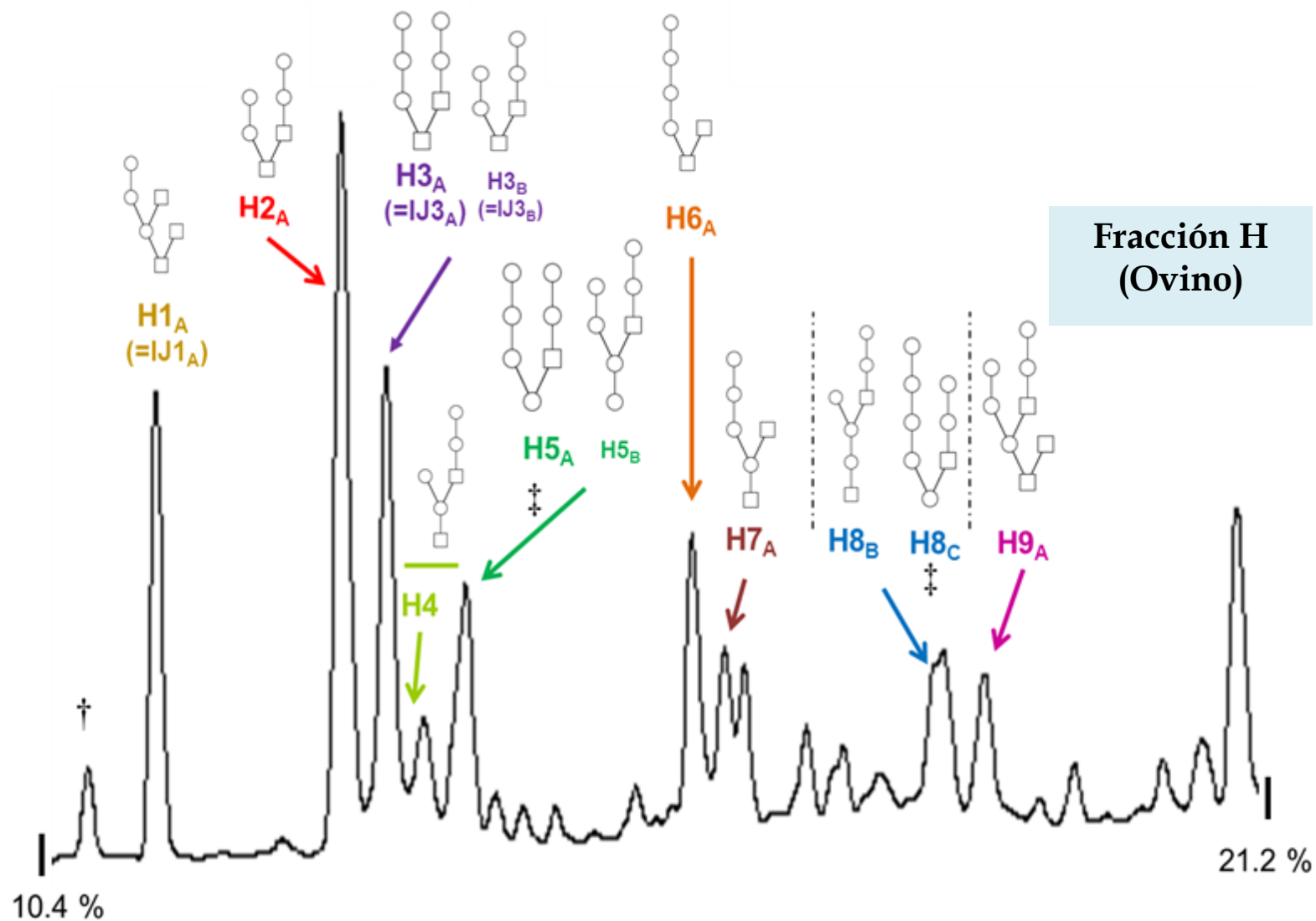


Figura 20: Comparaciones de los cromatogramas de PCG-HPLC de fracciones H e IJ de orígenes bovino y ovino. Ver leyenda al final de la figura (parte D).

(C)

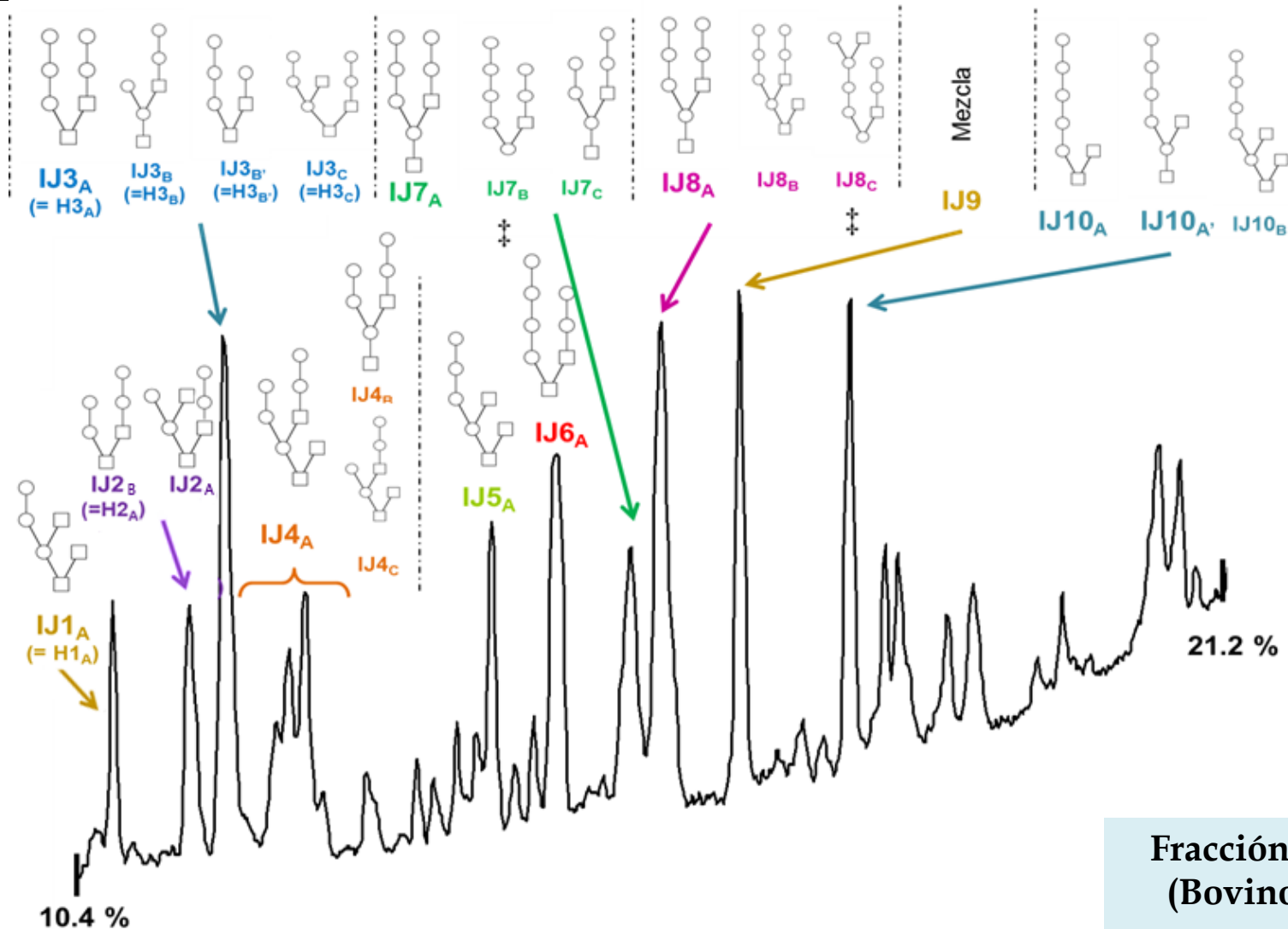


Figura 20: Comparaciones de los cromatogramas de PCG-HPLC de fracciones H e IJ de orígenes bovino y ovino. Ver leyenda al final de la figura (parte D).

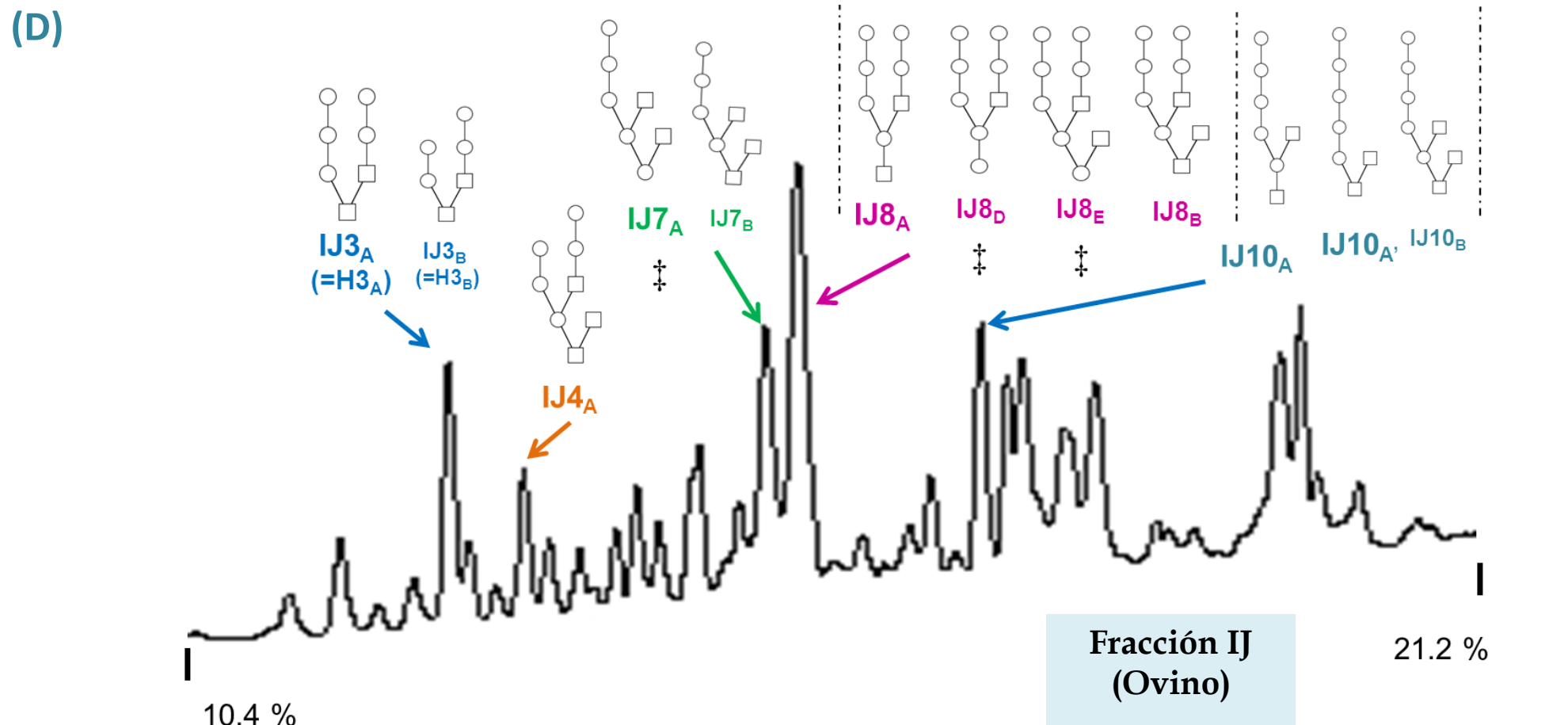


Figura 20: Comparaciones de los cromatogramas de PCG-HPLC de fracciones H e IJ de orígenes bovino y ovino. A cada pico de naturaleza glucídica de muestras de origen bovino (positivo para orcinol-sulfúrico) se le asignó un nombre compuesto por la letra de la fracción y un número correspondiente al orden de elución. Dentro de cada pico, se nombran los distintos componentes detectables por MS¹ con letras correlativas (A, B, C, etc) según el orden de abundancias en el hospedero bovino. Cuando se comprobó igual secuencia por MS² entre hospedero bovino y ovino, se usaron los mismos nombres. Cuando en una sub-fracción el análisis reveló 2 componentes de igual masa molecular se usó "prima" (IJ10_A, IJ10_{A'}). Nótese que las fracciones de origen ovino se purificaron mediante el mismo gradiente de fase móvil, pero utilizando una columna de distinta longitud, por lo que existen diferencias en los tiempos de retención.

†no glucídico, ‡glicanos con extremo hexitol



La primera de las sub-fracciones principales de la fracción IJ, en el material de origen bovino es IJ8, que se encuentra asimismo en el material de origen ovino; esta sub-fracción contiene como componente principal un glicano biantenarico de 8 residuos, IJ8_A, en el que una antena consiste en una ramificación sobre el esqueleto principal cuya secuencia es Hex-Hex-HexNAc ($m/z = 690,3$), el motivo estructural de mayor interés en este trabajo. La sub-fracción, en el material de origen bovino, presenta además otros dos glicanos: un homólogo del producto principal pero basado en *core 2* (IJ8_B), y otro producto (IJ8_C) con extremo reductor hexitol, ramificado con HexHexHexNAc, luego dos residuos Hex sin ramificar y luego un residuo Hex (el sub-terminal) ramificado nuevamente con HexNAc. Esto es anómalo después de analizar todas las estructuras, tanto por poseer un extremo reductor reducido de hexitol como por presentar una ramificación de HexNAc sub-terminal, con dos hexosas sin decorar de por medio. En el material ovino, el glicano principal de esta sub-fracción es idéntico al presente en el material bovino (IJ8_A en ambos casos); los otros tres glicanos encontrados corresponden a un análogo a este producto con extremo hexitol (IJ8_D), y dos productos relacionados a los dos glicanos de la sub-fracción IJ7 ovina, pero con decoración de la ramificación sobre el esqueleto principal (IJ8_B e IJ8_E). De estos glicanos minoritarios de la sub-fracción IJ8, solo IJ8_B se corresponde con un glicano (homónimo) del material bovino.

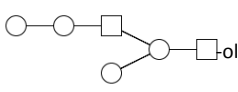
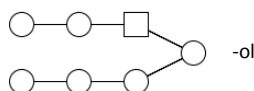
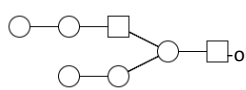
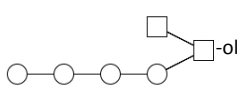
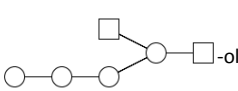
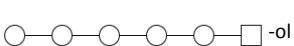
La siguiente sub-fracción, IJ9, solo se encontró en algunas muestras de origen bovino, y el espectro de MS² (**Tabla 4**) de su principal señal de MS¹ presenta dos fragmentos mutuamente incompatibles, lo que sugiere una que se trata de una mezcla de isómeros. Por un lado, se propuso la secuencia de un glicano monoantenarico (lineal), que presentaría un trisacárido Hex-Hex-HexNAc en posición terminal, es decir el equivalente a las ramificaciones observadas en las demás fracciones, pero sobre el último residuo del esqueleto principal de hexosas, lo que es atípico, como se discute más adelante, dentro de las estructuras observadas. El otro componente de la mezcla podría tratarse de un glicano con una ramificación subterminal no decorada, lo cual también se aleja de las tendencias observadas. Estos resultados son consistentes con el análisis de metilación de esta fracción, que presenta señales que sugieren la presencia de más de una



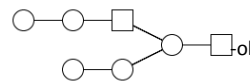
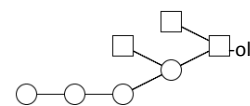
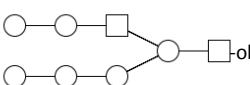
Tabla 4: Análisis por MALDI-TOF-TOF de oligosacáridos alditoles permitilados, provenientes de las fracciones H e IJ de hidátides de origen bovino.

Fracción	m/z	Iones de Fragmentos	Secuencia/Nombre
H1/IJ1	1432,7	282.2 ($B_{1\alpha'}/B_{1\beta}$; 4,1%), 463.2 ($C_{2\alpha'}$; 4,2%), 472.2 ($C_{3\alpha}xZ_{2\alpha'}/B_{3\alpha}xY_{2\alpha'}$; 4,2%), 543.3 ($Z_{1\alpha}$; 20,1%), 561,3 ($Y_{1\alpha}$; 6,9%), 653.3 ($C_{3\alpha}xY_{2\alpha'}$; 13,6%), 894.4 ($B_{3\alpha}$; 4,7%), 912.4 ($C_{3\alpha}$; 100,0%), 1010.5 ($Y_{2\alpha'}$; 10,8%), 1173.5 ($Y_{1\beta}/Y_{2\alpha'}$; 83,4%), 1214.6 ($Y_{3\alpha}$; 5,6%),	H1_A/ IJ1_A
H2/IJ2A	1391,7	227,1 ($B_{2\alpha}xY_{2\alpha}/C_{2\alpha}xZ_{2\alpha}/B_{2\beta}xY_{3\beta}/C_{2\beta}xZ_{3\beta}$; 8,0%), 445,2 ($B_{2\alpha}/B_{2\beta}$; 4,4%), 463,2 ($C_{2\alpha}/C_{2\beta}$; 62,4%), 690,3 ($B_{3\alpha}$; 26,3%), 724,4 ($Y_{1\alpha}$; 59,8%), 951,5 ($Z_{2\alpha}/Z_{1\beta}$; 100,0%), 969,5 ($Y_{2\alpha}/Y_{1\beta}$; 35,8%); 1173,6 ($Y_{3\alpha}/Y_{2\beta}$; 22,9%)	H2_A/ IJ2_A
	1595.8	431.2 ($B_{3\alpha}xY_{3\alpha}/C_{3\alpha}xZ_{3\alpha}$; 6,5%), 463.2 ($C_{2\alpha}/C_{2\beta}$; 11,3%), 667.3 ($C_{3\alpha}$; 100,0%), 690,3 ($B_{3\beta}$; 20,2%), 928.5 ($Y_{1\beta}$; 52,5%), 951.5 ($Z_{1\alpha}$; 91,7%); 969.5 ($Y_{1\alpha}$; 18,1%), 1173.6 ($Y_{2\alpha}/Y_{2\beta}$; 27,7%), 1377.8 ($Y_{3\alpha}$; 15,1%).	H3_A/ IJ3_A
	1391,7	445,2 ($B_{2\alpha}$; 3,0%), 463,2 ($C_{2\alpha}$; 49,8%), 506, 3 ($Y_{2\alpha}xY_{2\beta}$; 3,8%), <u>676,4 ($B_{4\alpha}xY_{3\beta}/C_{4\alpha}xZ_{3\beta}$; 4,0%)</u> , <u>690,3 ($B_{2\alpha}$; 14,0%)</u> , <u>724,4 ($Y_{2\alpha}$; 42,6%)</u> , 951,5 ($Z_{3\alpha}$; 100,0%), 969,5 ($Y_{3\alpha}$; 28,6%), <u>1116,5 (C_4; 13,8%)</u> , 1173 ($Y_{4\alpha}/Y_{2\beta}$; 16,8%)	H3_B/ IJ3_B
H3/IJ3		445,2 ($B_{2\alpha}$; 3,0%), 463,2 ($C_{2\alpha}$; 49,8%), <u>486,2 ($B_{2\beta}$; 4,7%)</u> , 506, 3 ($Y_{2\alpha}xY_{1\beta}$; 3,8%), <u>667,3 ($C_{3\alpha}$; 14,0%)</u> , <u>747,4 ($Z_{1\alpha}$; 7,9%)</u> , <u>928,5 ($Y_{1\beta}$; 19,5%)</u> , 951,5 ($Z_{2\alpha}$; 100,0%), 969,5 ($Y_{2\alpha}$; 28,6%), 1173 ($Y_{3\alpha}/Y_{2\beta}$; 16,8%)	H3_{B'}/ IJ3_{B'}
	1840,9	463,2 ($C_{2\alpha}/C_{2\beta}$; 11,4%), 472,3 ($B_{3\alpha}xY_{2\alpha}/B_{3\beta}xY_{3\beta}/C_{3\alpha}xZ_{2\alpha'}/C_{3\beta}xZ_{3\beta}$; 6,7%), 490,18 ($C_{3\alpha}xY_{2\alpha'}/C_{3\beta}xY_{3\beta}$; 3,9%), 653,4 ($C_{3\alpha}xY_{2\alpha'}$; 18,7%), 690,2 ($B_{3\beta}$; 10,2%), 894,4 ($B_{3\alpha}$; 7,0%), 912,5 ($C_{3\alpha}$; 100,0%), 951,5 ($Z_{1\alpha}$; 61,8%), 969,5 ($Y_{1\alpha}$; 14,9%), 1173,7 ($Y_{1\beta}$; 39,7%), 1418,7 ($Y_{2\alpha'}/Y_{2\beta}$; 17,7%), 1581,8 ($Y_{2\alpha'}$; 54,9%), 1622,9 ($Y_{3\alpha'}/Y_{3\beta}$)	H3_C/ IJ3_C



H4	1391,7	268,2 ($B_{3\alpha} \times Y_{3\alpha} / C_{3\alpha} \times Z_{3\alpha}$; 3,5%), 298,2 (Z_1 ; 5,4%), 316,2 (Y_1 ; 3,0%), 431,1 ($B_4 \times Y_{2\alpha} / C_4 \times Z_{2\alpha}$; 4,0%), 449,2 ($C_4 \times Y_{2\alpha}$; 27,3%), 463,2 ($C_{2\alpha}$; 9,1%); 506,2 ($Y_{2\alpha} \times Y_{2\beta}$; 5,6%) 690,3 ($B_{3\alpha}$; 30,3%), 724,3 ($Y_{2\alpha}$; 100,0%), 880,5 ($B_4 \times Y_{4\alpha} / C_4 \times Z_{4\alpha} / B_4 \times Y_{2\beta} / C_4 \times Z_{2\beta}$; 8,7%); 951,5 ($Z_{3\alpha}$; 4,18%), 969,5 ($Y_{3\alpha}$; 15,8%), 1098,5 (B_4 ; 7,8%), 1116,6 (C_4 ; 91,2%), 1173,6 ($Y_{4\alpha} / Y_{2\beta}$; 15,6%)		H4_A
	1595,8	415,2 (6,3%), 431,2 (5,8%), 449,2 (5,4%), 463,3 (10,0%), 472,3 (3,8%), 506,3 (3,0%), 667,3 (100,0%), 690,3 (23,7%), 928,5 (67,0%), 951,5 (72,3%), 969,5 (15,4%), 1132,6 (6,4%), 1173,7 (22,8%), 1336,8 (19,6%), 1377 (12,2%)	Mezcla compleja	H4_B
H5	1554,8	431,1 ($B_{3\alpha} \times Y_{3\alpha} / C_{3\alpha} \times Z_{3\alpha}$; 6,2%), 445,2 ($B_{2\alpha} / B_{2\beta}$; 3,71%), 463,2 ($C_{2\alpha} / C_{2\beta}$; 11,4%), 465,2 ($Y_{2\alpha} \times Y_{1\beta}$; 14,0%), 649,3 ($B_{3\alpha}$; 6,2%), 690,3 ($B_{3\beta}$; 17,2%), 887,4 ($Y_{1\beta}$; 100,0%), 928,4 ($Y_{1\alpha}$; 24,3%), 1132,6 ($Y_{2\alpha} / Y_{2\beta}$; 49,3%), 1336,7 ($Y_{3\alpha} / Y_{3\beta}$; 17,9%)		H5_A
	1595,8	445,3 ($B_{2\alpha} / B_{2\beta}$; 4,1%), 463,2 ($C_{2\alpha} / C_{2\beta}$; 9,4%), 506,2 ($Y_{2\alpha} \times Y_{2\beta}$; 6,5%), 653,2 ($C_4 \times Y_{2\alpha}$; 25,8%), 690,3 ($B_{3\alpha}$; 24,9%), 710,4 ($Y_{2\alpha} \times Y_{3\beta}$; 4,0%), 880,4 ($C_4 \times Z_{3\alpha} / B_4 \times Y_{3\alpha} / C_4 \times Z_{2\beta} / B_4 \times Y_{2\beta}$; 4,6%), 898,4 ($C_4 \times Y_{3\alpha} / C_4 \times Y_{2\beta}$; 4,4%), 928,4 ($Y_{2\alpha}$; 100,0%), 1173,6 ($Y_{3\alpha} / Y_{2\beta}$; 22,3%), 1302,7 (B_4 ; 4,3%), 1320,7 (C_4 ; 72,6%), 1377,7 ($Y_{4\alpha} / Y_{3\beta}$; 8,1%)		H5_B
H6	1391,7	284,1 ($Y_{1\alpha} \times Z_{1\beta} / Z_{1\alpha} \times Y_{1\beta}$; 5,8%), 302,2 ($Y_{1\alpha} \times Y_{1\beta}$; 3,7%), 449,3 ($C_{3\alpha} \times Y_{4\alpha} / C_{4\alpha} \times Y_{3\alpha}$; 6,9%), 463,2 ($C_{2\alpha}$; 10,0%), 543,2 ($Z_{1\alpha}$; 37,4%), 561,2 ($Y_{1\alpha}$; 9,1%), 765,4 ($Y_{2\alpha}$; 17,2%), 853,4 ($B_{4\alpha}$; 4,9%), 871,4 ($C_{4\alpha}$; 100,0%), 951,4 ($Z_{3\alpha}$; 13,7%), 969,6 ($Y_{3\alpha}$; 9,4%), 1132,6 ($Y_{1\beta}$; 28,8%),		H6_A
H7	1391,7	282,3 ($B_{1\beta}$; 5,0%); 298,3 (Z_1 ; 6,8%), 431,3 ($C_{3\alpha} \times Z_{4\alpha} / B_{3\alpha} \times Y_{4\alpha}$; 17,7%), 463,3 ($C_{2\alpha}$; 6,7%), 506,4 ($Y_{2\alpha} \times Y_{2\beta}$; 6,6%); 667,4 ($C_{3\alpha}$; 7,9%), 765,4 ($Y_{2\alpha}$; 21,6 %), 1116,5 (C_4 ; 100%); 1132,4 ($Y_{2\beta}$; 73,0%)		H7_A
H8	1350,7	298,2 (Z_1 ; 7,9%), 316,2 (Y_1 ; 8,5%), 431,2 ($B_3 \times Y_5 / B_4 \times Y_4 / B_5 \times Y_3 / C_3 \times Z_5 / C_4 \times Z_4 / C_5 \times Z_3$; 7,8%), 449,2 ($C_3 \times Y_5 / C_4 \times Y_4 / C_5 \times Y_3$; 9,2%), 520,3 (Y_2 ; 31,6%), 724,4 (Y_3 ; 21,2%), 1075,5 (C_5 ; 100,0%)		H8_A



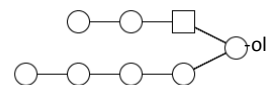
IJ2	1636,8	449,2 ($C_{2\beta} \times Y_{2\beta''}$; 18,6%), 463,3 ($C_{2\alpha}$; 5,5%), 472,3 ($C_{3\alpha} \times Z_{3\alpha} / B_{3\alpha} \times Y_{3\alpha} / C_{2\beta} \times Z_{2\beta} / B_{2\beta} \times Y_{2\beta}$; 6,3%), 690,3 ($B_{3\alpha} / B_{3\beta}$; 16,3%), 708,3 ($C_{3\alpha} / C_{2\beta}$; 100,0%), 951,5 ($Z_{1\alpha} / Z_{1\beta}$; 64,7%), 969,5 ($Y_{1\alpha} / Y_{1\beta}$; 57,4%), 1214,7 ($Y_{2\alpha}$; 7,3%), 1377,8 ($Y_{2\beta''}$; 46,4%), 1418,8 ($Y_{3\alpha} / Y_{2\beta}$; 13,0%)	 IJ2 _B
		463,2 ($C_{2\alpha'} / C_{2\alpha''}$; 7,0%), 543,3 ($Z_{1\alpha}$; 13,1%), 561,3 ($Y_{1\alpha}$; 5,2%), 653,3 ($C_{4\alpha} \times Y_{2\alpha'} / C_{4\alpha} \times Y_{3\alpha}$; 20,6%), 690,3 ($B_{3\alpha}$; 13,0%), 751,5 ($Y_{2\alpha} \times Y_{2\alpha''}$; 4,8%), 880,4 ($C_{4\alpha} \times Z_{2\alpha'} / B_{4\alpha} \times Y_{2\alpha'} / C_{4\alpha} \times Z_{3\alpha'} / B_{4\alpha} \times Y_{3\alpha}$; 5,7%), 1173,6 ($Y_{2\alpha}$; 78,0%), 1302,6 ($B_{4\alpha}$; 7,1%), 1320,6 ($C_{4\alpha}$; 100,0%), 1418,7 ($Y_{3\alpha'} / Y_{2\alpha''}$; 16,3%), 1581,8 ($Y_{1\beta}$; 20,4%), 1622,8 ($Y_{4\alpha'} / Y_{3\alpha''}$; 9,2%)	
IJ4	1595,8 (=H5)	463,2 ($C_{2\alpha} / C_{2\beta}$; 8,9%), 506,2 ($Y_{2\alpha} \times Y_{2\beta}$; 8,2%), 653,3 ($C_{4\alpha} \times Y_{2\alpha}$; 25,2%), 690,4 ($B_{3\alpha}$; 22,7%), 928,4 ($Y_{2\alpha}$; 98,5%), 1173,7 ($Y_{3\alpha} / Y_{2\beta}$; 26,8%), 1320,7 (C_4 ; 100,0%), 1377,8 ($Y_{4\alpha} / Y_{3\beta}$; 8,6%)	 IJ4 _B
		449,1 ($C_{4\alpha} \times Y_{3\alpha}$; 8,6%), 543,3 ($Z_{1\alpha}$; 20,0%), 561,3 ($Y_{1\alpha}$; 7,5%), 690,3 ($B_{3\alpha}$; 18,4%), 710,3 ($Y_{2\alpha} \times Y_{1\beta}$; 3,9%), 969,5 ($Y_{2\alpha}$; 84,7%), 1116,5 ($C_{4\alpha}$; 100,0%), 1214,6 ($Y_{3\alpha}$; 9,8%), 1377,7 ($Y_{1\beta}$; 30,1%), 1418,6 ($Y_{4\alpha'} / Y_{2\alpha''}$; 9,5%)	
IJ5	1636,8	431,2 ($B_{3\alpha} \times Y_{4\alpha} / C_{3\alpha} \times Z_{4\alpha}$; 5,6%), 543,3 ($Z_{1\alpha}$; 19,4%), 561,3 ($Y_{1\alpha}$; 5,2%), 667,3 ($C_{3\alpha}$; 4,4%), 857,5 ($C_{4\alpha} \times Y_{2\alpha''}$; 7,2%), 1010,5 ($Y_{2\alpha}$; 10,0%), 1098,6 ($B_{4\alpha}$; 5,0%), 1116,5 ($C_{4\alpha}$; 100,0%), 1214,6 ($Y_{3\alpha}$; 5,1%), 1377,7 ($Y_{2\alpha'} / Y_{1\beta}$; 50,9%)	 IJ5 _A
		431,1 ($B_{3\alpha} \times Y_{4\alpha} / C_{3\alpha} \times Z_{4\alpha} / B_{4\alpha} \times Y_{3\alpha} / B_{4\alpha} \times Y_{3\alpha}$; 11,5%); 463,3 ($C_{2\alpha} / C_{2\beta}$; 13,2%), 690,3 ($B_{3\beta}$; 30,8%), 871,4 ($C_{4\alpha}$; 100,0%), 951,5 ($Z_{1\alpha}$; 96,9 %), 969,5 ($Y_{1\alpha}$; 18,4 %), 1132,5 ($Y_{1\beta}$; 19,0 %), 1377,8 ($Y_{3\alpha} / Y_{2\beta}$; 26,8 %), 1581,8 ($Y_{4\alpha} / Y_{3\beta}$; 13,6%)	
IJ6	1799,9	690,4 ($B_{3\beta}$; 36,3%), 896,5 ($Y_{4\alpha} \times Z_{2\beta} / Z_{4\alpha} \times Y_{2\beta}$; 5,6%), 1132,7 ($Y_{2\beta}$; 60,8%), 1173,5 ($Y_{2\alpha}$; 10,4%), 1524,8 (C_4 ; 100,0%)	 IJ6 _A
IJ7	1799,9		



IJ7_A

1758,8

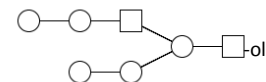
463,2 ($C_{2\alpha}/C_{2\beta}$; 6,5%), 690,4 ($B_{3\beta}$; 15,1%), 853,3 ($B_{4\alpha}$; 5,3%), 928,5 ($Y_{1\alpha}$; 20,7%), 1091,5 ($Y_{1\beta}$; 100,0%), 1132,5 ($Y_{2\alpha}$; 39,2%), 1336,5 ($Y_{3\alpha}/Y_{2\beta}$; 26,9%), 1540,7 ($Y_{4\alpha}/Y_{3\beta}$; 11,7%),



IJ7_B

1595,8

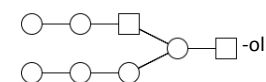
463,1 ($C_{2\alpha}/C_{2\beta}$; 8,9%), 653,2 ($C_4 \times Y_{2\alpha}$; 16,6%), 690,3 ($B_{3\alpha}$; 39,8%), 898,3 ($C_4 \times Y_{3\alpha}/C_4 \times Y_{2\beta}$; 10,5%), 928,5 ($Y_{2\alpha}$; 100,0%), 1102,5 ($C_4 \times Y_{4\alpha}/C_4 \times Y_{3\beta}$; 7,4%), 1173,5 ($Y_{3\alpha}/Y_{2\beta}$; 35,5%), 1377,7 ($Y_{4\alpha}/Y_{3\beta}$; 12,2%)



IJ7_C

1799.9

298.3 (Z_1 ; 6.7%), 431.2 ($B_{3\alpha} \times Y_{4\alpha}/C_{3\alpha} \times Z_{4\alpha}$; 11.8%), 463.2 ($C_{2\alpha}/C_{2\beta}$; 9.6%), 472.2 ($B_{3\beta} \times Y_{4\beta}/C_{3\beta} \times Z_{4\beta}$; 7.0%), 506.3 ($Y_{2\alpha} \times Y_{2\beta}$; 10.1%), 690.3 ($B_{3\beta}$; 24.5%), 857.4 ($C_4 \times Y_{2\beta}$; 21.0%), 898.4 ($C_4 \times Y_{2\alpha}$; 7.0%), 1102.6 ($C_4 \times Y_{3\alpha}/C_4 \times Y_{3\beta}$; 9.1%), 1132.6 ($Y_{2\beta}$; 100.0%), 1173.6 ($Y_{2\alpha}$; 16.2%), 1377.8 ($Y_{3\alpha}/Y_{3\beta}$; 21.3%), 1524.8 (C_4 ; 95.21)

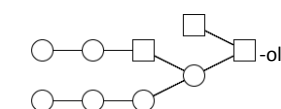


IJ8_A

IJ8

2045,0

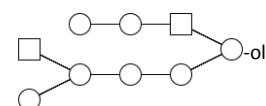
431,2 ($B_{3\alpha} \times Y_{4\alpha'}/C_{3\alpha} \times Z_{4\alpha'}$; 7,1%), 463,2 ($C_{2\alpha'}/C_{2\alpha''}$; 6,9%), 543,3 ($Z_{1\alpha}$; 17,8%), 561,2 ($Y_{1\alpha}$; 8,6%), 690,3 ($B_{3\alpha''}$; 14,3%), 751,3 ($Y_{2\alpha'} \times Y_{2\alpha''}$; 7,2%), 857,4 ($C_{4\alpha} \times Y_{2\alpha''}$; 19,1%), 1118,5 ($Y_{1\beta} \times Y_{2\alpha''}$; 5,2%), 1377,7 ($Y_{2\alpha''}$; 76,5%), 1418,7 ($Y_{2\alpha}$; 12,4%), 1524,8 ($C_{4\alpha}$; 100,0%), 1622,8 ($Y_{3\alpha'}/Y_{3\alpha''}$; 14,1%), 1786,0 ($Y_{1\beta}$; 27,8%), 1826,9 ($Y_{4\alpha'}/Y_{4\alpha''}$; 7,4%)



IJ8_B

2004,0

463,2 ($C_{2\beta}$; 6,5%), 669,4 ($Y_{1\beta} \times Y_{3\alpha}$; 8,8%), 690,3 ($B_{2\alpha}/B_{3\beta}$; 16,2%), 710,4 ($Y_{2\alpha} \times Y_{2\beta}/Y_{1\alpha} \times Y_{3\beta}$; 6,7%), 914,4 ($Y_{3\alpha} \times Y_{2\beta}/Y_{2\alpha} \times Y_{3\beta}$; 6,3%), 928,4 ($Y_{1\alpha}$; 5,0%); 1132,6 ($Y_{2\alpha}$; 16,7%), 1336,6 ($Y_{1\beta}/Y_{3\alpha}$; 100,0%), 1581,8 ($Y_{2\beta}$; 21,6%), 1786,0 ($Y_{3\beta}/Y_{4\alpha'}$; 7,6%)

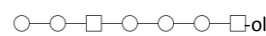


IJ8_C

IJ9

1595,8

298,1 (Z_1 ; 7,8%), 431,2 ($B_5 \times Y_4/B_6 \times Y_3/C_5 \times Z_4/C_6 \times Z_3$; 7,4%), 449,1 ($C_6 \times Y_3/C_5 \times Y_4$; 9,4%), 463,2 (C_2 ; 6,9%), 520,2 (Y_2 ; 33,8%), 653,2 ($C_6 \times Y_4$; 33,5%), 690,3 (B_3 ; 42,7%), 724,4 (Y_3 ; 16,7%), 894,4 (B_4 ; 3,7%), 928,4 (Y_4 ; 100,0%), 1320,7 (C_6 ; 60,1%)



IJ9_A



	298,1 (Z_1 ; 7,8%), 431,2 ($B_2 \times Y_{5\beta}/B_4 \times Y_4/B_5 \times Y_3/C_2 \times Z_{5\beta}/C_4 \times Z_4/C_5 \times Z_3$; 7,4%), 449,1 ($C_2 \times Y_{5\beta}/C_4 \times Y_4/C_5 \times Y_3$; 9,4%), 520,2 (Y_2 ; 33,8%), 653,2 ($C_3 \times Y_{5\beta}/C_5 \times Y_4$; 33,5%), 690,3 (B_2 ; 42,7%), 724,4 (Y_3 ; 16,7%), 894,4 (B_3 ; 3,7%), 928,4 (Y_4 ; 100,0%), 1320,7 (C_5 ; 60,1%), <u>1336,7 ($Y_{5\beta}$; 7,3%)</u>		IJ9 _{A'}
	300.0 ($C_{1\beta}$; 4.4%), 431.2 ($B_{3\alpha} \times Y_{5\alpha}/C_{3\alpha} \times Z_{5\alpha}/B_{4\alpha} \times Y_{4\alpha}/C_{4\alpha} \times Z_{4\alpha}/B_{5\alpha} \times Y_{3\alpha}/C_{5\alpha} \times Z_{3\alpha}$; 10.9%), 470.1 ($Z_{2\alpha} \times Z_{1\beta}$; 4.1%), 506.3 ($Y_{2\alpha} \times Y_{1\beta}$; 6.3%), <u>543.3 ($Z_{1\alpha}$; 17.4%)</u> , <u>561.4 ($Y_{1\alpha}$; 6.1%)</u> , 765.4 ($Y_{2\alpha}$; 31.3%), 871.3 ($C_{4\alpha}$; 5.5%), 969.4 ($Y_{3\alpha}$; 24.9%), <u>1057.4 ($B_{5\alpha}$; 6.3%)</u> , <u>1075.5 ($C_{5\alpha}$; 59.9%)</u> , 1173.7 ($Y_{4\alpha}$; 10.2%), 1336.6 ($Y_{1\beta}$; 65.7%); 1377.6 ($Y_{5\alpha}$; 10.0%)		IJ10 _A
IJ10	1595.8 300.0 ($C_{1\beta}$; 4.4%), <u>316.1 (Y_1; 4.1%)</u> , 431.2 ($B_{3\alpha} \times Y_{5\alpha}/C_{3\alpha} \times Z_{5\alpha}/B_{4\alpha} \times Y_{4\alpha}/C_{4\alpha} \times Z_{4\alpha}$; 10.9%), 470.1 ($Z_{2\alpha} \times Z_{2\beta}$; 4.1%), 506.3 ($Y_{2\alpha} \times Y_{2\beta}$; 6.3%), <u>694.2 ($C_5 \times Y_{3\alpha}$; 5.1%)</u> , 765.4 ($Y_{2\alpha}$; 31.3%), 871.3 ($C_{4\alpha}$; 5.5%), 969.4 ($Y_{3\alpha}$; 24.9%), <u>1061.4 ($C_5 \times Y_{2\beta}$; 14.6%)</u> , 1173.7 ($Y_{4\alpha}$; 10.2%), <u>1320.6 (C_5; 100.0%)</u> , 1336.6 ($Y_{2\beta}$; 65.7%), 1377.6 ($Y_{5\alpha}$; 10.0%)		IJ10 _{A'}
	1840,9 543,2 ($Z_{1\alpha}$; 19,0%), 1010,5 ($Y_{2\alpha}$; 24,7%), 1214,5 ($Y_{3\alpha}$; 17,4%), 1320,5 ($C_{5\alpha}$; 100,0%), 1581,6 ($Y_{1\beta}/Y_{2\alpha''}$; 57,6%)		IJ10 _B

Se combinaron las sub-fracciones H1 e IJ1, obtenidas por PCG-HPLC a partir de fracciones contiguas de *gel-filtración*, y consideradas idénticas por sus tiempos de retención en HPLC. Las sub-fracciones IJ3 y H3 se analizaron independientemente, pero se presentan juntas porque el análisis reveló que están compuestas por los mismos glicanos. Los valores de m/z corresponden a aductos de Na^+ en todos los casos. Los valores listados son experimentales y corresponden a los valores esperados dentro del rango de $\pm 0,1$ Da del ión pseudomolecular, y $\pm 0,3$ Da para los fragmentos asignados. Se indican entre paréntesis las intensidades como porcentajes de la del pico base (señal más intensa). Los iones de fragmentos listados corresponden a señales $> 3\%$ de intensidad relativa al pico base y cuya relación señal/ruido es > 10 . La nomenclatura de los fragmentos es la comentada en la [Figura 19](#) y la nomenclatura de los glicanos es la descrita en la [Figura 20](#). Para H3_B, IJ9_A e IJ10_A, se encontraron fragmentos correspondientes a dos estructuras de igual masa molecular (H3_B y H3_{B'}, IJ9_A e IJ9_{A'} e IJ10_A e IJ10_{A'}); se indican en [subrayado](#) aquellos fragmentos que son mutuamente excluyentes, es decir que no pueden corresponder a una estructura única. En estos casos se presentan las dos secuencias más probables que contemplen los fragmentos no compartidos. Las secuencias mostradas en la última columna corresponden a los datos del análisis de MS² exclusivamente.



estructura (ver más adelante, la [Tabla 6](#)). El hecho que las secuencias presenta motivos estructurales distintos a todas las demás, descritas sumado al hecho que esta sub-fracción solo se encontró en esta muestra bovina, pone en duda su relevancia biológica. También existe la posibilidad, al tratarse de una mezcla, que los fragmentos observados puedan deberse a otra combinación de fragmentos de otros dos o más glicanos, lo que dificulta concluir con certeza cuáles son los componentes de esta sub-fracción.

Finalmente, la última sub-fracción estudiada se denominó IJ10, y está presente en ambos hospederos y con idéntica composición. Tuvo como componentes principales a dos estructuras biantenarias de 7 residuos (IJ10_A e IJ10_{A'}) de igual masa molecular, ambas con un esqueleto principal de 6 residuos de hexosa y el extremo de HexNAc-ol, más un residuo de HexNAc, presente este en un caso como parte del *core* 2 (IJ10_A) y en otro como ramificación sobre el primer residuo de hexosa (IJ10_{A'}). La mayoría de las señales de MS² asignadas para esta fracción pueden derivar tanto de una como de otra estructura, pero se hallaron además fragmentos característicos de cada una de las moléculas, lo que indica que la fracción está genuinamente compuesta por dos isómeros de posición que no se resuelven bajo las condiciones cromatográficas utilizadas. Estos resultados están respaldados además por el análisis de metilación y los espectros de NMR realizados sobre la fracción (como se discute en detalle más adelante). Adicionalmente, se halló un glicano de ocho residuos (IJ10_B), cuyo esqueleto principal es igual al de los otros dos, y que presenta las 2 posiciones más internas (HexNAc y Hex del *core*) decoradas con residuos de HexNAc.

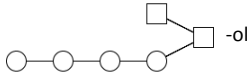
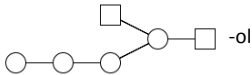
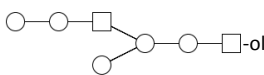
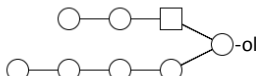
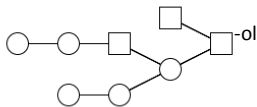
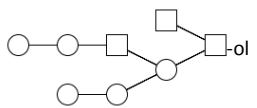
Como se observa en los resultados antedichos ([Figura 20](#)), los tiempos de retención por PCG-HPLC no dependen directamente del número de residuos, sino de la conformación global del glicano, lo que incluye el largo de cadena y la disposición espacial relativa de los residuos, ya que la interacción con la fase estacionaria es un fenómeno de superficie. En términos generales, los glicanos con mayor número de residuos suelen tener mayor tiempo de retención; y para un mismo número de residuos, los glicanos lineales (con mayor largo de la cadena principal) se retienen más que los glicanos ramificados. A veces esta tendencia empírica se revierte, posiblemente por diferencias en las posiciones de sustitución y anomeriedades de los residuos (presumiblemente sobre residuos no reductores terminales y subterminales, dadas las posibilidades verificadas en el trabajo antecedente [70] que la cadena principal termine en Galp(β1-3) o en Galp(α1-4)).



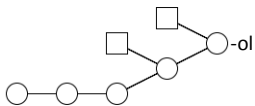
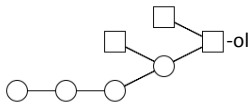
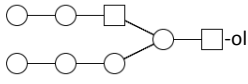
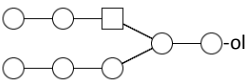
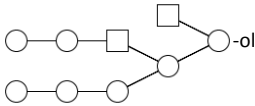
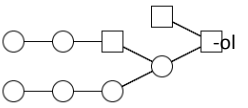
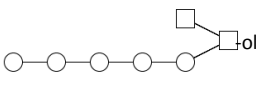
Tabla 5: Análisis por MALDI-TOF-TOF de oligosacáridos alditos permitilados, provenientes de de las fracciones H e IJ de hidátides de origen ovino

Fracción	m/z	Iones de Fragmentos	Estructura/Nombre
H1	1432,8	282,1 ($B_{1\alpha''}/B_{1\beta}$; 3,0%), 463,2 ($C_{2\alpha}$; 3,1%), 472,2 ($C_{3\alpha} \times Z_{2\alpha'}/B_{3\alpha} \times Y_{2\alpha'}$; 3,5%), 490,1 ($C_{3\alpha} \times Y_{2\alpha'}$; 3,0%), 543,3 ($Z_{1\alpha}$; 20,2%), 561,3 ($Y_{1\alpha}$; 7,5%), 653,3 ($C_{3\alpha} \times Y_{2\alpha''}$; 16,3%), 894,5 ($B_{3\alpha}$; 5,3%), 912,4 ($C_{3\alpha}$; 100,0%), 1010,6 ($Y_{2\alpha'}$; 12,1%), 1173,6 ($Y_{1\beta}/Y_{2\alpha''}$; 71,5%), 1214,6 ($Y_{3\alpha}$; 5,5%)	 H1A
H2	1391,7	445,2 ($B_{2\alpha}/B_{2\beta}$; 3,4%), 463,1 ($C_{2\alpha}/C_{2\beta}$; 56,5%), 690,2 ($B_{3\alpha}$; 24,9%), 724,3 ($Y_{1\alpha}$; 57,9%), 951,4 ($Z_{2\alpha}/Z_{1\beta}$; 100,0%), 969,4 ($Y_{2\alpha}/Y_{1\beta}$; 32,7%); 1173,5 ($Y_{3\alpha}/Y_{2\beta}$; 17,2%)	 H2A
H3/IJ3	1595,8	431,3 ($B_{3\alpha} \times Y_{3\alpha}/C_{3\alpha} \times Z_{3\alpha}$; 3,2%), 463,3 ($C_{2\alpha}/C_{2\beta}$; 12,5%), 667,3 ($C_{3\alpha}$; 91,3%), 690,3 ($B_{3\alpha}$; 16,9%), 928,5 ($Y_{1\beta}$; 41,2%), 937,5 ($Y_{3\alpha} \times Z_{2\beta}/Z_{3\alpha} \times Y_{2\beta}/Y_{2\alpha} \times Z_{3\beta}/Z_{2\alpha} \times Y_{3\beta}$; 3,9%), 951,4 ($Z_{1\alpha}$; 100,0%); 969,5 ($Y_{1\alpha}$; 8,3%), 1141,6 ($Y_{3\alpha} \times Z_{3\beta}/Z_{3\alpha} \times Y_{3\beta}$; 5,7%), 1173,6 ($Y_{2\alpha}/Y_{2\beta}$; 17,9%), 1377,8 ($Y_{3\alpha}$; 5,6%),	 H3A
	1391,7	463,2 ($C_{2\alpha}/C_{2\beta}$; 56,4%), 690,3 ($B_{3\alpha}$; 24,8%), 724,3 ($Y_{1\alpha}$; 57,8%), 951,5 ($Z_{2\alpha}/Z_{1\beta}$; 100,0%), 969,5 ($Y_{2\alpha}/Y_{1\beta}$; 32,8%); 1173,6 ($Y_{3\alpha}/Y_{2\beta}$; 17,3%)	 H3B
H4	1391,7	431,2 ($B_{4\alpha} \times Y_{2\alpha}/C_{4\alpha} \times Z_{2\alpha}$; 3,4%), 449,2 ($C_{4\alpha} \times Y_{2\alpha}$; 13,1%), 463,2 ($C_{2\alpha}$; 3,0%); 690,3 ($B_{3\alpha}$; 19,5%), 724,4 ($Y_{2\alpha}$; 100,0%), 969,5 ($Y_{3\alpha}$; 12,3%), 1098,5 (B_4 ; 6,7%), 1116,6 (C_4 ; 92,6%), 1173, 7 ($Y_{4\alpha}/Y_{2\beta}$; 11,5%)	 H4A
H5	1554,7	<u>431,1 ($B_{3\alpha} \times Y_{3\alpha}/C_{3\alpha} \times Z_{3\alpha}$; 15,2%)</u> , 463,3 ($C_{2\alpha}/C_{2\beta}$; 14,5%), 690,3 ($B_{3\beta}$; 54,0%), 887,5 ($Y_{1\beta}$; 19,6%), 914,4 ($Y_{3\alpha} \times Y_{2\beta}/Y_{2\alpha} \times Y_{3\beta}$; 59,2%), 928,5 ($Y_{1\beta}/Y_{2\alpha}$; 23,2%)	 H5A
		463,3 ($C_{2\alpha}/C_{2\beta}$; 14,5%), <u>653,2 ($C_4 \times Y_{2\alpha}$; 43,1%)</u> , 690,3 ($B_{3\alpha}$; 54,0%), 887,5 ($Y_{2\alpha}$; 19,6%), 914,4 ($Y_{3\alpha} \times Y_{3\beta}/Y_{4\alpha} \times Y_{2\beta}$; 59,2%), <u>1320,6 (C_4; 100,0%)</u>	 H5A'
	1595,8	463,1 (18%), 653,2 (31,9%), 690,3 (26,7%), 928,5(100,0%), 1116,5 (52,8%), 1336,7 (37,3%)	Hex ₅ HexNAcHexNAc-ol O Hex ₄ HexNAc ₂ Hex-ol (Mezcla compleja)



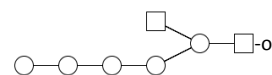
1636,8		No determinado	Hex ₅ HexNAc ₂ -ol	H5 _C
H6	1391,8	302,2 (Y _{1α} X _{Y_{1β}} ; 3,1%), 431,2 (B _{3α} X _{Y_{4α}} /C _{3α} X _{Z_{4α}} /B _{4α} X _{Y_{3α}} /C _{4α} X _{Z_{3α}} ; 5,2%), 543,2 (Z _{1α} ; 28,7%), 561,2 (Y _{1α} ; 6,7%), 765,4 (Y _{2α} ; 17,5%), 853,4 (B _{4α} ; 5,4%), 871,4 (C _{4α} ; 100,0%), 951,5 (Z _{3α} ; 3,4%), 969,6 (Y _{3α} ; 7,2%), 1132,6 (Y _{1β} ; 25,4%),		H6 _A
	1391,8	298,1 (Z ₁ ; 3,2%), 431,1 (C _{3α} X _{Z_{4α}} /B _{3α} X _{Y_{4α}} ; 10.3%), 463,3 (C _{2α} ; 3,9%), 490,1 (C ₄ X _{Y_{2α}} ; 3,3%), 506,1 (Y _{2α} X _{Y_{2β}} ; 5,6%); 649,3 (B _{3α} ; 3,1%), 667,1 (C _{3α} ; 4,3%), 694,2 (C ₄ X _{Y_{3α}} ; 4,4%), 765,2 (Y _{2α} ; 23,7%), 857,3 (C ₄ X _{Y_{1β}} ; 17,7%), 969,6 (Y _{3α} ; 11,5%), 1098,4 (B ₄ ; 6,0%), 1116,4 (C ₄ ; 100,0%), 1132,4 (Y _{2β} ; 74,5%), 1173, 4 (Y _{4α} ; 5,3%),		H7 _A
H8	1595,7	445,1 (B _{2α} ; 5,3%), 463,2 (C _{2α} ; 5,9%), 635,3 (B ₅ X _{Y_{3α}} /C ₅ X _{Z_{3α}} ; 5,0%), 653,2 (C ₅ X _{Y_{3α}} ; 5,0%), 690,3 (B _{3α} ; 20,5%), 928,4 (Y _{3α} ; 100,0%), 1173,6 (Y _{4α} ; 23,8%), 1320,6 (C ₅ ; 83,1%), 1377,8 (Y _{5α} /Y _{3β} ; 6,5%),		H8 _B
	1758,8	465,2 (Y _{2α} X _{Y_{1β}} ; 10,8%); 690,3 (B _{3β} ; 22,5%), 853,3 (B _{4α} ; 8,4%); 928,4 (Y _{1α} ; 29,0%), 1091,5 (Y _{1β} ; 100,0%); 1132,5 (Y _{2α} ; 51,7%), 1336,7 (Y _{3α} /Y _{2β} ; 28,1%), 1540,9 (Y _{4α} /Y _{3β} ; 11,3%)		H8 _C
H9	1840,9	463,1 (C _{2α'} /C _{2α''} ; 6,0%), 543,3 (Z _{1α} ; 5,9%), 561,1 (Y _{1α} ; 10,1%), 653,3 (C _{4α} X _{Y_{2α}} ; 15,2%), 690,1 (B _{3α} ; 15,6%), 1159,5 (Y _{1β} X _{Y_{3α}} ; 11,6%), 1173,6 (Y _{2α} ; 74,1%), 1302,7 (B _{4α} ; 13,7%), 1320,6 (C _{4α} ; 100,0%), 1418,8 (Y _{2α''} /Y _{3α} ; 22,4%), 1581,8 (Y _{1β} ; 24,3%), 1622,8 (Y _{4α'} /Y _{3α''} ; 6,1%)		H9 _A
	2045,0	486,1 (11,7%), 653,3 (14,9%), 690,3 (32,2%), 765,2 (18,7%), 880,3 (17,5%), 951,4 (27,8%), 1116,4 (60,8%), 1377,7 (100,0%), 1524,7 (17,4%), 1581,8 (49,2%), 1622,9 (25,4%), 1769,9 (65,7%), 1786,1 (58,8%)	Hex ₆ HexNAc ₃ -ol Mezcla compleja	H9 _B
IJ4	1840,8	543,3 (Z _{1α} ; 9,2%), 561,1 (Y _{1α} ; 5,8%), 653,3 (C _{3α} X _{Y_{2α}} ; 10,7%), 690,3 (B _{3α''} ; 11,9%), 1173,6 (Y _{2α} ; 77,5%), 1302,7 (B _{4α} ; 6,9%), 1320,6 (B _{4α} ; 100,0%), 1418,8 (Y _{2α''} /Y _{3α} ; 16,4%), 1581,8 (Y _{1β} ; 23,3%), 1622,8 (Y _{4α'} /Y _{3α''} ; 6,4%)		IJ4 _A



IJ7	1595,9	502,1 ($Z_{1\alpha}$; 3,7%), 667,3 ($C_{3\alpha}$; 9,9%), 857,4 ($C_{4\alpha}XY_{2\alpha}$; 8,9%), 951,4 ($Z_{2\alpha}$; 5,1%), 1116,5 ($C_{4\alpha}$; 100,0%), 1377,7 ($Y_{4\alpha}$; 9,1%)		IJ7 _A
	1636,9	431,1 ($C_{3\alpha}XZ_{4\alpha}/B_{3\alpha}XY_{4\alpha}$; 3,1%), 472,1 ($C_{4\alpha}XZ_{2\alpha}/B_{4\alpha}XY_{2\alpha}$; 3,2%), 857,4 ($C_{4\alpha}XY_{2\alpha}$; 5,3%), 1010,5 ($Y_{2\alpha}$; 11,1%), 1098,5 ($B_{4\alpha}$; 5,2%), 1116,5 ($C_{4\alpha}$; 100,0%), 1214,6 ($Y_{3\alpha}$; 4,3%); 1377,7 ($Y_{2\alpha}/Y_{1\beta}$; 57,6%)		IJ7 _B
IJ8	1799,8A	431,1 ($B_{3\alpha}XY_{4\alpha}/C_{3\alpha}XZ_{4\alpha}$; 4,2%), 463,2 ($C_{2\alpha}/C_{2\beta}$; 9,6%), 506,3 ($Y_{2\alpha}XY_{2\beta}$; 3,8%), 690,3 ($B_{3\beta}$; 19,8%), 857,4 ($C_{4\alpha}XY_{2\beta}$; 11,2%), 898,4 ($C_{4\alpha}XY_{2\alpha}$; 4,0%), 1102,7 ($C_{4\alpha}Y_{3\alpha}/C_{4\alpha}Y_{3\beta}$; 4,7%), 1132,6 ($Y_{2\beta}$; 94,2%), 1173,6 ($Y_{2\alpha}$; 21,3%), 1377,8 ($Y_{3\alpha}/Y_{3\beta}$; 17,9%), 1524,8 ($C_{4\alpha}$; 100,0%)		IJ8 _A
	1758,8B	431,2 ($B_{3\alpha}XY_{4\alpha}/C_{3\alpha}XZ_{4\alpha}$; 4,4%), 465,1 ($Y_{2\alpha}XY_{2\beta}$; 9,9%), 690,3 ($B_{3\beta}$; 26,3%), 857,4 ($C_{4\alpha}XY_{2\beta}$; 11,7%), 1091,5 ($Y_{2\beta}$; 4,7%), 1118,5 ($Y_{4\alpha}XY_{3\beta}/Y_{3\alpha}XY_{4\beta}$; 16,3%), 1132,6 ($Y_{2\alpha}$; 23,4%), 1336,6 ($Y_{3\beta}/Y_{3\alpha}$; 19,8%), 1524,7 ($C_{4\alpha}$; 100,0%)		IJ8 _D
IJ8	2004,0	520,2 ($Y_{1\alpha}$; 5,3%), 690,3 ($B_{3\alpha}$; 11,9%), 857,4 ($C_{4\alpha}XY_{2\alpha}$; 5,8%), 880,5 ($C_{4\alpha}XZ_{2\alpha}/B_{4\alpha}XY_{2\alpha}$; 4,8%), 1336,7 ($Y_{2\alpha}$; 100,0%), 1377,7 ($Y_{2\alpha}$; 24,1%), 1524,7 ($C_{4\alpha}$; 53,0%), 1581,8 ($Y_{3\alpha}/Y_{3\alpha}$; 18,3%), 1744,8 ($Y_{1\beta}$; 19,9%)		IJ8 _E
	2045,0	543,2 ($Z_{1\alpha}$; 9,9%), 561,3 ($Y_{1\alpha}$; 3,6%), 690,3 ($B_{3\alpha}$; 11,9%), 751,4 ($Y_{2\alpha}XY_{2\alpha}$; 3,3%), 857,3 ($C_{4\alpha}XY_{2\alpha}$; 3,3%), 880,3 ($C_{4\alpha}XZ_{2\alpha}/B_{4\alpha}XY_{2\alpha}$; 3,3%), 1102,4 ($C_{4\alpha}XY_{3\alpha}/C_{4\alpha}XY_{3\alpha}$; 3,0%), 1306,6 ($C_{4\alpha}XY_{4\alpha}/C_{4\alpha}XY_{4\alpha}$; 3,6%), 1377,7 ($Y_{2\alpha}$; 75,6%), 1418,7 ($Y_{2\alpha}$; 9,9%), 1524,7 ($C_{4\alpha}$; 100,0%), 1622,8 ($Y_{3\alpha}/Y_{3\alpha}$; 12,2%), 1785,9 ($Y_{1\beta}$; 20,7%)		IJ8 _B
IJ10	1595,9	<u>284,1 ($Y_{1\alpha}XZ_{1\beta}/Z_{1\alpha}XY_{1\beta}$; 3,0%),</u> 431,2 ($B_{3\alpha}XY_{5\alpha}/C_{3\alpha}XZ_{5\alpha}/B_{4\alpha}XY_{4\alpha}/C_{4\alpha}XZ_{4\alpha}/B_{5\alpha}XY_{3\alpha}/C_{5\alpha}XZ_{3\alpha}$; 3,8%), 449,2 ($C_{3\alpha}XY_{5\alpha}/C_{4\alpha}XY_{4\alpha}$; 3,0%), 506,2 ($Y_{2\alpha}XY_{1\beta}$; 3,8%), <u>543,2 ($Z_{1\alpha}$; 27,7%),</u> <u>561,2 ($Y_{1\alpha}$; 7,5%),</u> 765,4 ($Y_{2\alpha}$; 28,6%), 853,4 ($B_{4\alpha}$; 4,5%), 871,4 ($C_{4\alpha}$; 3,8%), 969,4 ($Y_{3\alpha}$; 14,8%), <u>1057,4 ($B_{5\alpha}$; 5,7%),</u> <u>1075,5 ($C_{5\alpha}$; 100,0%),</u> 1173,6 ($Y_{4\alpha}$; 6,4%), 1336,7 ($Y_{1\beta}$; 54,8%)		IJ10 _A

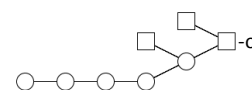


431,2 ($B_{3\alpha}XY_{5\alpha}/C_{3\alpha}XZ_{5\alpha}/B_{4\alpha}XY_{4\alpha}/C_{4\alpha}XZ_{4\alpha}$; 3,8%),
 449,2 ($C_{3\alpha}XY_{5\alpha}/C_{4\alpha}XY_{4\alpha}$; 3,0%), 506,2 ($Y_{2\alpha}XY_{2\beta}$;
 3,8%), 765,3 ($Y_{2\alpha}$; 28,6%), 853,4 ($B_{4\alpha}$; 4,5%), 871,4
 ($C_{4\alpha}$; 3,8%), 969,4 ($Y_{3\alpha}$; 14,8%), 1061,5 ($C_5XY_{2\beta}$;
 7,0%), 1173,6 ($Y_{4\alpha}$; 6,4%), 1320,7 (C_5 ; 58,9%),
 1336,7 ($Y_{2\beta}$; 54,8%),



IJ10_{A'}

543,2 ($Z_{1\alpha}$; 17,8%), 561,2 ($Y_{1\alpha}$; 17,8%), 1010,4 ($Y_{2\alpha}$;
 1840,9 14,8%), 1061,6 ($C_{5\alpha}XY_{2\alpha''}$; 9,7%), 1214,5 ($Y_{3\alpha}$; 6,3%),
 1320,6 ($C_{5\alpha}$; 100,0%), 1581,8 ($Y_{1\beta}/Y_{2\alpha''}$; 67,5%)



IJ10_B

Las fracciones IJ3 y H3 se analizaron independientemente, pero se presentan juntas por estar compuestas por los mismos glicanos y tener tiempos de retención muy similares en el mismo gradiente de PCG-HPLC. Las condiciones de análisis y los criterios de nomenclatura son los mismos que los utilizados en la **Tabla 4**. Los glicanos componentes de cada sub-fracción se nombran con subíndices A, B, C, D, coincidiendo con la nomenclatura del hospedero bovino siempre que las secuencias sean las mismas; de lo contrario, se continua asignando subíndices correlativos. Tanto para H5_A como para IJ10_A se encontraron fragmentos correspondientes a dos estructuras de igual masa molecular (H5_A y H5_{A'}, IJ10_A e IJ10_{A'}); se indican en subrayado aquellos fragmentos que son mutuamente excluyentes, es decir que no pueden corresponder a una estructura única. En estos casos se presentan las dos secuencias más probables que contemplen los fragmentos no compartidos.

A partir de esta comparación, a nivel de distribución de tamaños, de MS¹ de las fracciones de gel-filtración, de perfiles de PGC-HPLC y de secuencias por MS² de los componentes de las sub-fracciones principales, se observa que no hay diferencias significativas entre los materiales provenientes de los dos hospederos. No existen evidencias que sugieran que la capacidad biosintética del metacestodo esté de alguna manera impedida o alterada en el hospedero bovino, a pesar de que el parásito se desarrolle en un contexto fuertemente inflamatorio, ya que los O-glicanos en el hospedero permisivo para esta cepa, la oveja, en términos generales tienen iguales secuencias y se encuentran en iguales proporciones. Las diferencias puntuales que se aprecian entre los hospederos no presentan una tendencia que sugiera que existe un fenómeno de relevancia biológica detrás, sino que probablemente ocurren debido a variabilidad intrínseca de *E. granulosus* en este estadio larvario, así como diferencias en el fraccionamiento de las muestras, que no se realizó en paralelo, ya que el fraccionamiento del material de origen bovino precedía al comienzo de esta Tesis. Por consiguiente, no se consideró necesario elucidar completamente los glicanos de material ovino. En cambio, se decidió proseguir con la elucidación estructural completa



de los glicanos principales de las fracciones H e IJ del hospedero bovino, ya que es mayor la disponibilidad de material parasitario de este hospedero en nuestro país. Esto permitió obtener cantidades compatibles con el análisis por NMR de glicanos que exhiben motivos estructurales predichos por MS² (ramas de HexNAc o Hex₂HexNAc sobre el esqueleto principal de hexosas) que no habían sido plenamente descritos previamente a esta Tesis.

4.3 Elucidación estructural completa de nuevos O-glicanos de la capa laminar de *E. granulosus*

De los glicanos presentados hasta el momento en la [Figura 20](#) y la [Tabla 4](#), se elucidaron completamente por NMR y análisis de posiciones de sustitución 6 nuevas estructuras (H1_A, H3_A, H7_A, IJ8_A, IJ10_A e IJ10_A'), provenientes de 5 sub-fracciones. Si bien 4 de estos glicanos (todos excepto H1_A y H7_A) provienen de sub-fracciones de varios componentes detectables por MS¹, los componentes minoritarios de cada sub-fracción se hallan en cantidades suficientemente bajas para no interferir en la elucidación, por lo que no se intentó re-cromatografiarlos para purificarlos. En el caso de IJ10_A e IJ10_A', se encontraron dos componentes muy emparentados en cantidades similares y fue posible elucidar con certeza ambos, como se explica en detalle más abajo. Los resultados del análisis de posiciones de sustitución se presentan en la [Tabla 6](#). Además de las sub-fracciones mencionadas, a otros 3 oligosacáridos se les realizó este análisis pero no se pudo llevar la elucidación a término mediante NMR, dada la falta de muestra (sub-fracción H6_A, [Tabla 4](#)) o a que se trataba de mezclas complejas de difícil resolución (sub-fracciones IJ4 e IJ9, [Tabla 4](#)).



Tabla 6: Análisis de metilación de glicanos de 6 a 8 residuos provenientes de la CL de *E. granulosus*

Estándar	Tiempo de retención (min)							Estructura
	H1A	IJ5A	H3A	H6A	IJ8A	IJ9A	IJ10A/IJ10A'	
12,15	12,15	12,15	12,03	12,15	12,03	12,04	11,99	2,3,4,6 tetra-O-metil-β-D-galactopiranosido (Galp terminal)
12,66	12,64	12,66	12,60	12,65	12,60	12,61	12,53	2,3,4,6 tetra-O-metil-α-D-galactopiranosido (Galp terminal)
15,73	15,72	15,72	15,58	15,70	15,62	15,64	-	4-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-β-D-galactopiranosido (Galp 4-sustituída)
17,25	17,13	17,13	17,04	17,14	17,09	17,10	17,00	4-O-acetil-2,3,6-tri-O-metil-α-D-galactopiranosido (Galp 4-sustituída)
18,39	-	18,36	18,19	18,38	18,20	18,38	18,24	3-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil-β-D-galactopiranosido (Galp 3-sustituída)
20,25	-	20,15	20,02	20,22	20,04	20,31	20,09	3-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil-α-D-galactopiranosido (Galp 3-sustituída)
25,39	25,34	-	25,08	-	25,15	25,12	25,09	3,6-di-O-acetil-2,4-di-O-metil-α-D-galactopiranosido (Galp 3,6 disustituída)
27,31	27,32*	27,32*		27,30	-	-	27,18	2-deoxi-2-acetamido-3,4,6-tri-O-metil-N-metil-β-D-glucopiranosido (GlcNAcp terminal)
27,42	27,37*	27,42*	-	-	-	-	-	3,6-di-O-acetil-2,4-di-O-metil-β-D-galactopiranosido (Galp 3,6 disustituída)
27,54	27,50*	27,56*	27,66	27,58	-	-	27,28	2-deoxi-2-acetamido-1,4,5-tri-O-metil-N-metil-3,6-anhidro-galactosaminitol (GalNAc-ol 3,6-disustituída) ^A
31,86	31,93	-	-	31,94	-	-	31,79	2-desoxi-2-acetamido-3,4,6-tri-O-metil-N-metil-α-D-glucopiranosido (GlcNAcp terminal)
33,80	-	-	33,85	-	-	-	-	2-desoxi-2-acetamido-4-O-acetil-3,6-di-O-metil-N-metilβ-D-glucopiranosido (GlcNAcp 4-sustituída)
34,28	-	-	-	-	34,17	34,28	34,07	2-deoxi-2-acetamido-3-O-acetil-1,4,5,6-tetra-O-metil-N-metil-galactosaminitol (GalNAc-ol 3-sustituído)
37,39	-	37,25	37,30	-	37,29	37,36	-	2-desoxi-2-acetamido-4-O-acetil-3,6-di-O-metil-N-metil α-D-glucopiranosido (GlcNAcp 4-sustituída)
40,89	-	-	40,70	-	-	-	-	2-deoxi-2-acetamido-3,6-di-O-acetil-1,4,5-tri-O-metil-N-metil-galactosaminitol (GalNAc-ol 3,6-disustituído)

*Picos no resueltos en el cromatograma.

A: durante la reacción de metanólisis, el residuo de GalNAc-ol 3,6 disustituído (metilado en posiciones 1,4,5 y N) sufre una reacción de deshidratación entre los grupos hidroxilo en posiciones 3 y 6, dando lugar a un éter cíclico (residuo 3,6 anhidrogalactitol metilado) [91]. Los picos correspondientes a Gal 3,6 disustituída presentan un corrimiento de aproximadamente 0,2 min respecto al estándar en el anómero α excepto para H1A, mientras que la identificación del anómero β se dificulta por la superposición con GalNAc-ol 3,6 disustituído.



Para elucidar completamente la estructura de cada glicano se utilizó una batería de 5 experimentos de NMR: espectro monodimensional de protón, espectros de protón bidimensionales COSY, TOCSY y ROESY, y un experimento bidimensional heteronuclear protón-carbono HSQC [92]. No se utilizó el espectro de NOESY, ya que este genera señales que pueden ser negativas o positivas, dependiendo del largo del glicano, y para largos intermedios (como los glicanos en estudio), la señal es prácticamente nula. En cambio, en el espectro de ROESY, las señales son siempre positivas, por lo que nunca se anulan, independientemente del largo del glicano [37]. Los desplazamientos de carbono se obtuvieron del espectro de HSQC, debido que las pequeñas cantidades de muestra no son compatibles con la detección por carbono en tiempos razonables.

La **Figura 21** muestra la asignación del glicano H3_A como ejemplo. En primer lugar, se determinaron los desplazamientos de los protones anoméricos y sus constantes de acoplamiento con los protones H₂ en el espectro monodimensional de protón. Los protones anoméricos α se reconocen por tener un alto desplazamiento químico (~ 5 ppm, por efecto anomérico), y una baja constante de acoplamiento con sus respectivos protones H₂ (~ 4 Hz), que son axiales tanto para la configuración *gluco* como *galacto* en conformación 4C_1 , debido a que el ángulo diedro entre estos es cercano a 60° (cercano a un mínimo en la ecuación de Karplus [37], en tanto que los protones anoméricos β no presentan efecto anomérico pero poseen un ángulo diedro de 180° y por ende presentan mayores constantes de acoplamiento (~ 8 Hz).

A partir del desplazamiento de los protones H₁, se determinaron los desplazamientos de protones H₂ en el espectro de 2D-COSY (**Figura 22**). Los demás protones de cada sistema de espín se determinaron en el espectro 2D-TOCSY (**Figura 23**) por acoplamiento con sus respectivos protones anoméricos, permitiendo luego seguir la conectividad de cada sistema de espín en el espectro 2D-COSY. Con los valores de desplazamientos de protones H₂ es posible encontrar los desplazamientos de C₂ en el espectro HSQC, y distinguir los residuos de aminoazúcares (C₂ ~ 50 -55 ppm) de los de hexosas (C₂ ~ 70 ppm) (**Figura 24**).

Vale la pena aclarar que los residuos de configuración *gluco* poseen todos los protones del anillo en posiciones axiales, por lo cual los ángulos diedros entre todos ellos son de 180° y por consiguiente las constantes de acoplamiento son altas. Esto permite que la magnetización se



transmita eficientemente desde el protón H_1 hasta el protón H_5 (y en ocasiones hasta H_6), y se puedan identificar los *crosspeaks* correspondientes en el espectro de 2D-TOCSY. En cuanto a los residuos de galactosa, el protón H_4 se encuentra en posición ecuatorial, por lo que los ángulos diedros entre H_3-H_4 y H_4-H_5 son cercanos a 60° y por lo tanto las constantes de acoplamiento entre estos protones son relativamente bajas. Es por esto que las señales H_1-H_5 por lo general son muy débiles para residuos de galactosa en el espectro de 2D-TOCSY.

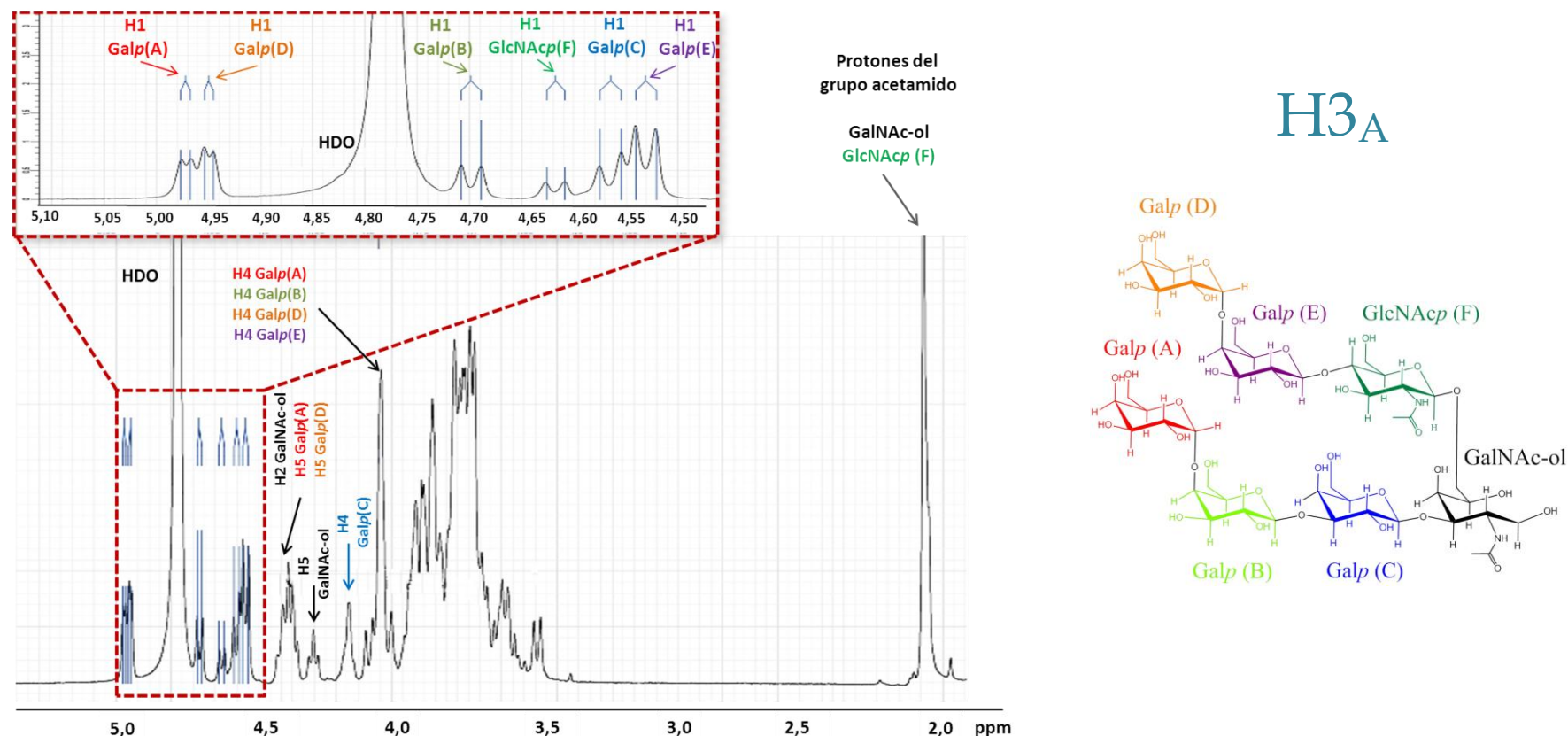


Figura 21: Interpretación del espectro de 1D-¹H del glicano H3_A. Se determinaron los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento H₁-H₂ (indicativas de la anomeridad, no presentadas en la figura) así como los valores de integración de cada señal, para confirmar el número de protones que componen a la señal. Las únicas señales suficientemente separadas de la mayoría (3,5–4,0 ppm) en el espectro corresponden a los protones anoméricos, protones de grupos acetamido (tres protones equivalentes por residuo de HexNAc), el protón H₂ del residuo de galactitol y los protones H₅ de galactosas terminales. Para estos últimos, nótese que se trata de multipletes, debido a la presencia de tres protones vecinales (H₄, H₆ y H₆'). Para facilitar la interpretación se muestra la estructura del glicano H3_A, en la que cada residuo presenta un color que se corresponde con las señales indicadas en el espectro.

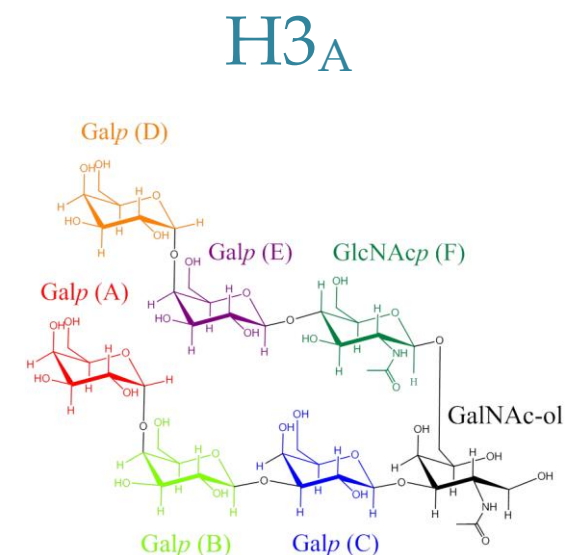
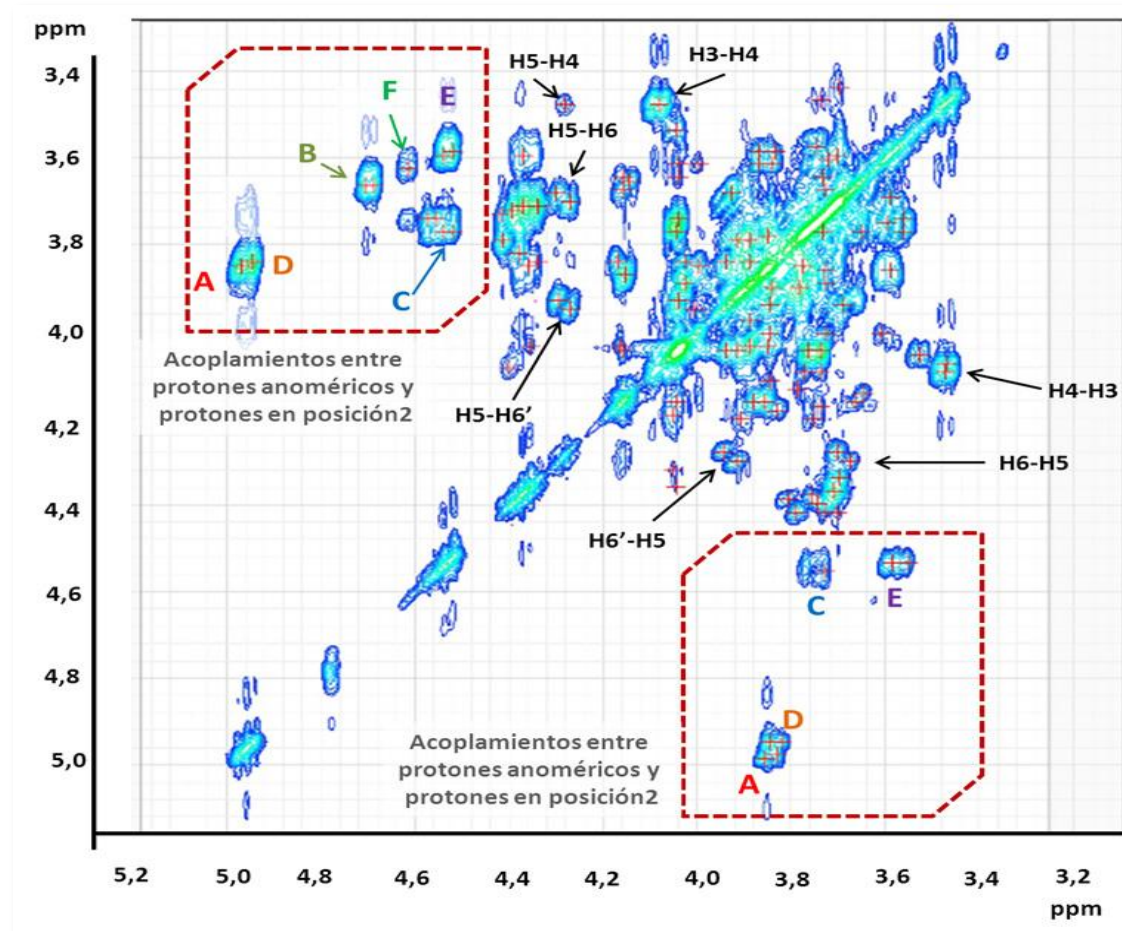


Figura 22 : Interpretación del espectro de 2D-COSY del glicano H3_A. Se muestra el espectro en el rango de desplazamientos químicos de 3,0 hasta 5,0 ppm, rango que excluye las señales de los protones de los grupos acetamido, ya que al estar sobre un grupo exocíclico, no acoplan con el sistema de espín del anillo. Si bien el espectro es simétrico respecto a la diagonal, algunas señales se visualizan mejor en una mitad del espectro. Las señales más importantes e identificables corresponden a *crosspeaks* H₁-H₂ (recuadradas en línea punteada roja), para las cuales solo se indica la letra correspondiente al residuo al que corresponden, y están recuadradas. Otras señales sencillas de asignar corresponden al residuo de alditol, que presente menos superposición con los desplazamientos de residuos en forma piranosa. Se resaltan algunas de estas correspondientes al residuo de GalNAc-ol, indicadas como H_x-H_y, dónde H_x es la señal de protón en la abscisa y H_y en la ordenada.

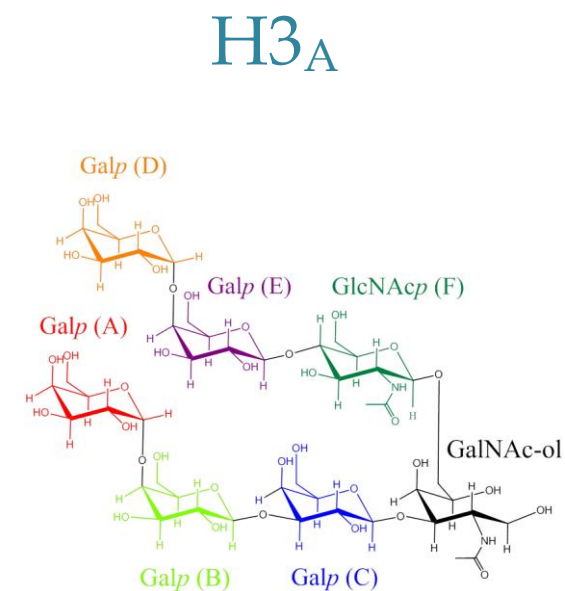
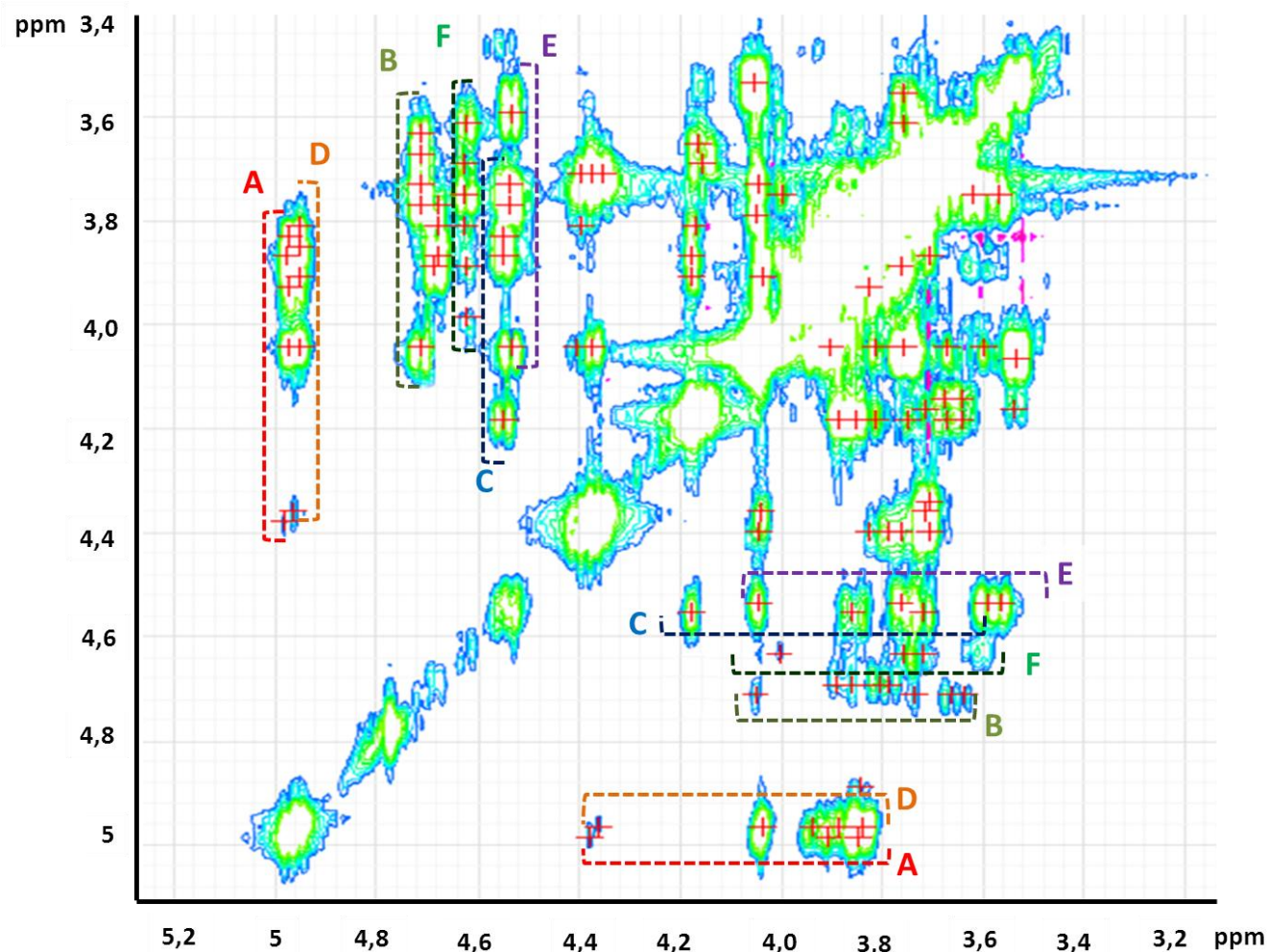
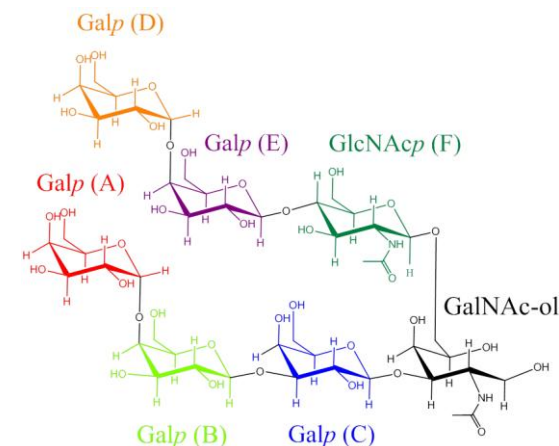


Figura 23: Interpretación del espectro de 2D-TOCSY del glicano $H3_A$. Se muestra el espectro en el rango de desplazamientos químicos de 3,0 hasta 5,0 ppm; se aplican las mismas consideraciones que para el espectro 2D-COSY. En este experimento, las señales más informativas son aquellas correspondientes a acoplamiento de protones anoméricos con los demás protones de su sistema de espín. Nótese que aún para los residuos de α -galactopiranososa (A y D) es posible detectar los protones H_5 (4,36 ppm), a pesar que el acoplamiento es débil.



87

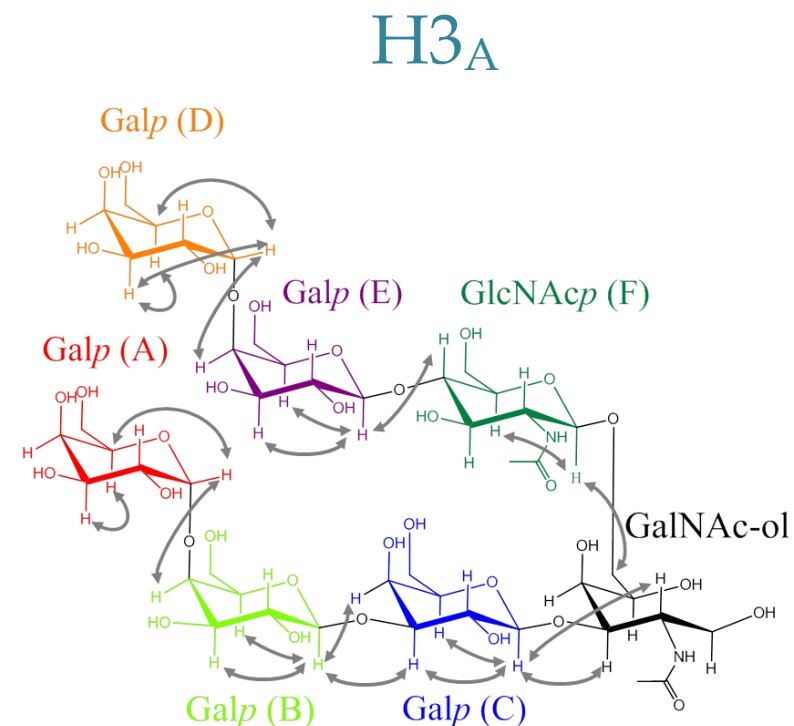
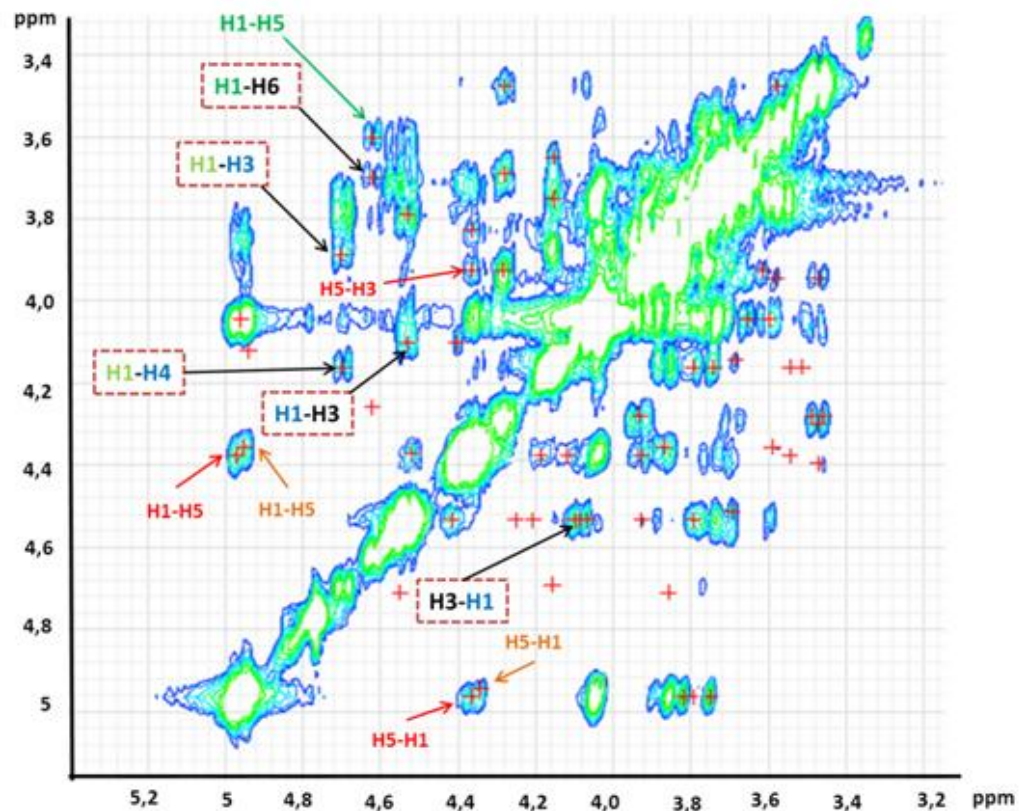


Figura 25: Interpretación del espectro ROESY del glicano H3_A. Se muestra el espectro en el rango de desplazamientos químicos de 3,0 hasta 5,0 ppm; se aplican las mismas consideraciones que para el espectro 2D-COSY. Para el acoplamiento entre protones del mismo residuo, se indican los protones involucrados y se emplea el código de color del residuo, en tanto que la conectividad entre residuos distintos se indica con el mismo código de colores de cada residuo y recuadrado en línea roja punteada. Se observan señales de acoplamiento entre H₁ y H₅ para los residuos A y D, que claramente poseen mayores intensidades de señal que en el espectro TOCSY, lo que corresponde a acoplamientos en el espacio. Se destacan las señales de acoplamiento entre el protón anomérico del residuo B y los protones H₃ y H₄ del residuo C. También se observa la conectividad de los protones anoméricos de los residuos GlcNAcp F y Galp C con los protones 6 y 3 del residuo de GalNAc-ol respectivamente. No se señalan todos los acoplamientos observados entre protones para simplificar la figura. Se indican con flechas sobre la estructura del glicano los acoplamientos en el espacio hallados.



En la **Figura 25** se presenta el espectro de 2D-ROESY para el glicano H3_A. Para este tipo de glicanos en particular, los acoplamientos a través del espacio por NOE son difíciles de interpretar, por los siguientes motivos:

- Los protones anoméricos de dos residuos pueden presentar iguales desplazamientos químicos (ej Galp C y Galp E, glicano H3_A, **Figura 21** a **Figura 25** y **Tabla 7**)
- Los protones H₃ y H₅ en un residuo de β-galactopiranososa pueden tener desplazamientos muy cercanos (ej Galp B y Galp E, **Tabla 7** glicano H3_A). Ya que ambos son protones axiales del mismo lado del plano del anillo que el protón anomérico, ambos deberían acoplarse con este último a través del espacio, dando señales superpuestas.
- Los protones en posiciones homólogas de galactosas del esqueleto principal de (Galp β1-3)_n suelen tener desplazamientos muy próximos, ya que comparten entornos químicos prácticamente idénticos. En el caso de protones H₃ esto enmascara una señal indicativa de un enlace β1-3 entre dos residuos bajo una señal H₁ – H₃ al interior de un mismo residuo, esperada dada la configuración del mismo. Como ejemplo, en el glicano IJ10_A (**Tabla 7**) los protones H3 de los residuos consecutivos en secuencia Galp C, Galp D y Galp E tienen desplazamientos químicos muy similares. En consecuencia, el acoplamiento Overhauser entre H1 de Galp C y H3 de GalNAc-ol queda escondido bajo el acoplamiento entre H1 y H3 del residuo Galp C. Similar problema aparece para detectar el acoplamiento entre H1 de Galp D y H4 de Galp E.
- Los enlaces glicosídicos presentan libre rotación, de modo que un enlace β1-3 implica la proximidad espacial del protón anomérico de un residuo con el protón H₃ del siguiente, pero también con el protón H₄ de ese segundo residuo, pudiendo llevar a la conclusión errónea que el enlace es β1-4. Ejemplificado por el glicano H3_A (**Figura 25** y **Tabla 7**), el protón H1 de Galp B acopla tanto con H3 como con H4 de Galp C. Análogamente, siempre refiriendo al glicano H3_A, los protones H₄ de los residuos Galp A, Galp B, Galp D y Galp E poseen iguales desplazamientos químicos, por lo que no es posible discriminar los acoplamientos indicativos de enlaces glicosídicos GalpA(α1-4)Galp B y GalpD (α1-4)Galp E de acoplamientos H₁ – H₄ dentro del propio sistema de espín de Galp A y Galp D, o posibles enlaces GalpA(α1-4)GalpE y GalpD(α1-4)GalpB.



Para confirmar las posibles sustituciones de los residuos se observaron los desplazamientos de carbono en el espectro HSQC (**Figura 24**). Las posiciones sustituidas presentan un corrimiento del desplazamiento de carbono de +10 ppm respecto a un residuo del mismo tipo en el cual dicha posición no esté sustituida. En situaciones como la planteada en el último ejemplo de la lista anterior (glicano H3_A), los residuos Galp A y Galp D se distinguieron y colocaron en la secuencia del glicano en base a los desplazamientos de residuos homólogos en glicanos de menor tamaño que no presentan ambos tipos de residuos simultáneamente, es decir que poseen decoración sobre el residuo GlcNAc del *core* pero no un residuo de Galp (α 1-4) (glicanos G1_A y G3_A) o viceversa (glicanos E3_A, F2_A y G7_A).

Finalmente, es preciso acotar que la asignación de los espectros de NMR se apoya fuertemente en las secuencias deducidas por espectrometría de masas y en las posiciones de sustitución elucidadas en el análisis de metilación. Con esto presente, se comentarán a continuación las estructuras de los 6 nuevos *O*-glicanos elucidados de la CL de *E. granulosus*.

En primer lugar, para el glicano H1_A, de secuencia Hex₂(HexNAc)Hex(HexNAc)HexNAc-ol (**Tabla 4**), se determinó por análisis de posiciones de sustitución (**Tabla 6**) la presencia de residuo(s) de Galp terminal, de Galp monosustituida en posición 4, de Galp disustituida en posiciones 3 y 6, de GlcNAcp terminal y de GalNAc-ol disustituido en posiciones 3 y 6. Dado que la secuencia indica un único residuo de cada tipo, la asignación es Galp(1-4)Galp(1-3)[GlcNAcp(1-6)]Galp(1-3)[GlcNAcp(1-6)]GalNAc-ol, por lo que estrictamente solo restaría determinar las anomeridades y confirmar las configuraciones por NMR. En NMR (**Tabla 7**), se halló un único residuo con anomeridad α , cuyos desplazamientos corresponden a un residuo de galactosa terminal, de modo que los demás enlaces glicosídicos de la molécula son β . Los desplazamientos químicos y correlaciones por efecto nuclear Overhauser (NOE) son consistentes con la secuencia y posiciones de sustitución recién planteadas. En particular, se destaca la correlación por NOE entre protones con 4,58 ppm (H₁ de GlcNAcp C) y 3,79 ppm (H₆ de Galp D), que confirma el enlace β 1-6 de la ramificación con *N*-acetilglucosamina, siendo esta la primera ramificación sobre el esqueleto principal Galp(β 1-3)_n de plenamente caracterizada en glicanos de la CL. Otra señal diagnóstica del mismo enlace consiste en el incremento del desplazamiento de C₆ del residuo sustituido (Galp D) desde un valor de ~61 ppm (para galactosas no sustituidas en esa posición) a un valor de 69.6 ppm.



En cuanto al oligosacárido H3_A, de secuencia Hex₃(Hex₂-HexNAc)HexNAc-ol (**Tabla 4**), el análisis de metilación indica la presencia de residuos de Galp terminal, Galp monosustituida en posiciones 3 y 4, Galp disustituida en posiciones 3 y 6, GlcNAcp monosustituida en posición 4 y GalNAc-ol disustituido en posiciones 3 y 6 (**Tabla 6**). Todos estos tipos de residuos son compatibles con la secuencia predicha, excepto por el residuo de Galp disustituida en posiciones 3 y 6, lo que hace suponer que el mismo proviene de algún otro producto de la sub-fracción H3, presumiblemente el glicano H3_C (**Tabla 4**). De esta forma, las posiciones de sustitución de los residuos de acetamidoazúcares quedan determinadas, no así los tres residuos de galactosa no terminales (dos de la porción media del esqueleto principal y uno de la decoración sobre el residuo de GlcNAcp del *core 2*), que en principio podrían estar sustituidas en posición 3 o 4. Para este oligosacárido-alditol se hallaron por NMR dos residuos de anomeridad α con desplazamientos consistentes con residuos de galactosa del extremo no reductor reportados previamente ([70], **Tabla 9**), por lo que se trataría probablemente de un glicano con *cap* de Galp α 1-4 (extrapolando de lo observado anteriormente para glicanos más pequeños), y cuya ramificación también terminaría en α -Galp (residuos Galp A y Galp D respectivamente, **Tabla 7**). La conectividad entre residuos se dedujo teniendo en cuenta los acoplamientos por NOE, el decremento del desplazamiento químico de carbono de la posición sustituida (relativo al que tendría en caso de no estar sustituida), y a la observación empírica realizada en el contexto de este trabajo (y verificada estudiando sus antecedentes directos [70]) que el desplazamiento del protón anomérico de residuos de galactosa del esqueleto principal (Galp(β 1-3)_n) en este tipo de glicanos disminuye desde el extremo no reductor al reductor, en tanto que el del protón H₄ generalmente aumenta en esa dirección, como se describió anteriormente (**Figura 21**, comparar protones H1 de residuos Galp C y Galp B). En suma, este glicano posee el motivo P1 comentado en la Introducción, como decoración del residuo de GlcNAcp del *core* (residuos Galp D, Galp E y GlcNAcp F, **Tabla 6**), y un esqueleto principal compuesto por 2 residuos de Galp(β 1-3) (uno proveniente del *core*) y un *cap* Galp(α 1-4). De esta forma, el glicano H3_A es un análogo mayor del glicano G3_A descrito en el trabajo antecedente [70].

Para el tercer glicano plenamente elucidado, H7_A, no se contó con datos de análisis de metilación, pero se pudo igualmente realizar la elucidación total por NMR. Dada la simplicidad de su secuencia, que solo contiene 5 residuos piranósicos más el residuo de alditol. Esta elucidación se basó en los desplazamientos de protón y carbono conocidos para glicanos análogos,

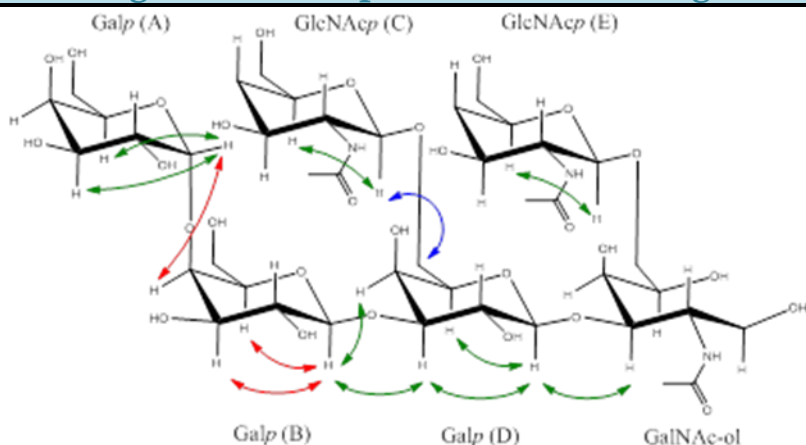


particularmente habiendo elucidado las señales correspondiente al residuo de galactosa 3,6 disustituida a partir del glicano H1_A. Como se estableció previamente, se identifica claramente el sistema de espín correspondiente al residuo de GlcNAc_p mediante el desplazamiento de 55,8 ppm de C2, y el residuo de *N*-acetilgalactosaminitol se distingue por poseer señales características de un alditol. Los demás residuos de galactosa siguen la tendencia observada, a lo largo del esqueleto principal, de disminución en el desplazamiento del protón anomérico desde el extremo no reductor al reductor, y la tendencia contraria para los protones H₄. De esta manera, a pesar de carecer de los datos de análisis de metilación, fue posible asignar cada sistema de espín a su respectiva posición dentro de la secuencia. Este glicano posee un *cap* de Galp(α 1-4) y todos los demás residuos tienen anomeridad β . H7_A constituye el segundo ejemplo de una ramificación GlcNAc(β 1-6) sobre el esqueleto principal de Galp(β 1-3).

El siguiente glicano elucidado completamente, IJ8_A, presenta similares señales que el glicano H3_A por análisis de metilación (**Tabla 6**), con la diferencia que el residuo de GalNAc-ol se encuentra monosustituido en posición 3 y se observa la señal de galactosa 3,6 disustituida, coherente con la secuencia prevista por MS² de Hex₃[Hex₂HexNAc]HexHexNAc-ol (**Tabla 4**). Si bien el tiempo de retención del anómero α de Gal 3,6 disustituida se encuentra desplazado 0,24 min respecto al estándar y no fue posible identificar al anómero β , tampoco se encontraron señales con tiempos de retención correspondientes a otros tipos de galactosa disustituida. En este glicano se observan 2 protones anoméricos α (**Tabla 7**), asignados a residuos de galactosa terminales, tanto del esqueleto principal como de la ramificación. Los desplazamientos químicos de protón y carbono de los residuos Galp D, Galp E y GlcNAc_p F reproducen las observadas para el motivo P1 en el glicano H3_A, y el protón anomérico del residuo de GlcNAc_p presenta un acoplamiento por NOE con el protón H₆' del residuo de Galp G (4,62 ppm – 3,98 ppm), confirmándose de esta manera que la ramificación Hex₂HexNAc de este glicano corresponde a un motivo P1 externo al core, siendo este el primer ejemplo de este motivo elucidado a completitud. Los demás desplazamientos y acoplamientos son consistentes con un esqueleto principal de 3 residuos Galp(β 1-3) con un extremo no-reductor Galp(α 1-4) y un extremo reductor reducido GalNAc-ol.

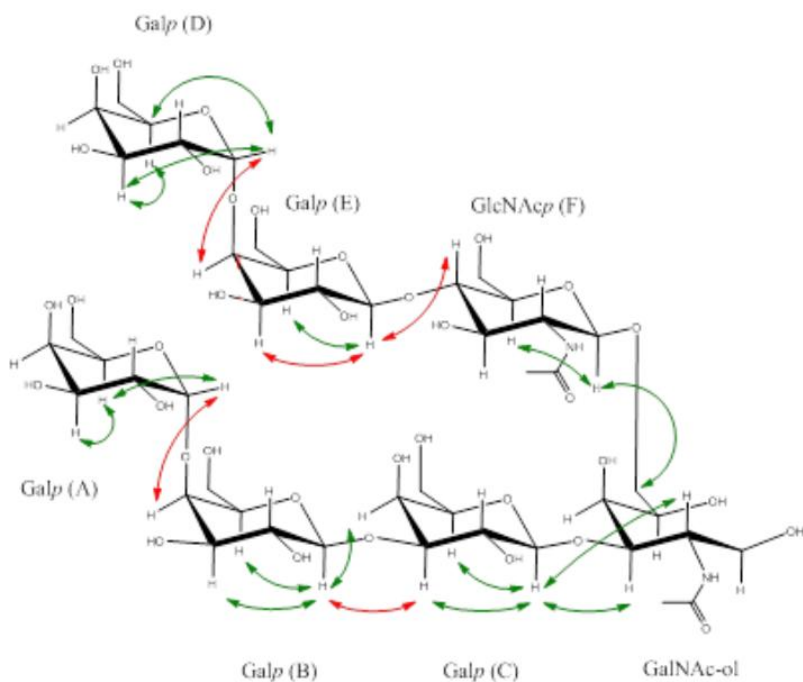


Tabla 7: Asignación de espectros NMR de oligosacáridos-alditales



H1_A

Residuo	Desplazamientos químicos ppm y constantes de acoplamiento H ₁ -H ₂														
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'	NAc	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	NAc
GalNAc-ol	3,75;3,80	4,39	4,05	4,24	3,70	3,70	3,95	2,06	61,1	51,7	77,6	69,4	68,1	71,0	22,7
Galp(A)	4,98 (7,8Hz)	3,86	3,94	4,04	4,38	3,83	*	-	100,6	69,7	69,7	69,7	71,4	61,1	-
Galp(B)	4,70 (7,8Hz)	3,68	3,77	4,06	3,77	3,88	3,64	-	105,3	71,3	72,8	77,9	75,6	60,6	-
GlcNAcp(C)	4,58 (8,4Hz)	3,70	3,55	3,45	3,49	3,78	3,94	2,07	102,5	55,9	74,3	70,5	76,1	61,0	22,7
Galp(D)	4,54 (8,4Hz)	3,76	3,84	4,15	3,89	3,79	3,98	-	102,0	72,4	82,2	68,1	73,8	69,6	-
GlcNAcp (E)	4,54 (7,7Hz)	3,71	3,55	3,45	3,49	3,76	3,94	2,07	102,0	55,9	74,3	70,5	74,7	61,1	22,7

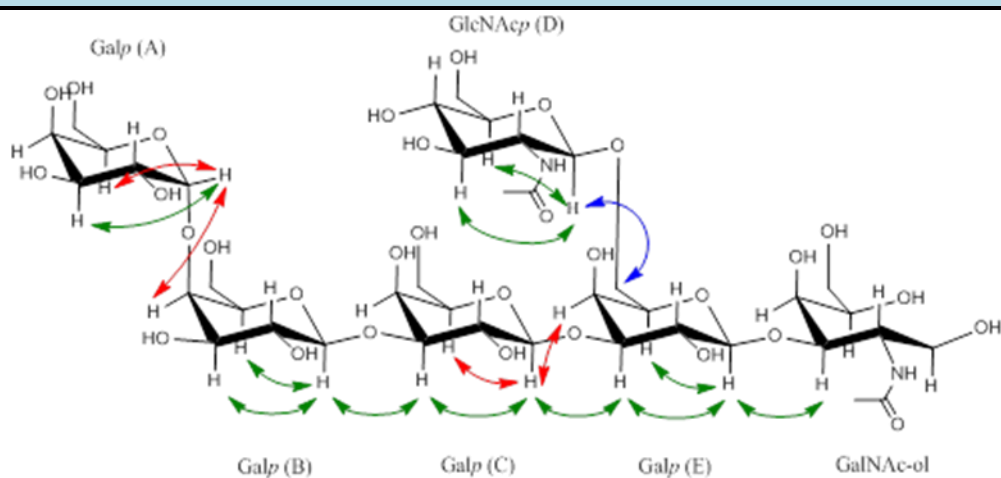


H3_A

Residuo	Desplazamientos químicos ppm y constantes de acoplamiento H ₁ -H ₂														
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6`	NAc	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	NAc
GalNAc-ol	3,73;3,70	4,41	4,09	3,48	4,28	3,70	3,94	2,07	60,8	51,9	77,3	69,3	67,9	71,7	22,7
Galp(A)	4,97(3,9Hz)	3,85	3,93	4,04	4,36	3,85	*	-	101,8	69,3	69,8	69,8	71,7	61,3	-
Galp(B)	4,70 (7,4Hz)	3,66	3,77	4,05	3,74	3,86	3,89	-	105,6	71,7	73,1	78,3	75,9	61,3	-
Galp(C)	4,53 (7,8 Hz)	3,77	3,85	4,17	3,74	3,65	*	-	104,6	70,7	82,5	68,8	75,9	61,3	-
Galp(D)	4,94 (4,0Hz)	3,84	3,94	4,04	4,36	3,72	3,79	-	100,8	*	*	69,3	71,7	61,3	-
Galp(E)	4,53 (7,8Hz)	3,58	3,74	4,05	3,76	3,85	3,90	-	103,7	71,6	72,1	77,7	75,9	60,8	-
GlcNAcp(F)	4,63 (7,2Hz)	3,74	3,65	3,74	3,59	3,87	4,00	2,07	102,7	56,1	73,1	79,7	75,4	61,3	22,7

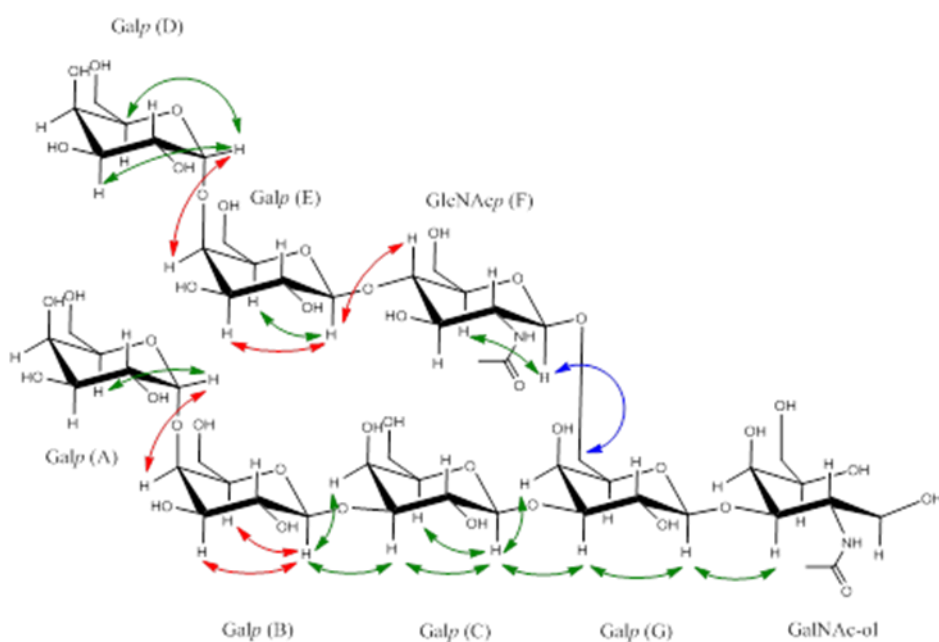


Tabla 7: Continuación



H7_A

Residuo	Desplazamientos químicos ppm y constantes de acoplamiento H ₁ -H ₂														
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'	NAc	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	NAc
GalNAc-ol	3,71;3,78	4,39	4,05	3,54	4,16	3,65	3,68	2,06	60,1	51,8	77,7	69,2	69,8	63,1	22,7
Galp(A)	4,98 (3,4Hz)	3,87	3,92	4,04	4,38	3,84	3,95	-	100,7	69,2	69,1	69,2	71,1	60,5	-
Galp(B)	4,70 (7,8Hz)	3,67	3,77	4,05	3,74	3,86	3,66	-	104,4	71,3	72,4	77,6	75,0	60,7	-
Galp(C)	4,68 (7,4Hz)	3,83	3,87	4,18	3,72	3,78	*	-	104,4	70,6	82,1	68,7	75,0	61,3	-
GlcNAcp(D)	4,60 (8,7Hz)	3,71	3,57	3,45	3,48	3,77	3,94	2,07	101,6	55,8	74,1	71,1	76,2	61,0	22,7
Galp(E)	4,55 (8,0Hz)	3,74	3,84	4,18	3,89	*	3,99	-	103,5	70,6	81,6	68,7	73,8	69,4	-

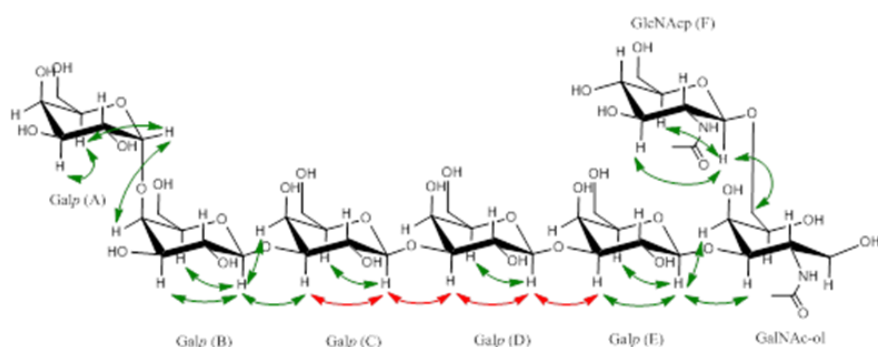


IJ8_A

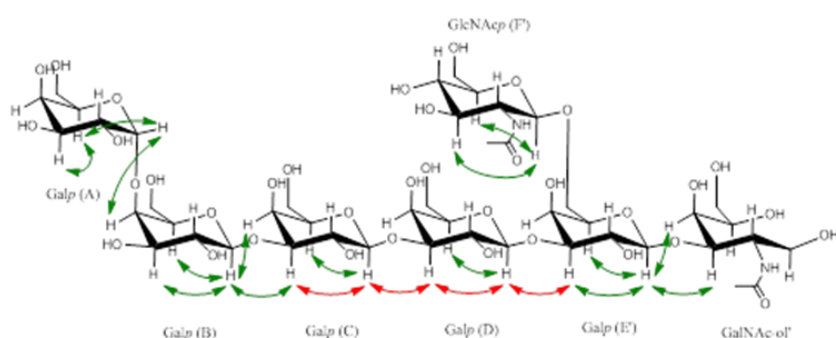
Residuo	Desplazamientos químicos ppm y constantes de acoplamiento H ₁ -H ₂														
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'	NAc	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	NAc
GalNAc-ol	3,72; 3,80	4,40	4,07	3,53	4,16	3,68	3,65	2,06	61,3	51,9	77,8	69,3	69,8	63,2	22,7
Galp(A)	4,97 (3,9Hz)	3,88	3,91	4,05	4,38	3,83	3,75	-	100,8	69,7	69,8	69,3	71,1	60,7	-
Galp(B)	4,71 (7,7Hz)	3,68	3,76	4,06	3,77	3,86	*	-	104,7	71,6	72,6	77,7	75,4	60,4	-
Galp(C)	4,68 (7,8Hz)	3,82	3,86	4,17	3,71	3,78	*	-	104,6	71,2	82,5	68,8	75,4	61,3	-
Galp(D)	4,95 (3,8Hz)	3,86	3,91	4,05	4,36	3,71	*	-	100,8	69,3	69,7	69,3	71,3	60,8	-
Galp(E)	4,53 (7,5Hz)	3,60	3,76	4,04	*	*	*	-	103,7	71,2	72,6	77,8	*	*	-
GlcNAcp(F)	4,62 (7,2Hz)	3,76	3,67	3,74	3,60	3,88	4,01	2,07	101,7	55,6	72,1	79,2	75,4	60,8	22,7
Galp(G)	4,55 (7,5Hz)	3,76	3,84	4,18	3,82	3,83	3,98	-	103,6	70,7	82,0	68,8	73,0	68,7	-



Tabla 7: Continuación



IJ10_A



IJ10_{A'}

Residuo	Desplazamientos químicos ppm y constantes de acoplamiento H ₁ -H ₂														
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'	NAc	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	NAc
GalNAc-ol	3,71/3,85	4,40	4,09	3,46	4,28	3,64	3,69	2,06	60,7	52,1	76,7	69,5	68,1	71,1	22,7
GalNAc-ol**	3,71/3,85	4,40	4,09	3,46	4,28	3,65	3,68	2,06	60,7	52,1	76,7	69,5	68,1	63,4	22,7
Galp(A)	4,98 (3,9Hz)	3,85	3,93	4,03	4,39	3,74	*	-	101,0	69,0	69,6	69,6	71,4	61,4	-
Galp(B)	4,72 (7,5Hz)	3,66	3,76	4,05	3,77	3,90	3,84	-	105,3	71,4	72,8	78,0	75,6	60,8	-
Galp(C)	4,69 (7,0Hz)	3,80	3,88	4,17	3,72	3,78	*	-	104,8	70,9	82,7	69,0	75,2	61,5	-
Galp(D)	4,69 (7,7Hz)	3,75	3,88	4,22	3,72	3,78	*	-	104,8	70,9	82,7	69,0	75,2	61,5	-
Galp(E)	4,55 (7,7Hz)	3,72	3,85	4,17	3,77	3,76	*	-	103,9	71,4	82,7	69,0	75,6	61,5	-
Galp(E')**	4,55 (7,7Hz)	3,72	3,85	4,17	3,89	3,98	3,88	-	102,3	71,4	82,7	69,0	74,2	70,0	-
GlcNAc (F, F')**	4,60 (7,9Hz)	3,72	3,56	3,46	3,46	3,77	3,96	2,07	102,0	55,9	74,7	70,4	76,6	61,0	22,7

Los desplazamientos químicos de ¹³C se obtuvieron a partir de espectros de HSQC, por lo que no se pudo obtener los desplazamientos de grupos carbonilo. Las constantes de acoplamiento se presentan entre paréntesis, exclusivamente para átomos H-1 de residuos monosacáridos. Las correlaciones se presentan como flechas sobre las estructuras; estas se derivan de espectros de NOE (ROESY). Las flechas verdes indican correlaciones entre dos protones perfectamente resueltos, y las flechas rojas indican correlaciones entre un protón bien resuelto y un protón cuya señal se superpone a la de otro protón. Adicionalmente, las flechas azules destacan el acoplamiento entre el protón anomérico de un residuo GlcNAc de una ramificación y el protón H₆ de un residuo de Galp del esqueleto principal, es decir, la sustitución correspondiente al nuevo motivo estructural (para glicanos de la CL de *E. granulosus*) elucidado en el presente trabajo.

* No se pudo determinar el desplazamiento químico debido a superposición de señales.

** Se asignaron a partir de una misma muestra los desplazamientos de 2 oligosacáridos, denominados IJ10 y IJ10', los cuales solo difieren en la ubicación del residuo de GlcNAc.



Por último se elucidó completamente la subfracción IJ10, la cual contiene 3 glicanos distintos por MS^2 , de los cuales el ión $m/z=1595,8$ (IJ10_A/ IJ10_{A'}, de secuencias Hex₅[HexNAc]HexNAc-ol y Hex₄[HexNAc]HexHexNAc-ol respectivamente) es considerablemente más intenso que el ión $m/z=1840,9$, que correspondería a un glicano minoritario dentro de esta sub-fracción (IJ10_B, de secuencia Hex₄[HexNAc]Hex[HexNAc]HexNAc-ol) (**Tabla 4** y **Figura 26**). Esta mezcla se vio reflejada en el análisis de posiciones de sustitución, en señales de GalNAc-ol 3,6 disustituido por un lado (pertenecientes al IJ10_A y/o IJ10_B), y GalNAc-ol 3 sustituido y Gal 3,6 disustituida por otro (pertenecientes IJ10_{A'} y/o IJ10_B, **Tabla 6**), aparte de las señales de Gal terminal, Gal 3 sustituida y Gal 4 sustituida, presentes en los tres glicanos.

En el espectro unidimensional de protón de la sub-fracción IJ10, se observaron dobletes para los protones anoméricos de los residuos Galp A, Galp B, Galp C, y Galp D (4,69 ppm-4,98 ppm, nótese que Galp C, y Galp son dos dobletes intercalados), un doblete del protón anomérico de GlcNAcp F (4,60 ppm), y dos dobletes intercalados a 4,55 ppm (**Figura 27A**). De esta forma, parecerían existir 7 residuos piranósicos, que podrían corresponder a la secuencia del glicano IJ10_B (**Tabla 4**), lo que no sería consistente con la baja intensidad de su ión pseudomolecular por espectrometría de masas (**Figura 26**). Asignando una integración de 1 al protón anomérico de Galp A, las señales a 4,54 ppm poseen una integración cercana a 1, es decir que corresponden en su totalidad a un protón y no a dos, lo que sugiere fuertemente la presencia de dos componentes mayoritarios en la fracción, que difieren ligeramente en el entorno químico del residuo Galp E (cuyo anomérico origina la señal compleja centrada a 55 ppm). Al observar el espectro de HSQC de esta muestra (**Figura 27C**), se observan dos pares de señales correspondientes a la posición 6 de un residuo de GalNAc-ol 6-sustituido (71,1 ppm), lo que sería consistente con IJ10_B, pero también se observan las señales de la posición 6 de un residuo de GalNAc-ol que **no presenta sustitución en 6** (C₆ a 63,4 ppm). La presencia simultánea de ambos juegos de señales mutuamente excluyentes es, nuevamente, indicativa de que existen dos al menos glicanos principales en la muestra, uno derivado de *core* 1 y otro de *core* 2, que podrían corresponder a IJ10_A e IJ10_{A'}. A partir del espectro de HSQC también se determinaron dos juegos de señales correspondientes a la posición 6 de Galp E, una de ellas con desplazamiento de C₆ de 61,5 ppm (no sustituida, proveniente de IJ10_A) y otra de 70,0 ppm (sustituida, proveniente de IJ10_{A'}) (**Tabla 7**).

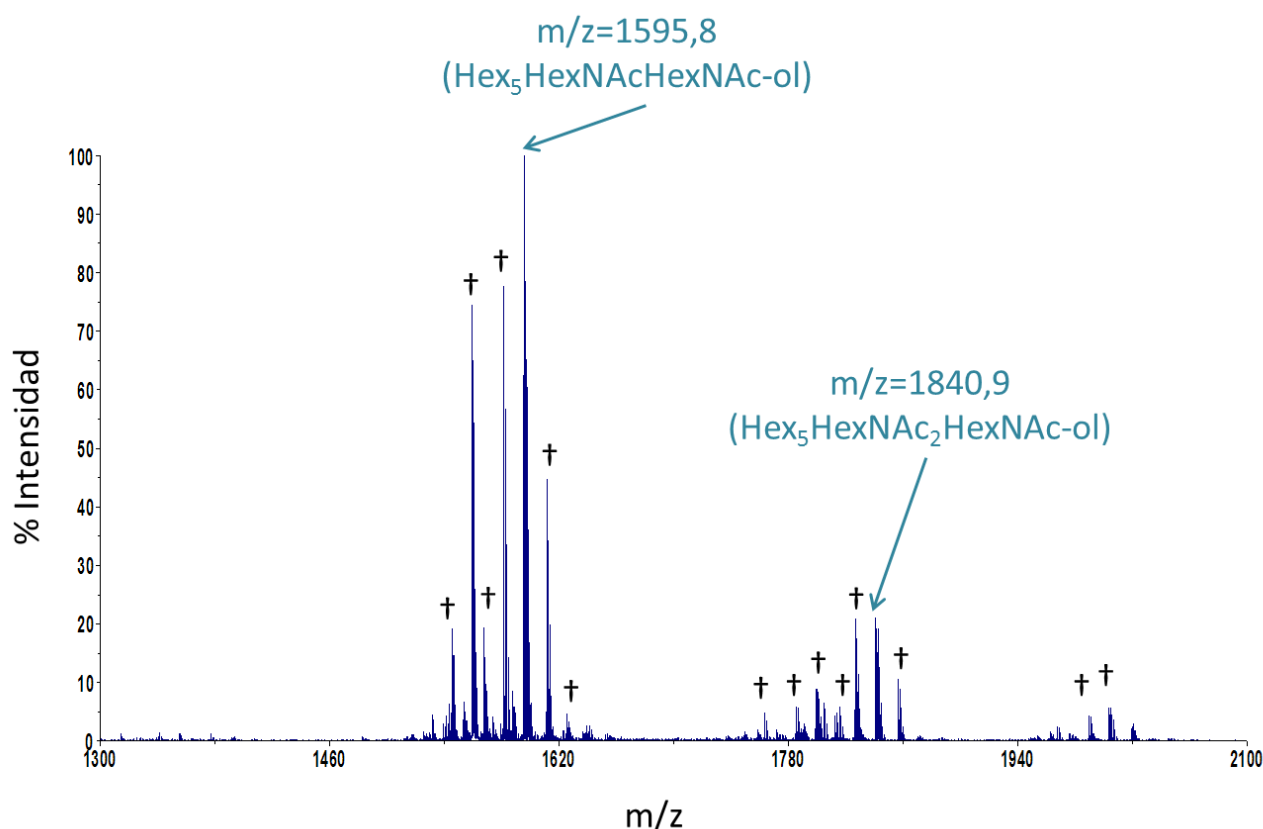


Figura 26: Espectro de MS¹ de la sub-fracción IJ10. Se observa el ión de $m/z = 1599,8$ correspondiente a los glicanos IJ10_A e IJ10_{A'} y el ión de $m/z = 1840,9$ correspondiente al glicano IJ10_B, con un 21% de la intensidad del pico 1599,8.

†: no correspondiente a O-glicanos completamente permetilados de fórmula general $\text{Hex}_n\text{HexNAc}_m\text{HexNAc-ol}$ ($n \geq 1, m \geq 0$)

Dado que la única diferencia entre IJ10_A e IJ10_{A'} radica en la posición de la segunda antena, en el residuo de GalNAc-ol o sobre la primer Gal desde el extremo reductor, los entornos químicos de los residuos A – D son prácticamente idénticos, lo que implica que las señales de estos residuos en uno y otro glicano serían idénticas. De este modo las relaciones de integración de estos residuos entre sí serían siempre cercanas a 1, independientemente de la relación de abundancia de IJ10_A e IJ10_{A'}. Lo mismo se cumpliría para el residuo GlcNAc F. Por otro lado, las señales a 4,55 ppm corresponden al primer residuo de Gal desde el extremo reductor, cuyo desplazamiento del protón anomérico se corre muy levemente dependiendo de que exista o no sustitución en la posición 6. La suma de las integraciones de las señales a 4,55 ppm se mantendría cercana a la del residuo Galp A, independientemente de las proporciones de ambos isómeros en la mezcla. Nótese que la relación



de abundancia entre IJ10_A e IJ10_{A'} no se puede estimar por espectrometría de masas ya que ambos glicanos tienen igual masa.

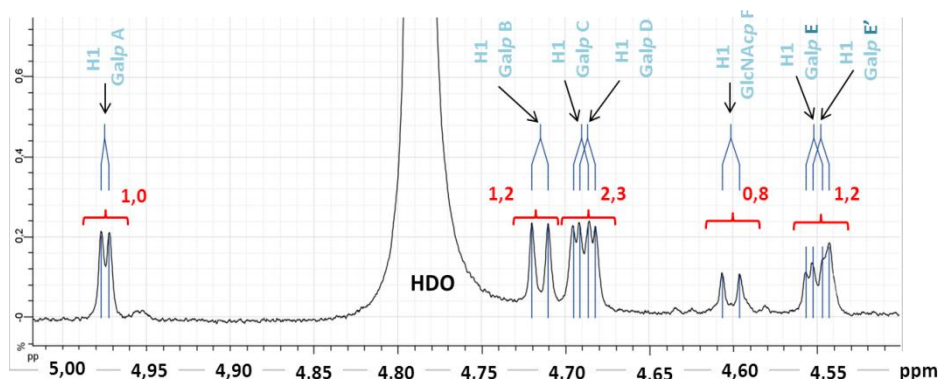
Alternativamente, si las señales se debieran a IJ10_B más IJ10_{A'}, la integración de la señal de GlcNAc_F a 4,60 ppm sería mayor a la del residuo de Gal_p A, ya que provendría del único residuo de GlcNAc_F de IJ10_{A'} más los dos residuos de GlcNAc_F de IJ10_B. Como se observa en la [Figura 27A](#), la integración del residuo GlcNAc_F es de hecho menor a la de Gal_p A, por lo que se descarta que IJ10_B sea responsable de las señales del espectro. Esto es consistente con la menor intensidad de la señal de IJ10_B en MS¹ ([Figura 26](#)).

Como confirmación adicional de esta hipótesis, en el espectro monodimensional de protón se observa que existen tres señales a 2,056, 2,068 y 2,075 ppm, correspondientes a protones de grupos acetamido ([Figura 27B](#)). La integración de estas tres señales en conjunto es seis veces mayor a la del protón anomérico de Gal_p A (4,98 ppm), lo que corresponde a 2 grupos acetamido, que corresponderían a un residuo de GAlNAc-ol y a un residuo de GlcNAc_F en cada molécula, ponderados por la abundancia relativa de cada molécula. Si IJ10_B fuese un componente predominante de la fracción, la integración de estas señales debería ser superior a 6, ya el este glicano posee tres *N*-acetilhexosaminas.

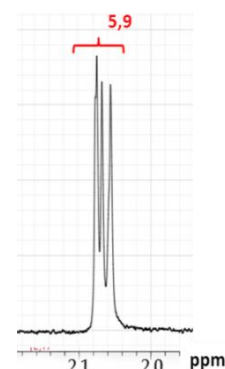
En suma, los desplazamientos hallados para esta muestra son consistentes con la existencia de dos moléculas de similar abundancia, ambas con 4 residuos Gal_p(β1-3) en el esqueleto principal (uno de ellos perteneciente al *core*) y *cap* de Gal_p(α1-4), pero una de ellas portando un residuo de GlcNAc_F(β1-6) como parte del *core* 2 (IJ10_A) y la otra portando el mismo tipo de residuo como ramificación de la cadena principal (IJ10_{A'}), lo que constituye otro ejemplo de este nuevo motivo estructural reportado en esta Tesis. En este caso no fue posible confirmar la ramificación de IJ10_{A'} por acoplamiento en el espacio, pero sí se verificó el aumento en el desplazamiento de C₆ del residuo disustituido (Gal_p E').



(A)



(B)



(C)

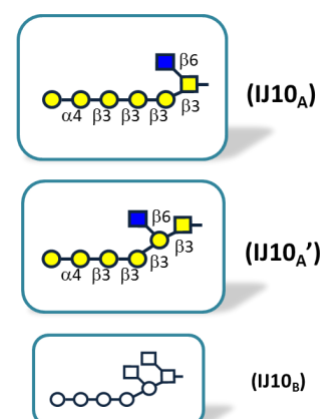
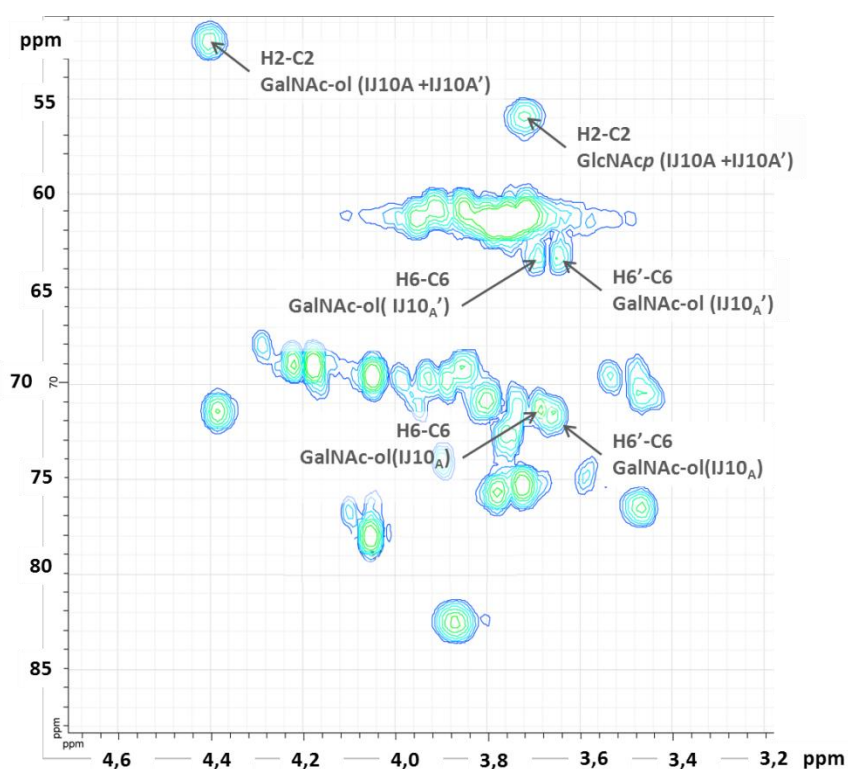
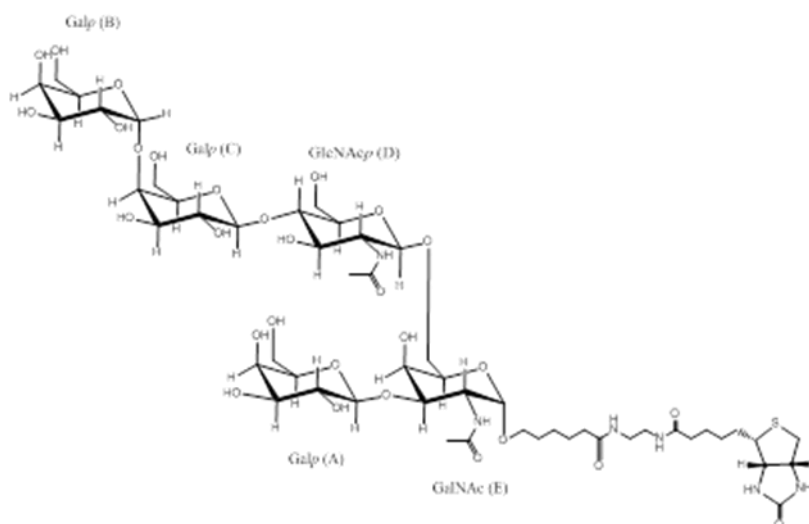


Figura 27 : Elucidación por NMR de los componentes de la sub-fracción IJ10. Espectro de protón, en la región de los protones anoméricos (A), y en la región de los protones del grupo acetamido (B). En rojo se indican las integraciones de las señales, tomando como referencia (1) el doblete a 4,98 ppm. (C) Espectro HSQC ampliado en la región de 3,2 - 4,6 ppm en ^1H y 50 - 85 ppm en ^{13}C (lo que excluye a las señales de los anoméricos y del grupo acetamido), indicando las señales de posiciones 6 de los dos componentes mayoritarios (IJ10_A e IJ10_{A'}). Se resaltan también las señales de las posiciones 2 de *N*-acetilhexosaminas (GlcNAcp y GalNAc-ol).



Adicionalmente, como dato confirmatorio para aquellas estructuras para las que se determinó la presencia del motivo P1 ($\text{Galp}(\alpha\text{-}1\text{-}4)\text{Galp}(\beta\text{-}1\text{-}4)\text{GlcNAcp}$), H3_A e $\text{I}8_A$, se estudió por NMR estructura del glicano biotinilado 5 que contiene el motivo (sobre el *core*), mediante $1\text{D-}^1\text{H}$ y 2D-COSY (Figura 15A). Los desplazamientos (Tabla 8) coinciden con los reportados previamente para el glicano G1 del trabajo precedente a esta Tesis [70]. Además, para el motivo P1, coinciden razonablemente con los reportados en esta Tesis para los productos H3_A e $\text{I}8_A$. Esto constituye una confirmación adicional de la elucidación estructural del motivo P1 en *O*-glicanos de la CL de *E. granulosus*.

Tabla 8: Desplazamientos de ^1H del glicano sintético biotinilado 5.



Residuo	Desplazamientos químicos (ppm)					
	H-1	H-2	H3	H4	H5	H6
Galp(A)	4,47 (7,9Hz)	3,55	3,63	3,93	3,75	*
Galp(B)	4,96 (4,1Hz)	3,87	3,86	4,04	4,36	3,71
Galp(C)	4,53 (8,2Hz)	3,61	3,75	4,06	*	*
GlcNAcp(D)	4,57 (8,1 Hz)	3,77	3,68	3,74	3,57	3,84
GalNAcp	4,91 (3,9Hz)	*	*	*	*	*

*: No determinado

Los desplazamientos químicos de los protones anoméricos H_1 y sus constantes de acoplamiento con H_2 se determinaron a partir del espectro $1\text{D-}^1\text{H}$. Los desplazamientos químicos de H_2 se determinaron en el espectro 2D-COSY , identificados por su acoplamiento con sus respectivos H_1 . Los restantes desplazamientos no se identificaron *de novo*, ya que no se obtuvieron espectros de 2D-TOCSY , HSQC ni 2D-ROESY de buena calidad. En cambio, se tomaron los valores del oligosacárido-alditol homólogo G1 [70] y se verificaron los acoplamientos esperados en el espectro 2D-COSY .



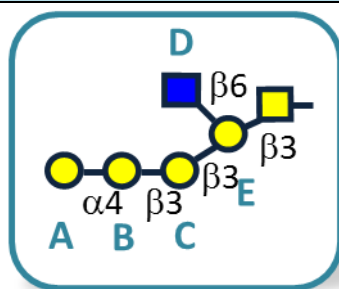
Se realizó también una búsqueda de los desplazamientos químicos de protón y carbono para todos los glicanos elucidados, en *Glycosciences.de* [88]. En la **Tabla 9** se presentan los desplazamientos estimados y las diferencias con los valores experimentales hallados en esta Tesis. Debe tenerse en cuenta que los desplazamientos estimados se generan como promedio de las estructuras reportadas en la base de datos; en algunos casos el motivo estructural buscado está poco representado en la base de datos, por lo que el resultado toma en consideración estructuras con entornos químicos similares, pero no idénticos.

En términos generales, los desplazamientos estimados concuerdan con los experimentales, en el caso de protón con diferencias menores a 0,05 ppm y para carbono menores a 1,0 ppm. Se observa la misma tendencia de que los desplazamientos químicos de los protones anoméricos de los residuos de la cadena principal disminuyan desde el extremo no reductor al reductor, y que los de los protones H₄ de estos residuos aumenten en este sentido. Una diferencia curiosa entre los datos experimentales y los generados por la base de datos es el caso del residuo sub-terminal sustituido en posición 4. Si bien se trata de un residuo de anomeridad β , se encuentra reportado con un valor de H₁ de 5,03 ppm, característico de un protón α ; de modo similar, el desplazamiento de carbono en este residuo es menor al experimental, pudiendo coincidir con una anomeridad α tanto como β . Esta estimación proviene de una única estructura reportada [93], a diferencia de otras estimaciones que corresponden al promedio de varias estructuras reportadas independientemente. El desplazamiento experimental, en todos los glicanos elucidados en esta Tesis y en el antecedente directo de la misma [70] es de ~4,70 ppm, y la anomeridad se confirmó por la constante de acoplamiento H₁-H₂ de 7,4-7,8 Hz. Esto sugiere que podría haber un error en la asignación del residuo reportado en la base de datos.

También se verificó en *Glycosciences.de* el aumento del desplazamiento de carbono de las posiciones sustituidas, con excepción de la sustitución en posición 6, para la cual la base de datos predice valores similares a los de residuos sin esta sustitución y 7-8 ppm menores a los valores experimentales obtenidos.



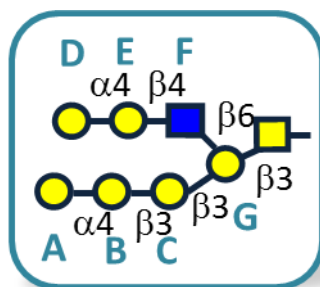
Tabla 9: Continuación



(H7_A)

Residuo	Desplazamientos químicos (ppm)											
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Galp(A)	4,95	3,85	3,93	4,04	4,34	3,76	101,4	69,2	70,0	69,9	71,8	61,5
Galp(B)	5,03	3,72	3,95	4,05	3,79	3,85	101,9	77,5	73,8	79,8	75,7	60,9
Galp(C)	4,62	3,61	3,83	4,19	3,69	3,78	104,9	71,1	82,9	69,5	75,9	61,9
GlcNAcp(D)	4,59	3,76	3,74	3,63	3,60	3,94	101,9	54,4	74,4	70,7	76,7	61,6
Galp(E)	4,54	3,56	3,88	4,19	3,69	3,94	104,6	70,4	82,4	69,3	74,9	60,8

esiduo	Diferencia absoluta (estimados-experimental, ppm)											
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Galp(A)	-0,03	-0,02	0,01	0,00	-0,04	-0,08	0,7	0,0	0,9	0,6	0,7	1,0
Galp(B)	0,33	0,05	0,18	0,00	0,05	-0,01	-2,5	6,2	1,4	2,2	0,7	0,2
Galp(C)	-0,06	-0,22	-0,04	0,01	-0,03	0,00	0,5	0,5	0,8	0,8	0,9	0,6
GlcNAcp(D)	-0,01	0,05	0,17	0,18	0,13	0,00	0,3	-1,4	0,3	-0,4	0,5	0,5
Galp(E)	-0,01	-0,19	0,04	0,01	-0,20	-	1,1	-0,2	0,8	0,6	1,1	-8,6



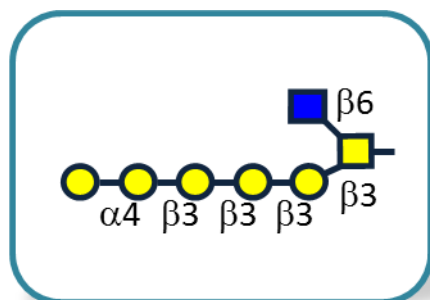
(IJ8_A)

Residuo	Desplazamientos químicos estimados (ppm)											
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Galp(A)	4,95	3,85	3,93	4,04	4,34	3,70	101,4	69,2	70,0	69,9	71,8	61,5
Galp(B)	5,03	3,72	3,95	4,05	3,79	3,90	101,9	77,5	73,8	79,8	75,7	60,9
Galp(C)	4,62	3,61	3,83	4,19	3,69	3,78	104,9	71,1	82,9	69,5	75,9	61,9
Galp(D)	4,95	3,85	3,93	4,04	4,34	3,70	101,4	69,2	70,0	69,8	71,8	61,5
Galp(E)	4,57	3,53	3,73	4,03	3,89	3,90	103,8	72,2	74,3	78,1	75,6	61,4
GlcNAcp(F)	4,62	3,76	3,74	3,63	3,60	3,94	101,7	55,6	73,3	81,6	75,3	61,2
Galp(G)	4,54	3,55	3,88	4,19	3,69	3,94	105,6	70,4	82,4	69,3	74,9	60,9

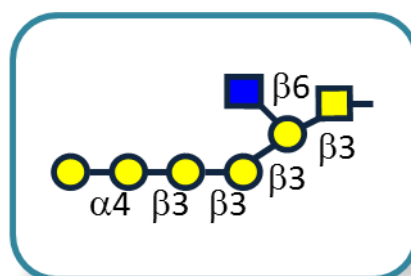
Residuo	Diferencia absoluta (estimados-experimental, ppm)											
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Galp(A)	-0,02	-0,03	0,02	-0,01	-0,04	-0,05	0,6	-0,5	0,2	0,5	0,7	0,8
Galp(B)	0,32	0,04	0,19	-0,01	0,02	0,04	-2,8	5,9	1,2	2,1	0,3	-
Galp(C)	-0,06	-0,21	-0,03	0,02	-0,02	0,00	0,3	-0,1	0,4	0,7	0,5	0,6
Galp(D)	0,00	-0,01	0,02	-0,01	-0,02	-0,01	0,6	-0,1	0,3	0,5	0,5	0,7
Galp(E)	0,04	-0,07	-0,03	-0,01	-	-	0,0	1,0	1,7	0,3	-	-
GlcNAcp(F)	0,00	0,00	0,07	-0,11	0,00	0,06	0,0	0,0	1,2	2,4	-0,1	0,4
Galp(G)	-0,01	-0,21	0,04	0,01	-0,13	-0,04	2,0	-0,3	0,4	0,5	1,9	-7,9



Tabla 9: Continuación



(IJ10_A)



(IJ10_A')

Residuo	Desplazamiento químico (ppm)											
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Galp(A)	4,95	3,85	3,93	4,04	4,34	3,70	101,4	69,2	70,0	69,9	71,8	61,5
Galp(B)	5,03	3,72	3,95	4,05	3,79	3,90	101,9	77,5	73,8	79,8	75,7	60,9
Galp(C)	4,62	3,61	3,83	4,19	3,69	3,78	104,9	71,1	82,9	69,5	75,9	61,9
Galp(D)	4,62	3,61	3,83	4,19	3,69	3,78	104,9	71,1	82,9	69,5	75,9	61,9
Galp(E)	4,55	3,56	3,83	4,19	3,69	3,64	104,6	70,4	83,0	69,6	74,9	60,7
Galp(E')	4,54	3,56	3,88	4,19	3,69	3,94	104,6	70,4	82,4	69,3	74,9	60,9
GlcNAcp (F)	4,60	3,75	3,70	3,72	3,60	4,00	102,0	55,9	73,2	79,3	75,7	61,0
GlcNAcp (F')	4,59	3,76	3,74	3,62	3,61	3,94	101,9	54,4	74,4	70,7	76,7	61,6

Residuo	Diferencia absoluta (estimados-experimental, ppm)											
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Galp(A)	-0,03	0,00	0,00	0,01	-0,05	-0,04	0,4	0,2	0,4	0,3	0,4	0,1
Galp(B)	0,31	0,06	0,19	0,00	0,02	0,00	-3,4	6,1	1,0	1,8	0,1	0,1
Galp(C)	-0,07	-0,19	-0,05	0,02	-0,03	0,00	0,1	0,2	0,2	0,5	0,7	0,4
Galp(D)	-0,07	-0,14	-0,05	-0,03	-0,03	0,00	0,1	0,2	0,2	0,5	0,7	0,4
Galp(E)	0,00	-0,16	-0,02	0,02	-0,08	-0,12	0,7	-1,0	0,3	0,6	-0,7	-0,8
Galp(E')	-0,01	-0,16	0,03	0,02	-0,20	-0,04	0,7	-1,0	-0,3	0,3	0,7	-9,1
GlcNAcp (F, F')	0,00	0,03	0,14	0,26	0,14	0,23	0,0	0,0	-1,5	8,9	-0,9	0,0

Los desplazamientos químicos de ¹H y ¹³C predichos por la base de datos Glycosciences.de se basan en los promedios de los valores de residuos monosacáridos reportados que poseen un entorno químico igual o similar a los estudiados. Algunos de los valores provienen de una única estructura reportada (por ejemplo los correspondientes a residuos Galp B, en todos los casos) o de residuos monosustituidos en lugar de disustituidos (los desplazamientos de H₆ y C₆ de Gal 3,6 disustituida en H1_A, H7_A, IJ8_A e IJ10_A' están estimados a partir de un residuo de Gal 6 monosustituida).

En resumen, se elucidaron completamente 6 nuevos *O*-glicanos de la CL de *E. granulosus*, que presentan estructuras relacionadas a las descritas previamente para los *O*-glicanos menores de la CL, pero agregan dos motivos estructurales nuevos: la ramificación con GlcNAcp(β1-6) (en los glicanos H1_A, H7_A e IJ10_A') y la decoración de esta con un disacárido de galabiosa Galp(α1-4)Galp(β1-4) para formar un motivo P1 (en IJ8_A).



4.4 Determinación de la especificidad del anticuerpo monoclonal E492

Como se explicó en la introducción, se sabía que el anticuerpo monoclonal E492 era inhibible por $\text{Galp}(\alpha 1-4)\text{Galp}$ [74]. Esto podía implicar, en el contexto del glicoma de la CL, que reconociera al extremo no reductor del esqueleto principal terminado en un *cap* de $\text{Galp}(\alpha 1-4)$ o al motivo de galabiosa presente como decoración del residuo de $\text{GlcNAcp}(\beta 1-6)$ del *core* 2 o de las ramificaciones. El reconocimiento podría ser exclusivamente de los dos residuos del extremo no reductor, en cuyo caso ambos motivos podrían ser reconocidos indistintamente, o abarcar uno o más residuos adicionales y por tanto ser específico de uno de los dos ($\text{Galp}(\alpha 1-4)\text{Galp}(\beta 1-3)\text{Galp}$ del esqueleto principal o el motivo P1, $\text{Galp}(\alpha 1-4)\text{Galp}(\beta 1-4)\text{GlcNAcp}$).

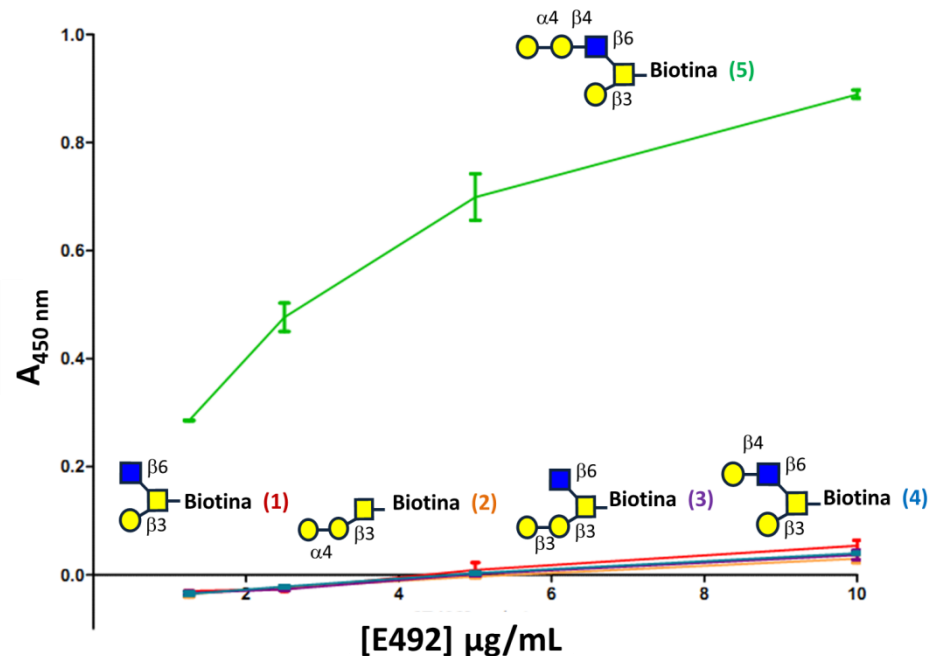
Para establecer cuál de los motivos estructurales glucídicos presentes en la CL es reconocido por el anticuerpo monoclonal E492, se utilizó un panel de 5 oligosacáridos sintéticos basados en glicanos elucidados de la CL de *E. multilocularis* [67, 68], en un ensayo de tipo ELISA directo (**Figura 28A**). A diferencia de los oligosacáridos liberados del material hidático, estos glicanos poseen su extremo reductor sin reducir, en forma de α piranósidos conjugados a una aglicona compuesta por biotina y un brazo espaciador (glicano-Biot, para abreviar), lo cual permite su unión a la placa sensibilizada con estreptavidina. Debe destacarse que este panel (**Figura 15**) incluye un motivo que prácticamente no está representado en la CL de *E. granulosus* (con la notable excepción de un glicano minoritario de origen bovino, $\text{H3}_B/\text{IJ3}_B'$; **Tabla 4**): el motivo $\text{Galp}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-6)$ (sin decorar con $\text{Galp}(\alpha 1-4)$), presente en el glicano sintético 4. Debe también destacarse que los glicanos del panel que portan el motivo $\text{Galp}(\alpha 1-4)$ terminal o “*cap*” (glicanos 2 y 3) lo tienen en un contexto ligeramente distinto, ya que en *E. granulosus* no se ha hallado presente directamente sobre el residuo de Gal del *core* sino solamente sobre residuos más externos (glicanos E3_A , F2_A , G2_A y G7_A en la **Figura 18**, y H1_A , H3_A , H7_A , IJ8_A , IJ10_A e $\text{IJ10}_A'$ en la **Tabla 7**)

El anticuerpo reconoció, en forma dependiente de la concentración, exclusivamente al glicano 5 ($\text{Galp}(\beta 1-3)[\text{Galp}(\alpha 1-4)\text{Galp}(\beta 1-4)\text{GlcNAcp}(\beta 1-6)]\text{GalNAcp}(\alpha 1-)\text{R}$, siendo R el grupo mostrado en la **Figura 15A**). Para confirmar la especificidad del anticuerpo, se realizó un ensayo de competencia utilizando tres glicanos solubles unidos a TMSEt: un control negativo (*core* 2, glicano 3'), un control positivo (glicano 2', idéntico en su porción glucídica al glicano 5 unido a la placa), y un glicano con un cambio en la anomeridad de uno de los residuos del posible epítipo (glicano 1'). Como se



observa en la **Figura 28B**, el anticuerpo no es indiferente a la anomericidad de los residuos que componen el epítotope, ya que su unión al glicano 5 que no es inhibible por el glicano 1'. En base a estos ensayos se deduce que el anticuerpo E492 reconoce al motivo de tipo P1, no siendo posible asegurar hasta este punto si el epítotope está restringido al trisacárido $\text{Galp}(\alpha 1-4)\text{Galp}(\beta 1-4)\text{GlcNAcp}(\beta 1-6)$ o abarca adicionalmente al residuo de GalNAc reductor terminal.

(A)



(B)

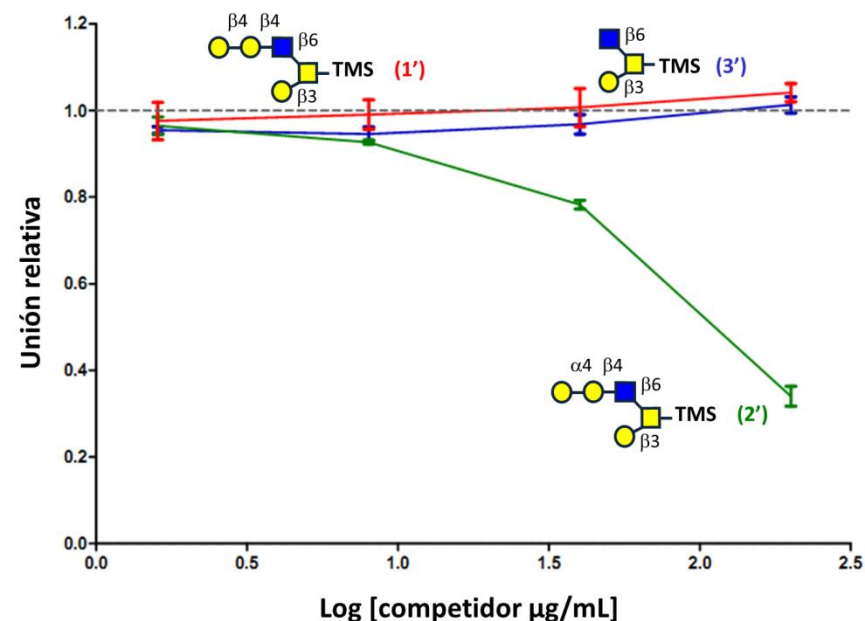


Figura 28: Determinación de la especificidad de el anticuerpo monoclonal E492. (A) Inmunoensayo directo con glicanos sintéticos inmovilizados. De las dos estructuras que presentan $\text{Gal}\alpha 1-4 \text{ Galp}$ terminal, el anticuerpo solo se une a la que lo presenta en el contexto de un motivo P1 (glicano 5). Para todos los glicanos estudiados se utilizó una IgG3 de especificidad irrelevante como control negativo, que no dio ninguna señal (no mostrado). (B) Ensayo de inhibición por glicanos solubles. En A y B se utilizan colores para indicar correspondencia entre las estructuras y las curvas. Las barras corresponden a desviaciones estándar de triplicados en todos los casos. La unión de E492 al glicano 5 en la superficie de la placa se inhibe por el glicano 2' conteniendo el motivo P1, pero no por un glicano (1') en el cual la anomeridad del residuo terminal está invertida. Nótese que la cantidad de glicano soluble necesaria para obtener un 50% de inhibición es relativamente alta, del orden de $100 \mu\text{g/mL}$, debido posiblemente a un fenómeno de avidéz frente al glicano presentado en forma polivalente en la placa.



4.5 Uso del anticuerpo monoclonal E492 como herramienta de elucidación estructural parcial

Habiendo determinado que el epítipo del anticuerpo E492 abarca al motivo $\text{Galp}(\alpha 1-4)\text{Galp}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$ por lo menos, se estudió la reactividad del anticuerpo con sub-fracciones de las fracciones H e IJ de glicanos de la CL (provenientes de material de origen ovino). Dado que a varios de estos productos no se les caracterizó la configuración de sus residuos, sus posiciones de sustitución, ni anomeridades, el anticuerpo podía funcionar como una herramienta de elucidación estructural parcial. De la fracción H de *gel-filtración* se analizaron 7 sub-fracciones (**Figura 29A**), de las cuales 6 inhibieron la unión del anticuerpo al glicano sintético inmovilizado en la placa de forma dependiente de la concentración. Todos los glicanos que resultaron capaces de inhibir la reacción produjeron en MS^2 el fragmento de $m/z = 690,3$, correspondiente a la subestructura $\text{Hex}_2\text{HexNAc}$ (**Tabla 5**).

Es importante destacar que los glicanos H4_A y H9_A (únicos detectables en las correspondientes sub-fracciones), que dan inhibición en el ensayo, presentan el motivo $\text{Hex}_2\text{HexNAc}$ en el contexto de una ramificación por sobre el esqueleto principal. Esto sugiere que el epítipo del anticuerpo **no abarca al residuo de GalNAc del core 2**, sino que está restringido a $\text{Galp}(\alpha 1-4)\text{Galp}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$. Cabe acotar también que los glicanos dominantes de las sub-fracciones H1 e IJ10 (H1_A e $\text{IJ10}_A/\text{IJ10}_A'$ respectivamente), portan el trisacárido $\text{Galp}(\alpha 1-4)\text{Galp}(\beta 1-3)\text{Galp}(\beta 1-3)$, y por ende la falta de inhibición por estas fracciones confirma que el epítipo del anticuerpo E492 **no incluye al cap** $\text{Galp}(\alpha 1-4)$ en ningún contexto, ya sea sobre el residuo de $\text{Galp}(\beta 1-3)$ del *core* (como se demostró anteriormente, **Figura 28A**) ni tampoco abarcando a dos residuos de $\text{Galp}(\beta 1-3)$ del esqueleto principal.

Las sub-fracciones H4 y H5 inhiben la unión a mayor concentración que las demás sub-fracciones que también inhiben; sin embargo esto no se correlaciona con ningún rasgo estructural distintivo, por lo que parece sensato que estas diferencias se deban principalmente a errores en la estimación de la concentración, posiblemente debidos a contaminantes glucídicos no hallados por MS^2 que no porten el motivo P1. El único glicano de la fracción H que no inhibió la unión fue H1_A , que presenta dos HexNAc terminales no decoradas y un *cap* de $\text{Galp}\alpha 1-4$ sobre

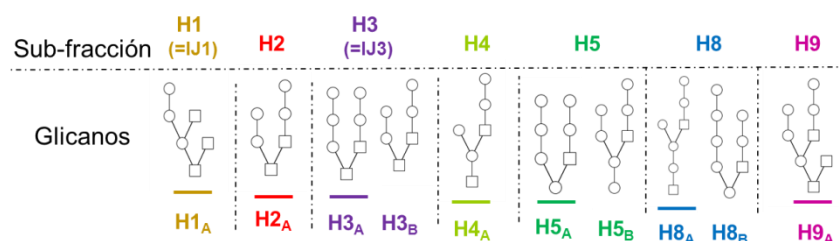
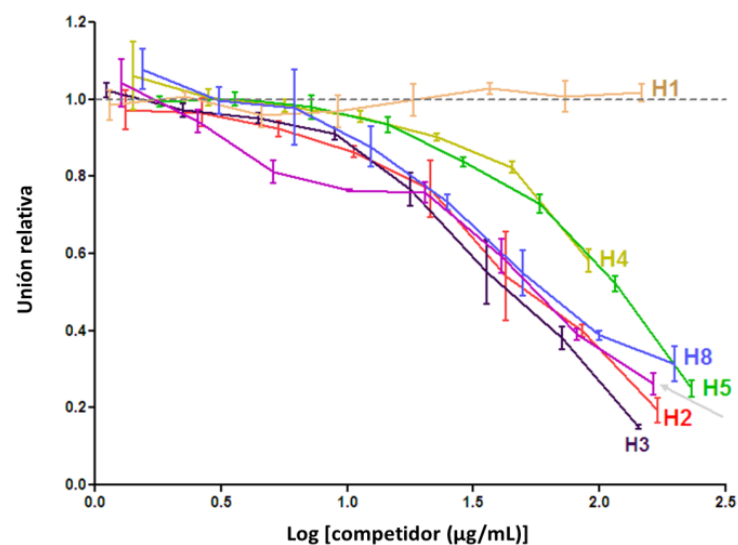


el esqueleto principal (por datos obtenidos en el material de origen bovino), el cual no debería ser reconocido por el anticuerpo.

En cuanto a la fracción IJ, las sub-fracciones IJ7 e IJ10, que son mezclas de homólogos más elongados del glicano H1_A (en algunos casos con extremos reductores Hex-ol), no inhibieron la unión del anticuerpo, en tanto que las sub-fracciones IJ4 e IJ8, que presentan glicanos con el motivo Hex₂HexNAc en forma de ramificaciones sobre el residuo de Hex del *core*, sí lo hicieron (**Figura 29B**).

En suma, los datos de reactividad con este anticuerpo monoclonal son plenamente coincidentes con los datos estructurales previos a nivel de NMR. Además indican que el motivo Hex₂HexNAc encontrado en glicanos estudiados solamente a nivel de MS², tanto sobre el *core* 2 como en ramificaciones sobre el esqueleto principal de Galp(β1-3), corresponde, en todos los casos analizados, al motivo P1, Galp(α1-4)Galp(β1-4)GlcNAcp.

(A)



(B)

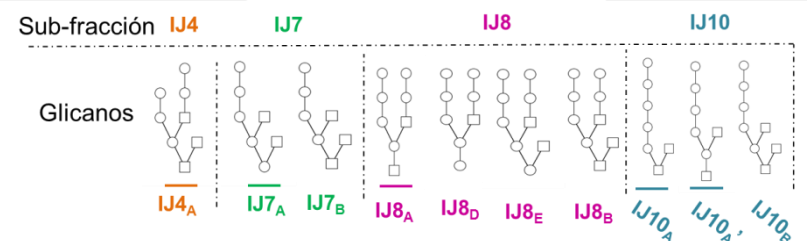
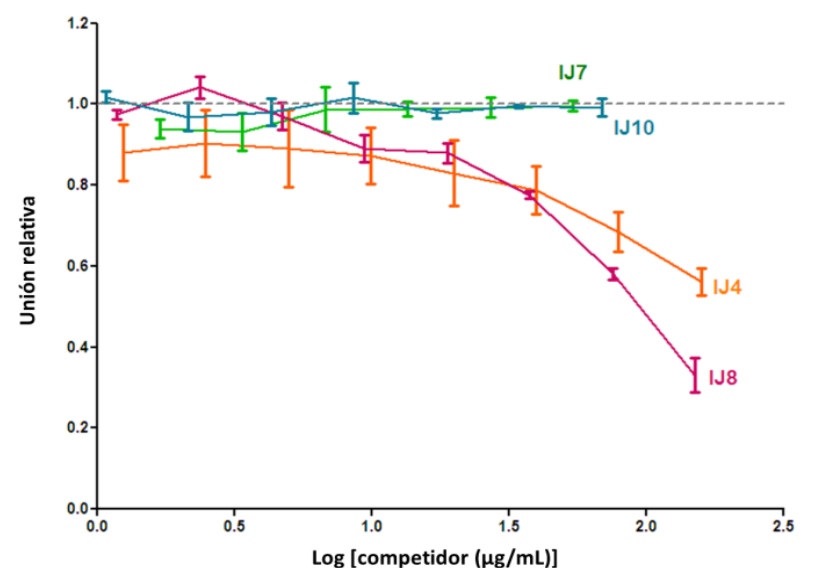
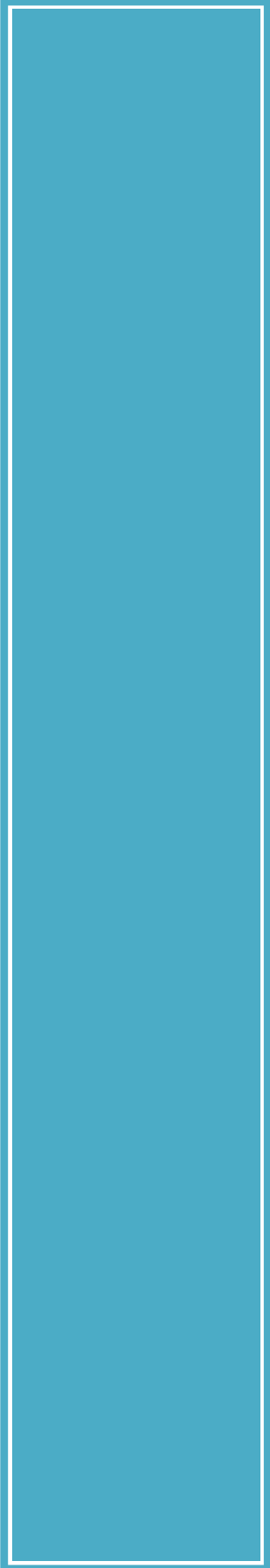


Figura 29: Aplicación del anticuerpo E492 como complemento en la elucidación de oligosacaritos de las fracciones H e IJ de gel-filtración provenientes de hidátides ovinas. (A) Ensayo de inhibición por sub-fracciones de la fracción H. Las sub-fracciones H2-H5, H8 y H9 los cuales presentan glicanos con el trisacárido HexHexHexNAc son capaces de inhibir la unión de E492 al glicano sintético 5, mientras que la sub-fracción H1, que no presenta el motivo, no es capaz de inhibir. (B) Ensayo de inhibición por glicanos solubles de las sub-fracciones IJ. Las sub-fracciones IJ4 e IJ8, que contienen glicanos que portan el trisacárido HexHexHexNAc como ramificación, inhiben la unión de E492, en tanto que IJ7 e IJ10, cuyos componentes no presentan este motivo por MSMS, no muestran inhibición. En ambos casos, nótese que la mayor concentración ensayada para cada glicano es variable, y corresponde a la cantidad disponible de cada uno. Las barras corresponden a desviaciones estándar de triplicados en todos los casos. Se presentan las estructuras de los componentes de cada sub-fracción; los componentes principales se encuentran subrayados.



DISCUSIÓN & CONCLUSIONES



5. Discusión y conclusiones

5.1 Repertorio estructural de O-glicanos de la capa laminar de *Echinococcus granulosus*.

5.1.1 Glicoma de la CL de *E. granulosus* en distintos hospederos

En primer lugar se comparó la distribución de O-glicanos provenientes de hidátides de hospedero bovino y ovino, para establecer si el contexto inflamatorio es una variable que condicione el repertorio estructural del glicoma de la CL. A nivel de distribución de tamaños no se observaron diferencias significativas, siendo predominantes las estructuras de 2-3 residuos monosacáridicos, principalmente los *cores* 1 y 2 desnudos, y el core 1 decorado con un residuo de galactosa, y estando presentes cantidades progresivamente menores de estructuras de mayor porte en ambos hospederos. Esto implica que las estructuras pequeñas son una característica de la CL en sí misma, y no consecuencia de un proceso de glicosilación impedido en el hospedero bovino.

Un estudio más en detalle de la composición de cada fracción por MS² reveló muy pocas diferencias entre hospederos en las fracciones de menor número de residuos, y diferencias puntuales en las fracciones más complejas. Estas diferencias son atribuibles diferencias biológicas individuales, junto con la variabilidad combinatoria producto de las alternativas biosintéticas que se hacen disponibles a partir de un cierto número de residuos, concretamente la posibilidad de introducción y decoración de ramificaciones. Sin embargo, desde una perspectiva más amplia, lo importante a destacar es que en ambos hospederos se observa el repertorio completo de motivos estructurales, representados en similar proporción. Así por ejemplo, los extremos GlcNAc sin decorar hallados en muestras de origen bovino son estructuras normales en la CL y no la consecuencia de menor expresión o actividad de la enzima que transfiere el residuo de β -Gal a la posición 4 de este residuo, lo que interrumpiría la síntesis del motivo P1 en su totalidad. Similarmente, los residuos de β -Gal terminales sobre el esqueleto principal (es decir, esqueletos sin *cap*) también son propios de la CL y no debidos a glicosilación incompleta.

Adicionalmente, se estudió la distribución de tamaños por *gel*-filtración de glicanos liberados de hidátides de otros hospederos naturales (suino, ser humano) y de la infección experimental en el peritoneo de ratón, los cuales tampoco presentaron diferencias con las muestras de origen bovino



(datos no presentados). Más notablemente, al estudiarse las vesículas hijas de hidátides bovinas, las cuales también poseen CL y están protegidas de la reacción inflamatoria del hospedero por encontrarse dentro de la hidátide (véase la [Figura 3](#)), se encontró la misma distribución de tamaños de los *O*-glicanos mucínicos (datos no presentados).

Se concluye entonces que los glicanos elucidados son característicos de la biología del parásito y no una consecuencia de glicosilación incompleta o alterada u otro fenómeno biológico asociado con el hospedero bovino, que es más hostil para el desarrollo de la hidátide de *E. granulosus* de la cepa G1.

5.1.2 Conjunto de posibilidades estructurales de *O*-glicanos la CL

Para completar el universo de posibilidades estructurales presentes en el glicoma de la CL, se elucidaron a completitud 6 nuevas estructuras, que incluyen las ramificaciones previamente no caracterizadas. Con estas nuevas estructuras completamente resueltas y el relevamiento a nivel de MS^2 de aproximadamente 40 sub-fracciones entre ambos hospederos mencionados, el panorama estructural que emerge consiste en:

- *cores* 1 y 2
- elongación sobre el residuo de Gal de los *cores* con $Galp(\beta 1-3)$ para formar un esqueleto principal de galactosas
- terminación del esqueleto principal con un *cap* de $Galp(\alpha 1-4)$
- introducción de ramificaciones de $GlcNAcp(\beta 1-6)$ sobre los residuos $Galp(\beta 1-3)$
- y decoración de los residuos de $GlcNAcp(\beta 1-6)$, del *core* como de las ramificaciones, con el disacárido $Galp(\alpha 1-4)Galp(\beta 1-4)$.

Particularmente, se hallaron las siguientes restricciones en cuanto a la forma de combinación de estos motivos:

- la introducción del *cap* solo se realiza luego de una primera elongación con al menos un residuo de $Gal(\beta 1-3)$, lo cual efectivamente constituye una diferencia con lo observado en *E. multilocularis* [66], como se había supuesto al principio de esta Tesis.
- las ramificaciones con $GlcNAc$ se pueden introducir independientemente del *core* en el que se base el glicano, siendo preferencial el primer residuo de Gal (o sea, el del propio *core* 1 o 2)



como punto de ramificación. En el caso de existir 2 residuos con GlcNAc, estos suelen encontrarse en ramificaciones consecutivas, típicamente una del *core 2* y otra sobre el residuo de Gal del *core*. Dicho de otra manera, los casos en que dos ramificaciones estén espaciadas por un residuo de Gal sin ramificar del esqueleto principal son raros en la CL.

- la introducción del *cap* y de la ramificación no parece nunca realizarse sobre el mismo residuo, es decir que el residuo de galactosa 4,6 disustituida no pertenece al glicoma de la CL.
- las decoraciones de los residuos GlcNAc, tanto del *core 2* como de las ramificaciones externas, consisten en el disacárido Gal(α 1-4)Gal(β 1-4) como unidad, habiéndose hallado evidencia a nivel de MS² en un único caso, excepcional, de decoración por único residuo de Hex (Gal en este contexto).
- En caso de existir más de un residuo de GlcNAc (de una ramificación y/o sobre Gal del *core 2*), la decoración por Gal(α 1-4)Gal(β 1-4) se da preferencialmente sobre el residuo de GlcNAc más externo.

En la **Figura 30** se presenta un resumen de todas las estructuras de *O*-glicanos resueltas completamente para *E. granulosus*, tanto en el trabajo antecedente como en esta Tesis, así como posibles relaciones biosintéticas entre los mismos. Los pasos de biosíntesis se infirieron a partir de las estructuras mismas exclusivamente, aunque algunos de ellos también están apoyados por datos transcriptómicos de la CL [73]. En dicho transcriptoma se encontraron *ESTs* (*expressed sequence tags*) que codifican para proteínas con función, predicha por similitud con otras enzimas ya caracterizadas (en comparación por *Blast*), correspondientes a: (i) *core*-1- β 1-3-galactosiltransferasa, que podría ser responsable de la formación del *core 1* y/o la elongación del esqueleto principal (agrupadas como paso (1), en la **Figura 30**) e (ii) β 1-4-galactosiltransferasa, que podría participar de la síntesis del motivo P1 (parte del paso (5), **Figura 30**).

En el transcriptoma mencionado también se hallaron secuencias que codifican para enzimas involucradas en el metabolismo de galactosa (UDP-glucosa-4-epimerasa, Gal-1-fosfato-uridil-transferasa, y el transportador de UDP-galactosa). También se identificaron dos secuencias para enzimas que catalizan en el primer paso de la síntesis de *O*-glicanos, es decir la introducción de α -GalNAc sobre residuos de serina o treonina del esqueleto peptídico; una de estas, Eg-pp-GalNAc-T1, fue clonada y caracterizada bioquímicamente, como se mencionó anteriormente [64]. Cabe acotar que estas pp-GalNAc-Ts (y tal vez otras pp-GalNAc-Ts no identificadas todavía) podrían

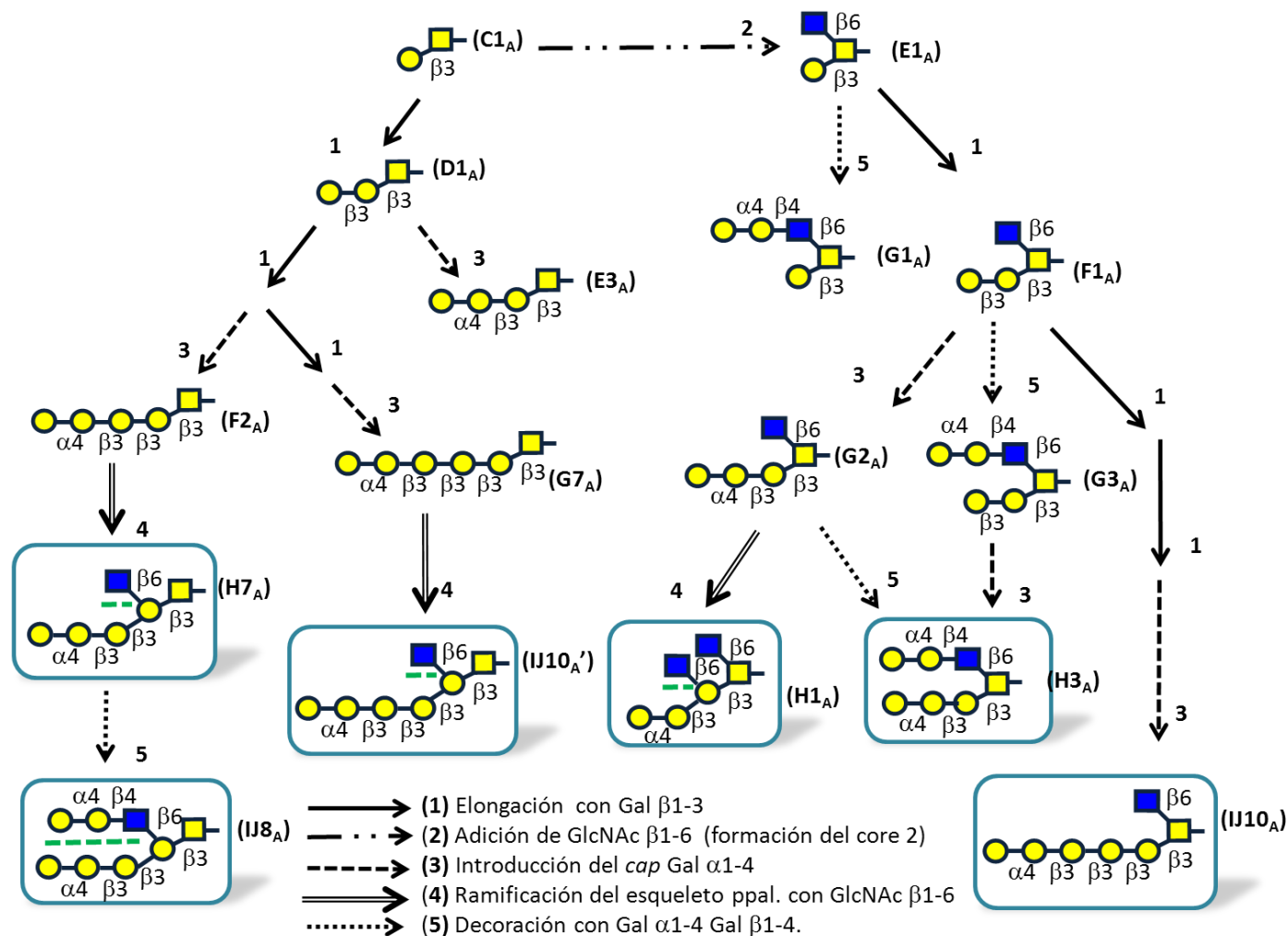
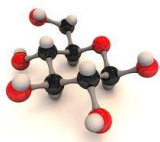


Figura 30: Resumen de todos los O-glicanos completamente elucidados hasta la fecha de la CL de *E. granulosus*. Las estructuras elucidadas en el contexto de esta Tesis están recuadradas, en tanto que los nuevos motivos estructurales (ramificaciones sobre el esqueleto principal de Galp(β1-3) con residuos de GlcNAc o el trisacárido GalGalGlcNAc) se subrayan en verde punteado. No se presentan algunos de los intermediarios biosintéticos. Los pasos de biosíntesis propuestos están basados en las estructuras exclusivamente; en ciertos casos pueden existir secuencias alternativas de pasos de biosíntesis, pasando por intermediarios biosintéticos que no se encuentran entre las estructuras elucidadas totalmente.



exhibir actividades complementarias, dependientes o no de la existencia de sitios glicosilados cercanos preexistentes, como se ha reportado en otros miembros de la familia en mamíferos [94]. De forma especulativa, y contemplando la posibilidad de localización diferencial de las distintas pp-GalNAc-Ts a través del Golgi, podría darse el caso de introducción “tardía” de nuevos *cores*, posterior a la elongación de los ya existentes. En este escenario, estos nuevos *cores* podrían no ser pasibles de elongarse, lo que daría cuenta de la gran abundancia de *cores* desnudos en mucinas de la CL. Alternativamente, este fenómeno podría darse simplemente por diferencias en las cinéticas de las distintas glicosiltransferasas. Esto último también es válido para explicar que las ramas de GlcNAc puedan estar decoradas con un disacárido Gal(α 1-4)Gal(β 1-4) o desnudas, pero nunca con un solo residuo de Gal(β 1-4); es decir, cabría esperar que la actividad de la β 1-4-galactosiltransferasa fuese limitante respecto a la de la α 1-4-galactosiltransferasa.

Finalmente, se hallaron varios ejemplos de oligosacáridos-alditales con extremo de hexitol, presumiblemente galactitol, dado que la única hexosa hallada en la CL es galactosa. Es posible que estos productos deriven de reacciones secundarias de *peeling* debidas a las drásticas condiciones de liberación por β -eliminación, a pesar de realizarse la misma en condiciones reductoras. De ser este el caso, sería de esperar que las reacciones de *peeling* afectaran a todos los glicanos por igual, por lo que resulta enigmático que para algunos glicanos se detecten sus equivalentes con extremo reductor hexitol pero para otros no. No es posible descartar la posibilidad que estos oligosacaritales no sean artefactuales sino que tengan relevancia biológica, por ejemplo por tratarse de *O*-glicanos de tipo *O*-galactosa genuinos, como los reportados para el gusano adulto de *E. multilocularis* [50]. Resulta contraintuitivo, sin embargo, pensar que en la CL exista una enzima que sintetice *cores* alternativos de galactosa (en paralelo a los *cores* 1 y 2 convencionales), ya que, *a priori*, estos no aportarían ningún beneficio evidente para la supervivencia del parásito. Otra posibilidad a explorar es que estos glicanos con extremo hexitol provengan de la escisión *in vivo* de glicanos de mayor tamaño, concebiblemente en el contexto de envejecimiento no enzimático de la CL, o como consecuencia de “podas” por glicosidasas parasitarias secretadas que le permitan a la hidátide modular la elasticidad de la CL y consecuentemente permitir el crecimiento concéntrico. Este último escenario, suponiendo un sitio de corte preferencial posterior al residuo de Gal de los *cores*, también podría justificar la dominancia de *cores* desnudos.



5.2 Comparación de los O-glicanos de la CL con otros glicanos mucínicos conocidos

5.2.1 Cores desnudos o truncados y glicanos cortos

Los *cores* desnudos y las estructuras cortas son dominantes tanto en la CL de *E. granulosus* [70] como en la mucina de obtenida del metacestodo de *E. multilocularis* [66], lo que sugiere que es una característica de las hidátides del género *Echinococcus*. Esta conclusión también surge de que la CL de *E. vogeli* (así como la de *E. multilocularis*) unen fuertemente la lectina vegetal PNA, cuya especificidad principal es por el *core* 1 desnudo [65, 95]. Este tipo de estructuras también se

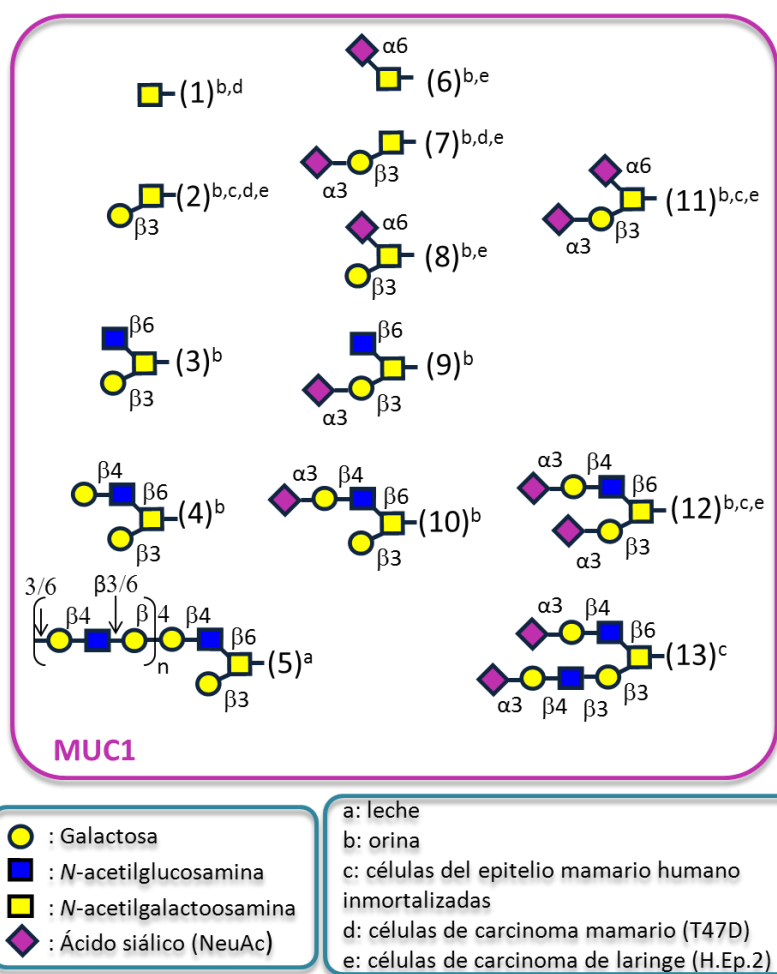


Figura 31: Glicanos mucínicos de MUC1 humana.

Esquema general de los glicanos mucínicos hallados en MUC1 proveniente de distintas líneas celulares humanas o fluidos (leche y orina). En cada caso se indica con superíndices de qué muestra proviene el glicano.

1 a 5: glicanos no sialilados

6 a 10: glicanos monosialilados

11 a 13: glicanos disialilados.

Se utilizó la nomenclatura del CFG (*Consortium for Functional Glycomics*), presentada en el recuadro inferior izquierdo. [29].

Adaptado de [96].

encuentra en mucinas humanas como MUC 1, una mucina de superficie celular que ha llamado la atención de los inmunólogos de tumores por haberse descrito originalmente en la misma la presencia de epítopes específicos de carcinoma mamario [97]. MUC1 se encuentra en numerosos tejidos, y en el contexto tumoral presenta peculiaridades de glicosilación, entre las que se destacan



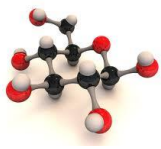
estructuras truncadas (como los antígenos Tn y sialil-Tn, estructuras 1 y 6 respectivamente en la **Figura 31**) y estructuras cortas sialiladas (glicanos 7 a 10 y también el propio antígeno sialil-Tn, estructura 6; en la **Figura 31**), que parecerían estar ausentes en líneas celulares no malignas [96].

Estos glicanos cortos de MUC1 presentan algunas similitudes con los de la CL, y particularmente con los glicanos de la mucina Em2 de *E. multilocularis* [66]. Los glicanos 1 a 4 de la **Figura 31** se encuentran en esta mucina, mientras que los glicanos 7, 9, 10 y 12 son análogos a los de la mucina Em2 que en vez de terminaciones con Gal(1-4) (probablemente de anomeridad α) presentan NeuAc(α 2-3). Esta homología se pierde al considerar los glicanos de la CL de *E. granulosus*, ya que en este parásito la introducción del *cap* de Gal(α 1-4) requiere de previa elongación con Gal(β 1-3) sobre el residuo de Gal del *core*, característica aparentemente ausente en O-glicanos humanos.

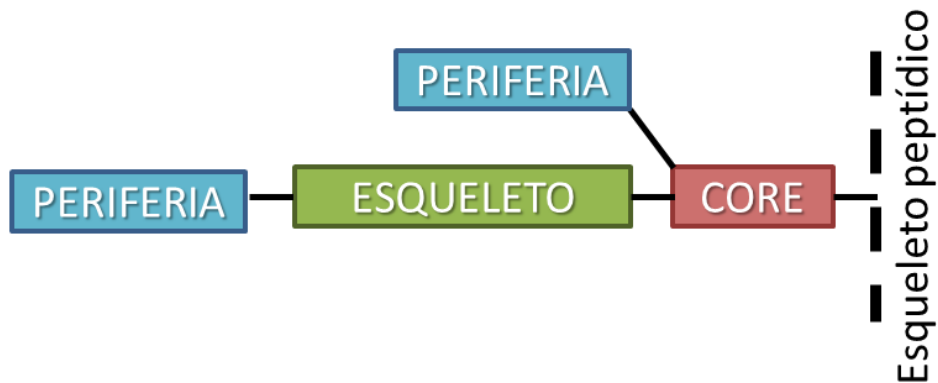
La presencia de glicanos pequeños o truncados (particularmente aquellos sialilados) en MUC1 de cáncer de mama conlleva a la exposición de epítopes peptídicos subyacentes de la apomucina, de relevancia inmunológica [96]. Extrapolando esta observación a los glicanos mucínicos de la CL, es concebible que existan diferencias de determinantes antigénicos entre las mucinas de *E. granulosus* y *E. multilocularis* no solo a nivel de epítopes glucídicos, sino también en el grado de exposición/enmascaramiento de la apomucina, considerando las diferencias en el largo de los glicanos mucínicos, al menos entre la de *E. granulosus* y la mucina Em2 de *E. multilocularis*. De todos modos, hay que considerar también que la densidad de sitios de glicosilación potenciales es mayor en las apomucinas propuestas de la CL (**Figura 13**) que sobre las mucinas humanas, particularmente, en MUC1, en la cual no existen residuos consecutivos de serina o treonina [96].

5.2.2 Glicanos largos

Los glicanos elongados hallados en la CL de *E. granulosus* se adaptan adecuadamente al prototipo conceptual de los glicanos conocidos de mucinas de mamíferos (particularmente en las mucinas MUC1 y MUC2) [98], esquematizado en la **Figura 32**. En estas mucinas, los glicanos basados en alguno de los 8 *cores* mucínicos reconocidos pueden elongarse con una serie de residuos que conforman el esqueleto del glicano, compuesto por unidades repetitivas. En el o los extremos no reductores (más de uno si existen ramificaciones) se pueden introducir residuos de fucosa o ácido siálico, que actúan como *caps* que interrumpen la elongación de la cadena principal [98].



(A)



(B)

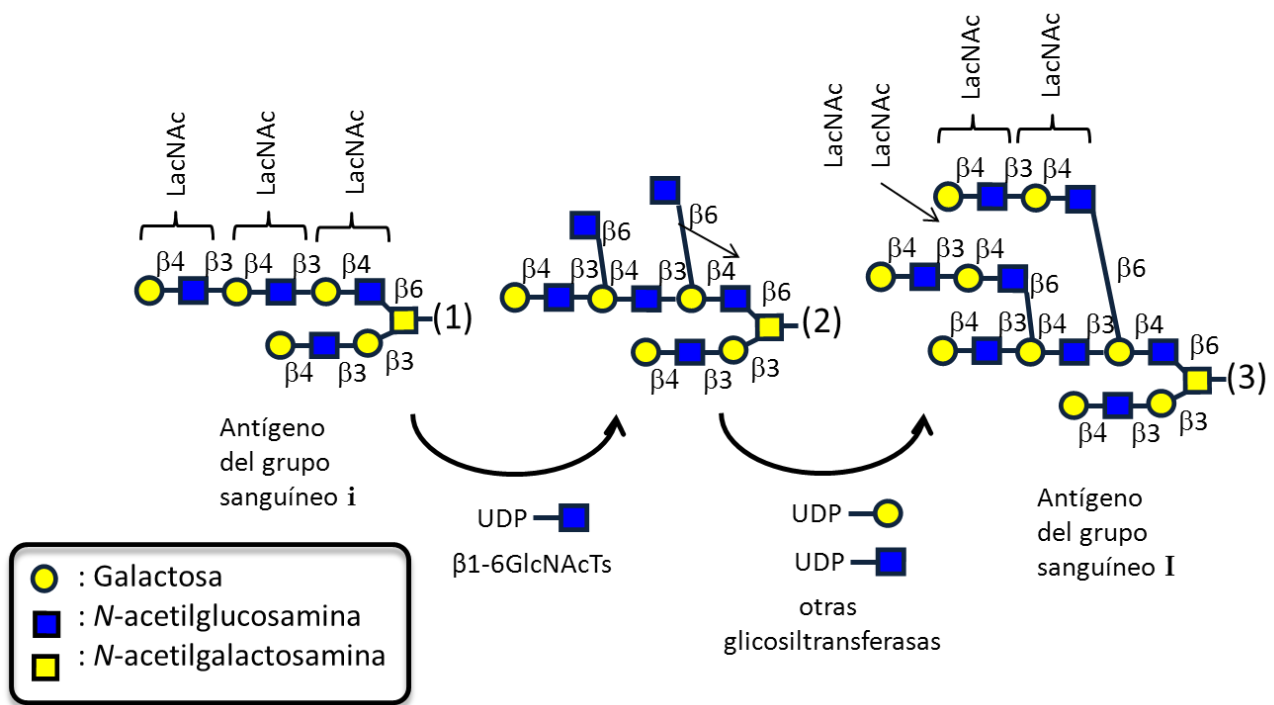
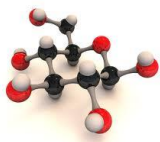


Figura 32: Arquitectura de los glicanos mucínicos largos en mamíferos. (A) Estructura general de glicanos mucínicos largos en mamíferos, compuesta por tres regiones: el *core*, el esqueleto principal y las regiones periféricas. (B) Ejemplo de O-glicanos mucínicos presentes en varias células humanas. El ejemplo (1), basado en *core* 2 presenta un esqueleto principal de poli-*N*-acetilactosamina (poli-LacNAc), dando lugar al antígeno del grupo sanguíneo “i”. Este glicano puede ser ramificado para dar lugar al intermediario (2) para generar luego glicanos como el ejemplo (3), conteniendo ramas compuestas por unidades de *N*-acetilactosamina (LacNAc), conformando el antígeno del grupo sanguíneo “I”.

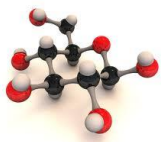


Estos extremos conforman la periferia del glicano, y en muchos casos dan lugar a motivos propios de grupos sanguíneos, tales como los antígenos del grupo ABO o los antígenos de Lewis entre otros [99].

Un ejemplo de esto (ejemplo (1) presentado en la [Figura 32B](#)), posee un *core 2* con elongación a partir del residuo de GlcNAc para dar un esqueleto de poli-LacNAc, presentando una unidad de LacNAc en la periferia. Esta cadena de poli-LacNAc es común a distintas clases de glicanos (*N*- y *O*-glicanos, y glicolípidos), y corresponde al antígeno del grupo sanguíneo “i”, expresado abundantemente en eritrocitos embrionarios [100, 101]. El grupo LacNAc periférico también podría estar fucosilado y/o sialilado para dar motivos de la familia de antígenos de Lewis. Por otro lado, al ejemplo (1) se le pueden sumar ramas mediante la adición de GlcNAc(β 1-6) a residuos de Gal del esqueleto principal (ejemplo (2), [Figura 32B](#)) [102], las cuales subsiguientemente continúan glicosilándose para dar lugar a otras unidades de LacNAc (ejemplo 3, [Figura 32B](#)). Esto genera el antígeno del grupo sanguíneo I [99].

Los datos de MS¹ de los glicanos más largos de la CL detectados antes de esta tesis mostraban composiciones Hex_nHecNAc_mHexNAc-ol ($2 \leq m \leq 4$) que podrían haber correspondido a un esqueleto de poli-LacNAc. Contrariamente, el esqueleto de los *O*-glicanos más largos de la CL difiere del de los glicanos mucínicos conocidos en mamíferos en dos grandes aspectos: (i) la unidad repetitiva es Gal(β 1-3) en lugar de LacNAc, e (ii) el esqueleto se construye a partir del residuo de Gal del *core 1* o 2 en lugar del residuo de GlcNAc del *core 2*. Otra diferencia radica en que las unidades de LacNAc en los glicanos de la CL de *E. granulosus* son motivos crípticos, enmascarados por un *cap* de Gala(1-4) para dar el motivo P1.

Una característica que sí comparten los glicanos mucínicos de la CL con los de mamíferos es que las ramificaciones por GlcNAc se introducen sobre residuos de Gal mediante enlaces β 1-6. En mamíferos, la introducción de ramas GlcNAc(β 1-6) está catalizada por distintas enzimas, según sea para sintetizar el *core 2*, el *core 4*, o el grupo sanguíneo I (enzimas denominadas C2GnT, C4GnT e IGnT respectivamente), existiendo ejemplos de enzimas que catalizan más de una de estas reacciones (C2GnT-M) [98]. Para *E. granulosus* no se han identificado todavía las β 1-6 GlcNAc-transferasas que podrían participar de la síntesis de glicanos de la CL.

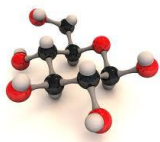


Curiosamente, el esqueleto principal de los glicanos de la CL se asemeja al de ciertos *O*-glicanos neutros de la cubierta de gel de los huevos no fertilizados de algunos anuros. Concretamente, en *Rana urticularia* existen ejemplos de elongaciones por Gal(β 1-3) a partir del residuo de Gal de *cores* 1 y 2 [103]. Similitudes aún más notables se encuentran con los glicanos de *Xenopus laevis*, en los cuales además de las elongaciones por Gal(β 1-3) de los *cores* 1 y 2, la cadena principal está finalizada con un *cap* de Gal(α 1-4) al igual que en la CL [93, 104]. Estas estructuras, reportadas en la base de datos de *Glycosciences.de* fueron las utilizadas para verificar los desplazamientos químicos de los glicanos elucidados en esta Tesis.

5.3 Los glicanos de la CL en comparación en relación a la glicobiología de otros platelmintos parásitos de interés

Probablemente el parásito platelminto cuya glicobiología ha sido estudiada más en detalle es *Schistosoma mansoni*. Esto se debe en buena medida a que las preparaciones antigénicas de distintos estadios de este parásito inducen fuertes respuestas Th2, para las cuales no se han definido los patrones moleculares asociados a patógenos ni los receptores del sistema inmune innato que las desencadenan, con el mismo grado de detalle que para las repuestas Th1.

Los primeros reportes de glicoproteínas en cercarías de *S. mansoni* describieron estructuras de *O*-glicanos con motivos de oligofucosa unidas a esqueletos de poli-LacNAc; estos esqueletos nacen desde cualquiera de las antenas de los *cores* 1 o 2 [105, 106]. Adicionalmente se describieron glicanos con un *core* Galp(β 1-3)[Galp(β 1-6)]GalNAc, pudiendo exhibir motivos Lewis^X terminales [106], los cuales parecen ser ubicuos en las distintas clases de glicanos y estadios de *S. mansoni*. En dos proteínas del gusano adulto (el antígeno circulante catódico y el antígeno circulante anódico, CCA y CAA respectivamente) se caracterizaron otros *O*-glicanos [107]. CCA presenta *O*-glicanos grandes con unidades multiméricas de Lewis^X, mientras que CAA posee *O*-glicanos negativamente cargados con esqueletos principales de unidades repetitivas de Galp(β 1-6) sustituidas por residuos de ácido glucurónico unido por enlace β 1-6 [107]. Ninguno de estos glicanos guarda similitud estructural con los glicanos de la CL de *E. granulosus*, más allá de la utilización de los *cores* 1 y 2, y la presencia de epítopes de grupos sanguíneos en los motivos terminales (Lewis^X en *S. mansoni* y P1 en *E. granulosus*). Por lo tanto no es posible hacer inferencias claras que correlacionen estructuras de la CL con la respuesta Th2 frente a la hidátide.



Como se comentó en la [sección 1.6](#), existen varios ejemplos de glicolípidos y *N*-glicanos de cestodos que presentan residuos de Gal(α 1-4) terminal. Estos residuos se pueden hallar en distintos contextos, como decorando un residuo de β GlcNAc [41, 42] o sobre residuos de Gal(β 1-6) [56, 58] ninguno de los cuales se encuentra en el repertorio estructural encontrado de la CL. Tal vez más interesante sea el hecho que los extractos de *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica* presenten reactividad P1, dando lugar a reacciones cruzadas con *E. granulosus* [108-110], lo cual resulta sugerente, considerando que infectan el mismo tipo de animales que *E. granulosus* (ungulados). Esto plantea la pregunta de cuál puede ser la ventaja evolutiva para estos parásitos de exhibir este motivo de grupo sanguíneo en particular en sus glicoconjugados.

5.4 Relación entre los motivos estructurales glucídicos de la CL y el reconocimiento por anticuerpos

5.4.1 Reactividad anti- P1 en la CL

Por largo tiempo se ha sabido de la presencia de antígenos reactivos para anticuerpos anti-grupo sanguíneo P1 en el líquido hidático y la CL de *E. granulosus* [43, 111]. Posteriormente, y en ensayos con la CL específicamente, se atribuyó esta reactividad a glicoproteínas que, en retrospectiva, eran las mucinas de la CL, las cuales era capaces de precipitar sueros de pacientes con equinocosis, es decir, eran reconocidas por anticuerpos generados en la infección [28]. Como se comentó en la [sección 1.6](#), la reactividad P1 se localizó en el tegumento de protoescólices, en la capa germinativa de vesículas prolíferas y en un patrón de bandas en la CL [44]. Esta observación, sumada a la identificación de reactividad anti-P1 en un antígeno de 38kDa del líquido hidático, llevó a algunos autores a sugerir que la molécula responsable de la reactividad podría ser sintetizada por el tegumento de los protoescólices y almacenada en el líquido hidático, para luego difundir a través de la CL y finalmente ser fagocitada por células mononucleares del hospedero [46]. En cierta consonancia con esto, Khoo *et. al* caracterizaron *N*-glicanos presentes en la pared hidatídica (resumidos en la [Figura 9](#)) que podían portar el epítipo P1, llegando a sugerir que los principales portadores del motivo P1 en esta estructura probablemente fueran *N*-glicanos biantenarios de tipo complejo [39].

En contraste con la especulación previa de que la reactividad P1 en la pared hidatídica se debía principalmente a *N*-glicanos en glicoproteínas difusibles, los resultados obtenidos por nuestro



grupo, en esta Tesis y el trabajo antecedente [70], demuestran que las moléculas que portan el motivo P1 presentes en la CL son de hecho integrales a esta y corresponden a *O*-glicanos de mucinas - al margen que existan otros glicoconjugados en el parásito, como proteínas *N*-glicosiladas o glicolípidos que compartan este determinante antigénico. Esto implica que el motivo P1 probablemente está expuesto de manera continua al sistema inmune del hospedero, y que debe ser captado por macrófagos o células dendríticas cuando estas fagocitan material “descamado” de las capas más externas de la CL [6].

Dentro de los grupo sanguíneos P, aproximadamente el 80% de la población caucásica expresa el antígeno P1 (individuos denominados P1), mientras que los individuos que no lo expresan (individuos P2) pueden o no tener anticuerpos naturales contra el mismo [112]. A pesar de que sería tentador especular acerca de una susceptibilidad diferencial a la equinocosis quística en base al grupo sanguíneo (P1 o P2), no se ha verificado tal correlación [28]. La presencia de anticuerpos contra P1 en parte de la población sana, sumada a la amplia distribución del motivo P1 en otros parásitos (véase la [sección 5.3](#)), le resta valor en serodiagnóstico de equinocosis quística a este epítope.

5.4.2 Anticuerpos que reconocen carbohidratos la CL de *Equinococcus spp.* como herramienta de elucidación estructural.

En esta Tesis se dilucidó la especificidad del anticuerpo monoclonal E492, generado contra protoescolices de *E. granulosus*, determinándose que éste reconoce el motivo P1. El resultado es coherente con la reactividad del anticuerpo contra protoescolices, ya que el motivo P1 se encuentra, con toda probabilidad sobre *N*-glicanos de glicoproteínas de este estadio, como los descritos por Khoo *et. al* [39]. También es posible, en base a datos inmunoquímicos, que el mismo motivo se encuentre representado sobre glicolípidos en este estadio [45].

Se utilizó el anticuerpo exitosamente como herramienta complementaria a la elucidación para verificar la presencia del motivo P1 en glicanos concretos de la CL presentes en abundancias no compatibles con su elucidación total empleando NMR. Es importante destacar que este anticuerpo es selectivo para la anomeridad α del residuo terminal (y posiblemente para la anomeridad β del residuo sub-terminal), como se demostró por inhibición con glicanos sintéticos solubles.



Retrospectivamente, también se había demostrado que el anticuerpo E492 reconoce a la mucina Em2 del metacestodo de *E. multilocularis* (obtenida por inmutafinidad con el anticuerpo G11) [77], cuyos glicanos habían sido parcialmente elucidados [66] e incluyen miembros con el trisacárido Gal(1-4)Gal(1-4)GlcNAc (glicanos 3 y 5 en la [Figura 11](#)). Por ende, esto reafirma nuestra hipótesis original que el trisacárido Gal(1-4)Gal(1-4)GlcNAc hallado por Hulsmeier *et. al* corresponde, no solo en secuencia y posiciones de sustitución, sino también en configuraciones anómericas, a un motivo P1.

5.4.3 El *cap* de Gal(1-4) como epítoto relevante en inmunodiagnóstico

Un dato llamativo es que el anticuerpo G11, que reconoce glúcidos sobre en la CL de *E. multilocularis*, no se une a la fracción obtenida mediante el anticuerpo E492, también obtenida de hidátides de *E. multilocularis* [77] ni a otros extractos de *E. granulosus* ni *E. vogeli*, lo que le confiere utilidad diagnóstica para diferenciar la equinococosis alveolar de la quística o poliquística [113]. Comparando el glicoma de la CL de *E. granulosus* con los datos de Hulsmeier *et al.* parece factible que este anticuerpo reconozca selectivamente alguno de tres posibles motivos diferenciales presentes en la fracción Em2: (i) el antígeno Tn; (ii) la unidad terminal de LacNAc, o (iii) el *cap* Gal(1-4) en el contexto del trisacárido que abarca los residuos de Gal y GalNAc del *core* 1 o 2 (véanse la [Figura 11](#) en la [sección 1.6.3](#) y [Figura 30](#) en la [sección 5.1.2](#)). Dado que la fracción Em2 se purifica con el anticuerpo G11 y contiene al menos un glicano con el motivo P1, resulta evidente que ambos anticuerpos en discusión (G11 y E492) se unen a esta fracción. A la inversa, el hecho que el anticuerpo G11 no reconozca la fracción purificada por el anticuerpo E492 sugiere que en la CL de *E. multilocularis*: (i) existen dos subconjuntos de moléculas de mucinas distintos, no entrecruzados entre sí por enlaces covalentes, (ii) el motivo P1 está representado en los dos subconjuntos de mucinas, (iii) el motivo reconocido por el anticuerpo G11 está circunscrito a solo uno de los subconjuntos de mucinas y (iv) el subconjunto de mucinas que portan el motivo reconocido por G11 es minoritario, de forma que al purificar mediante el anticuerpo E492 la reactividad G11 de la fracción obtenida es muy baja ([Figura 33](#)).

En un trabajo reciente, Yamano *et. al.* se propusieron identificar el epítoto glucídico inmunodominante de la fracción Em2, utilizando un panel de glicanos sintéticos [114]. De los 11 oligosacáridos de Em2 sintetizados, el trisacárido Gal(α1-4)Gal(β1-3)GalNAc (correspondiente al punto (iii) en el párrafo anterior) fue el que presentó mayor reactividad con sueros de pacientes



con equinococosis alveolar. El desempeño en serodiagnóstico de este motivo fue equivalente al de la fracción Em2 entera, presentando mayor sensibilidad en el contexto de *core* 1 que de *core* 2, posiblemente por impedimento estérico del residuo de GlcNAc del *core* 2. El epítipo reconocido

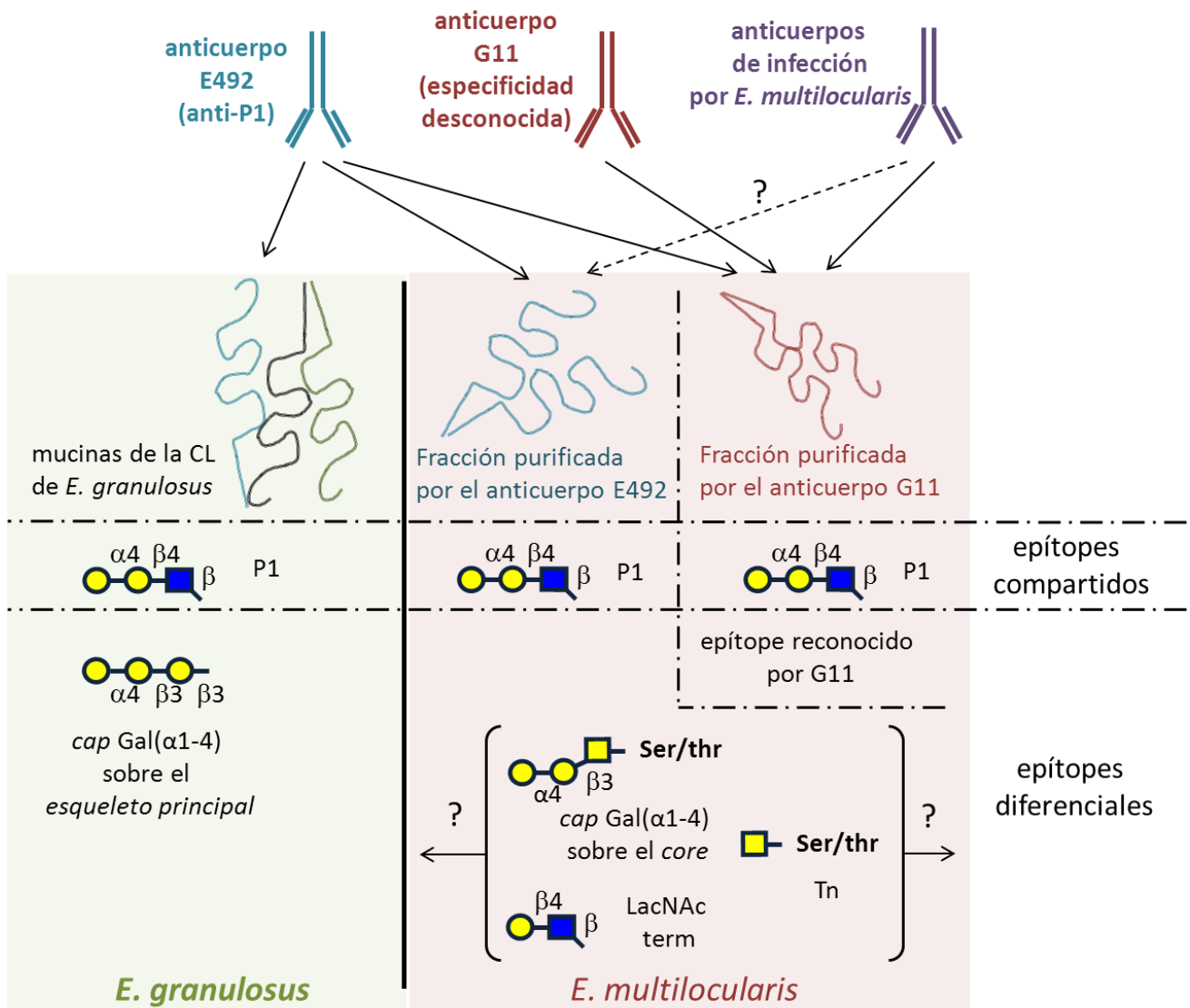


Figura 33: Hipótesis sobre el reconocimiento de los epítipes glucídicos en mucinas de *E. granulosus* y *E. multilocularis* por distintos anticuerpos. El anticuerpo monoclonal E492 reconoce el motivo P1, como se demostró en esta Tesis, el cual parecería ser un epítipo compartido entre las mucinas de la CL de estas dos especies de *Echinococcus*. Por su parte, el anticuerpo G11 solo reconoce un subconjunto de las mucinas de la CL de *E. multilocularis* (fracción purificada por el anticuerpo G11), las cuales por lo tanto presentan epítipes diferenciales. El epítipo diferencial de la fracción purificada por el anticuerpo G11 podría ser el antígeno Tn, motivos de LacNAc terminal, el trisacárido Gal($\alpha 1-4$)Gal($\beta 1-3$)GalNAc, u otro epítipo glucídico o glicopeptídico. Finalmente, los anticuerpos de infección por *E. multilocularis* reconocen a la fracción purificada por el anticuerpo G11 y a glicanos sintéticos que presentan el trisacárido Gal($\alpha 1-4$)Gal($\beta 1-3$)GalNAc, aunque no se ha ensayado si



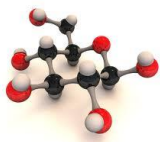
reconocen a la fracción purificada por el anticuerpo E492 también (flecha punteada).

por los sueros parece abarcar necesariamente al residuo de GalNAc del *core*, ya que el disacárido Gal(α 1-4)Gal(β 1-3) arrojó una sensibilidad diagnóstica significativamente menor. En este trabajo no se utilizó ningún glicano sintético con un residuo de Gal(β 1-3) como tercera posición, que sería representativo de los glicanos de *E. granulosus*, representando un *cap* sobre dos residuos de Gal del esqueleto principal. Por lo tanto, no es posible inferir si se trata de un epítipo compartido entre las hidátides de las dos especies o no, lo que estaría sujeto a que el anticuerpo reconozca la configuración *galacto* del tercer residuo (exclusivamente) o que en cambio discrimine la presencia vs ausencia del grupo acetamido, y/o la presencia del esqueleto peptídico contigua al residuo reductor terminal del trisacárido. Estas posibilidades podrían discriminarse experimentalmente mediante las herramientas puestas a punto en esta Tesis.

La hipótesis de que los anticuerpos generados en la infección por *E. multilocularis* reconozcan específicamente Gal(α 1-4)Gal(β 1-3)GalNAc (y no Gal(α 1-4)Gal(β 1-3)Gal) podría ser consistente con que el anticuerpo G11 (que purifica, como se dijo, una fracción mucínica que tiene valor diagnóstico) reconozca Gal(α 1-4)Gal(β 1-3)GalNAc α -Ser/Thr. A su vez, la idea de que sea el esqueleto principal con un *cap* (y no los esqueletos sin el *cap*, ni los motivos P1) el motivo glucídico más inmunogénico en la infección (ya sea por *E. granulosus* o por *E. multilocularis*) es coherente con los datos de Russi *et. al* [28]. Estos autores observaron que una fracción glicoproteica de la CL reaccionaba con anticuerpos de infección en forma inhibible por α Gal (pero no con β Gal), y que, si bien esta infección contenía reactividad P1, los anticuerpos de infección no reaccionaban con el antígeno P1 de *Echinococcus*.

5.5 Perspectivas

Esta Tesis contribuye a enriquecer nuestro conocimiento sobre la composición de la CL de *E. granulosus*, lo que representa un paso más hacia el estudio sistemático de los mecanismos moleculares mediados por la CL en la interacción parásito hospedero. Una meta central para nuestro grupo consiste en identificar los receptores del sistema inmune innato del hospedero que reconozcan moléculas de la CL, los cuales a su vez expliquen el perfil de respuesta que se desarrolla frente a la hidátide. Resulta factible y tentador postular que *E. granulosus* haya evolucionado para exhibir glicanos en la CL con motivos estructurales dirigidos hacia receptores específicos del



hospedero, como estrategia activa para promover su propia supervivencia [52]. Particularmente, resulta intrigante la función del motivo de un grupo sanguíneo, el motivo P1, sobre esta estructura parasitaria. Otra posibilidad a contemplar, es que las estructuras de los *O*-glicanos de la CL sean “invisibles” al sistema inmune innato del hospedero, permitiendo así otros antígenos parasitarios, ya sean constitutivos de la CL o moléculas solubles que difundan a través de la misma, ejerzan la modulación de la respuesta del hospedero.

A partir de este trabajo se abren muchas nuevas interrogantes acerca de la estructura de la CL. ¿Existe una distribución particular de los glicanos o motivos glucídicos sobre una o varias apomucinas en la CL? ¿Existen diferencias en la composición de glicanos entre las laminaciones de la CL, desde el centro de la hidátide hacia afuera? ¿Qué función cumplen los glicanos mucínicos en la hidratación y propiedades mecánicas de la CL? ¿Cómo reaccionan estos glicanos frente a moléculas efectoras del hospedero, tales como especies radicalarias o proteínas del sistema del complemento, cuando la inflamación no se resuelve? ¿Es posible interferir en la biosíntesis de los carbohidratos de la CL, como estrategia terapéutica para perturbar el control inmunológico que ejerce la hidátide? ¿Pueden estos glicanos constituir patrones moleculares parasitarios purificables y aplicables en la clínica contra enfermedades de índole autoinmune o autoinflamatoria, como se ha planteado anteriormente para otros parásitos [115]?

El conocimiento detallado acerca de los *O*-glicanos de la CL permite el uso de diversas estrategias experimentales, como el modelado molecular de los mismos, la introducción de modificaciones químicamente definidas mediante tratamientos químicos o enzimáticos sobre los glúcidos de las mucinas nativas, la búsqueda racional de las glicosiltransferasas que sintetizan estas mucinas, y la generación de glicanos sintéticos homólogos o modificados; todo esto contribuirá a dar respuestas a las interrogantes planteadas y muchas otras, conduciendo el estudio de la equinocosis quística en emocionantes nuevas direcciones.



AGRADECIMIENTOS



6. Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer a mi tutor, Álvaro Díaz, por su respaldo científico, por empujarme a dar lo mejor de mí, y por demostrarme día a día, con su paciencia, dedicación y compromiso, lo que hace a un investigador y educador de primer nivel. También me siento sinceramente agradecido con todos mis amigos, colegas y maestros en la Cátedra de Inmunología, por conformar un grupo excelente en lo académico y en lo humano, y nunca haber vacilado en prestarme ayuda, consejo y palabras de aliento. Ustedes han dejado una profunda huella en mi desarrollo científico y personal.

Quisiera agradecer a todos en el Laboratorio de Carbohidratos y Glicoconjugados por permitirme trabajar a su lado, con especial cariño a mis compinches, Humberto y Marcia, con quienes compartí las aventuras y desventuras de trabajar con carbohidratos en estas latitudes. No puedo expresar en estas torpes palabras todo el aprecio que siento por mis amigos del Laboratorio de Glicobiología, de la Universidad Federal de Río de Janeiro. Mis dos estadías en Río fueron experiencias extremadamente disfrutables y fructíferas, principalmente gracias a su frescura y compañerismo. Les agradezco a los profesores José Osvaldo y Lucia Previato por haberme recibido en su laboratorio y particularmente a la Dra. Adriane Todeschini, por haberme guiado en el difícil terreno del NMR y ser una fuente incondicional de apoyo. Asimismo, le agradezco a PEDECIBA QUÍMICA y AMSUD Pasteur por hacer posibles estas hermosas experiencias.

Le agradezco mucho a los integrantes de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas del Institut Pasteur de Montevideo, especialmente a Madelón Portela, por su colaboración e invaluable experiencia técnica en la adquisición de los espectros de masas. También quisiera agradecer a la Dra Mara Rosenzvit (Instituto Nacional de Enfermedades, Buenos Aires, Argentina) por las muestras de hidátides ovinas, al Dr. Noriyashu Hada y su grupo (Keio University, Tokyo, Japón) por los glicanos sintéticos utilizados en este trabajo y a la Dra. Sylvia Dematteis y el MSc. Gustavo Mourglia, de la Cátedra de Inmunología, por cederme incontables alícuotas del anticuerpo E492.

Les doy las gracias también a los miembros del tribunal de esta Tesis, la Dra Rosalía Agusti, el Dr. Danilo Davyt y la Dra Laura Franco Fraguas, por el duro esfuerzo de evaluar este trabajo.

Finalmente, les reservo un agradecimiento enorme mis amigos y familia, especialmente a mis padres y mis abuelos, por haber sido, ahora y siempre, mi guía y contención.

A TODOS USTEDES, DE TODO CORAZÓN, GRACIAS.

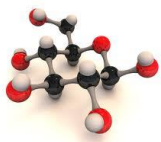


REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



7. Referencias Bibliográficas

1. Thompson, R.C.A., *Biology and systematics of Echinococcus*, in *Echinococcus and Hydatid Disease*, R.C.A. Thompson and A.J. Lymbery, Editors. 1995, CAB International: Wallingford. p. 1-50.
2. Moro, P. and P.M. Schantz, *Echinococcosis: a review*. International Journal of Infectious Diseases, 2009. **13**(2): p. 125-133.
3. Moro, P., Schantz, PM, *Cystic Echinococcosis in the Americas*. Parasitology International, 2006. **55**: p. 181-186
4. Grosso, G., et al., *Worldwide epidemiology of liver hydatidosis including the Mediterranean area*. World Journal of Gastroenterology, 2012. **18**(13): p. 1425-1437.
5. Tiseo, D., et al., *[Cystic echinococcosis in humans: our clinic experience]*. Parasitologia, 2004. **46**(1-2): p. 45-51.
6. Diaz, A.C., Allen, JE; Sim, RB; Ferreira, *Understanding the laminated layer of Echinococcus: immunology*. Trends in Parasitology, 2011. **27**(5): p. 264-273.
7. Pan, D., et al., *Relative expression of antigen B coding gene of bubaline isolates of Echinococcus granulosus in fertile and sterile cysts*. Journal of Helminthology, 2010. **84**(3): p. 241-244.
8. Vatankhah, A., et al., *Immunochemical characterization of alkaline phosphatase from the fluid of sterile and fertile Echinococcus granulosus cysts*. Parasitology Research, 2003. **90**(5): p. 372-376.
9. Cabrera, G., et al., *DNA damage, RAD9 and fertility/infertility of Echinococcus granulosus hydatid cysts*. Journal of Cellular Physiology, 2008. **216**(2): p. 498-506.
10. Paredes, R., et al., *Apoptosis as a possible mechanism of infertility in Echinococcus granulosus hydatid cysts*. Journal of Cellular Biochemistry, 2007. **100**(5): p. 1200-1209.
11. Sakamoto, T. and P.A. Cabrera, *Immunohistochemical observations on cellular response in unilocular hydatid lesions and lymph nodes of cattle*. Acta Tropica, 2003. **85**(2): p. 271-279.
12. Díaz, A., A.C. Willis, and R.B. Sim, *Expression of the proteinase specialized in bone resorption, cathepsin K, in granulomatous inflammation*. Molecular Medicine, 2000. **6**(8): p. 648-659.



13. Dai, W.J., et al., *Echinococcus multilocularis* proliferation in mice and respective parasite 14-3-3 gene expression is mainly controlled by an alphabeta CD4 T-cell-mediated immune response. *Immunology*, 2004. **112**(3): p. 481-488.
14. Bortoletti, G. and G. Ferretti, *Ultrastructural aspects of fertile and sterile cysts of Echinococcus granulosus* developed in hosts of different species. *International Journal of Parasitology*, 1978. **8**(6): p. 421-431.
15. Rausch, R., *Studies on the helminth fauna of Alaska. XX. The histogenesis of the alveolar larva of Echinococcus species*. *Journal of Infectious Diseases*, 1954. **94**(2): p. 178-186.
16. Ferreira, A.M., et al., *How Echinococcus granulosus deals with complement*. *Parasitology Today*, 2000. **16**(4): p. 168-172.
17. Morseth, D.J., *Fine structure of the hydatid cyst and protoscolex of Echinococcus granulosus*. *Journal of Parasitology*, 1967. **53**(2): p. 312-325.
18. Diaz, A.C., C; Irigoín, F; Lin, G; Previato, J.O; Ferreira, F, *Understanding the laminated layer of Echinococcus: Structure*. *Trends in Parasitology*, 2011. **27**(5): p. 204-213.
19. Irigoín, F., et al., *Unique precipitation and exocytosis of a calcium salt of myo-inositol hexakisphosphate in larval Echinococcus granulosus*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2004. **93**: p. 1272-1281.
20. Irigoín, F., et al., *myo-Inositol hexakisphosphate is a major component of an extracellular structure in the parasitic cestode Echinococcus granulosus*. *The Biochemical Journal*, 2002. **362**(Pt 2): p. 297-304.
21. Raboy, V., *myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate*. *Phytochemistry*, 2003. **64**: p. 1033-1043.
22. Loewus FA,, *myo-Inositol metabolism in plants*. *Plant Science* 2000. **150**: p. 19.
23. Sasakawa, N., M. Sharif, and M.R. Hanley, *Metabolism and biological activities of inositol pentakisphosphate and inositol hexakisphosphate*. *Biochemical Pharmacology*, 1995. **50**(2): p. 137-146.
24. Richards, K.S., *Echinococcus granulosus equinus: the histochemistry of the laminated layer of the hydatid cyst*. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 1984. **22**(1): p. 21-31.
25. Kilejian, A., K. Sauer, and C. Schwabe, *Host-parasite relationship in Echinococcosis. VIII. Infrared spectra and chemical composition of the hydatid cyst*. *Experimenal Parasitology*, 1962. **12**: p. 377-392.



26. Kilejian, A. and C.W. Schwabe, *Studies on the polysaccharides of the Echinococcus granulosus cyst, with observations on a possible mechanism for laminated membrane formation*. Comparative Biochemistry and Physiology B, 1971. **40**(1): p. 25-36.
27. Korc, I., et al., *Chemical characterization of the polysaccharide of the hydatid membrane of Echinococcus granulosus*. Experimental Parasitology, 1967. **20**(2): p. 219-224.
28. Russi, S., A. Siracusano, and G. Vicari, *Isolation and characterization of a blood P1 active carbohydrate antigen of Echinococcus granulosus cyst membrane*. Journal of Immunology, 1974. **112**(3): p. 1061-1069.
29. Brockhausen, I., Schachter, H., Stanley, P., *O-GalNAc Glycans in Essentials of Glycobiology*. Second Edition ed2009, United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 115-127.
30. Stanley, P.S., H. Taniguchi, N, *N-glycans*, in *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, et al., Editors. 2009, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY. p. 101-114.
31. Esko, J.D.K., K Lindahl, *Proteoglycans and sulfated Glycosaminoglycans*, in *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, et al., Editors. 2009, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY. p. 236-237.
32. Bertozzi, C.R.R., D, *Structural Basis of Glycan Diversity*, in *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, et al., Editors. 2009, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY. p. 26-27.
33. Bertozzi, C.R., Rabuka, D., *Structural Basis of Glycan Diversity*, in *Essentials of Glycobiology*, Varki, A., *Essentials of glycobiology*. 2nd ed2009, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. p.23-36.
34. Bertozzi, C.R.R., D, *Structural Basis of Glycan Diversity*, in *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, et al., Editors. 2009, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY. p. 33-34.
35. Wuhrer, M. and A.M. Deelder, *Matrix-assisted laser desorption/ionization in-source decay combined with tandem time-of-flight mass spectrometry of permethylated oligosaccharides: targeted characterization of specific parts of the glycan structure*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2006. **20**(6): p. 943-951.



36. Chaplin, M.F. and J.F. Kennedy, *Carbohydrate analysis : a practical approach*. 2nd ed 1994, Oxford: IRL Press at Oxford University Press., p23-54.
37. Weimar, T. and R.J. Woods, *Combining NMR and Simulation Methods in Oligosaccharide Conformational Analysis*, in *NMR Spectroscopy of Glycoconjugates*, J. Jiménez-Barbero and T. Peters, Editors. 2002, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Federal Republic of Germany. p. 111-142.
38. Schannar, R.L.S., A. Stanley, P. Glycosphingolipids, in *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, et al., Editors. 2009, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY. p. 129-133.
39. Khoo, K.H., et al., *Structural characterization of the N-glycans from Echinococcus granulosus hydatid cyst membrane and protoscoleces*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1997. **86**(2): p. 237-248.
40. Paschinger, K., G.G. Gonzalez-Sapienza, and I.B. Wilson, *Mass spectrometric analysis of the immunodominant glycan epitope of Echinococcus granulosus antigen Ag5*. *International Journal of Parasitology*, 2012. **42**(3): p. 279-285.
41. Lee, J.J., et al., *Mass spectrometric characterisation of Taenia crassiceps metacestode N-glycans*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2005. **143**(2): p. 245-249.
42. Haslam, S.M., et al., *Structural characterization of the N-linked glycans from Taenia solium metacestodes*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2003. **126**(1): p. 103-107.
43. Cameron, G.L. and J.M. Staveley, *Blood group P substance in hydatid cyst fluids*. *Nature*, 1957. **179**(4551): p. 147-148.
44. Makni, S., et al., *Immunological localization of blood pl antigen in tissues of Echinococcus granulosus*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 1992. **86**(1): p. 87-88.
45. Dennis, R.D., et al., *Chromatographic and antigenic properties of Echinococcus granulosus hydatid cyst-derived glycolipids*. *Parasite Immunology*, 1993. **15**(12): p. 669-681.
46. Zhang, L.H., G.R. Leggatt, and D.P. McManus, *Further characterization of the 38 kDa antigen from Echinococcus granulosus (hydatid disease) cyst fluid: evidence for antigenic heterogeneity and reactivity with anti-P1 antibodies*. *Parasite Immunology*, 1995. **17**(6): p. 287-296.



47. McInnes, I.B., et al., *A novel therapeutic approach targeting articular inflammation using the filarial nematode-derived phosphorylcholine-containing glycoprotein ES-62*. *Journal of Immunology*, 2003. **171**(4): p. 2127-2133.
48. Harnett, M.M., et al., *The phosphorylcholine moiety of the filarial nematode immunomodulator ES-62 is responsible for its anti-inflammatory action in arthritis*. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2008. **67**(4): p. 518-523.
49. Haslam, S.M., et al., *Characterisation of the phosphorylcholine-containing N-linked oligosaccharides in the excretory-secretory 62 kDa glycoprotein of Acanthocheilonema viteae*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1997. **85**(1): p. 53-66.
50. Hulsmeier, A.J., et al., *An Echinococcus multilocularis coproantigen is a surface glycoprotein with unique O-glycosylation*. *Glycobiology*, 2010. **20**(1): p. 127-135.
51. Meevissen, M.H., et al., *Structural characterization of glycans on omega-1, a major Schistosoma mansoni egg glycoprotein that drives Th2 responses*. *Journal of Proteome Research*, 2010. **9**(5): p. 2630-2642.
52. van Die, I. and R.D. Cummings, *Glycan gimmickry by parasitic helminths: a strategy for modulating the host immune response?* *Glycobiology*, 2010. **20**(1): p. 2-12.
53. Meyer, S., et al., *DC-SIGN mediates binding of dendritic cells to authentic pseudo-LewisY glycolipids of Schistosoma mansoni cercariae, the first parasite-specific ligand of DC-SIGN*. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. **280**(45): p. 37349-37359.
54. Persat, F., et al., *Glycosphingolipids with Gal beta 1----6Gal sequences in metacestodes of the parasite Echinococcus multilocularis*. *Journal of Biological Chemistry*, 1992. **267**(13): p. 8764-8769.
55. Persat, F., et al., *Detection of antibodies against glycolipids of Echinococcus multilocularis metacestodes in sera of patients with alveolar hydatid disease*. *Parasite Immunol*, 1991. **13**(4): p. 379-89.
56. Dennis, R.D., et al., *Glycosphingolipids in cestodes. Chemical structures of ceramide monosaccharide, disaccharide, trisaccharide and tetrasaccharide from metacestodes of the fox tapeworm, Taenia crassiceps (Cestoda: Cyclophyllidea)*. *European Journal of Biochemistry*, 1992. **207**(3): p. 1053-1062.
57. Lopez-Marin, L.M., et al., *Structure and antigenicity of the major glycolipid from Taenia solium cysticerci*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2002. **119**(1): p. 33-42.



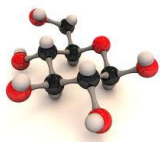
58. Nishimura, K., A. Suzuki, and H. Kino, *Sphingolipids of a cestode Metrolia sthes coturnix*. Biochimica et Biophysica Acta, 1991. **1086**(2): p. 141-150.
59. Yamano, K., et al., *Serodiagnostic potential of chemically synthesized glycosphingolipid antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for alveolar echinococcosis*. Journal of Helminthology, 2006. **80**(4): p. 387-391.
60. Schmidt, J., *Complex carbohydrates in shell precursor globules of the vitellarium and at the eggshell of Hymenolepis microstoma (Cestoda)*. Parasitology Research, 1996. **82**(2): p. 157-164.
61. Alvarez Errico, D., et al., *O-glycosylation in Echinococcus granulosus: identification and characterization of the carcinoma-associated Tn antigen*. Experimental Parasitology, 2001. **98**(2): p. 100-109.
62. Casaravilla, C., et al., *Mucin-type O-glycosylation in helminth parasites from major taxonomic groups: evidence for widespread distribution of the Tn antigen (GalNAc-Ser/Thr) and identification of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase activity*. Journal of Parasitology, 2003. **89**(4): p. 709-714.
63. Osinaga, E., et al., *Analysis of the fine specificity of Tn-binding proteins using synthetic glycopeptide epitopes and a biosensor based on surface plasmon resonance spectroscopy*. FEBS Letters, 2000. **469**(1): p. 24-28.
64. Freire, T., et al., *Characterization of a UDP-N-acetyl-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase with an unusual lectin domain from the platyhelminth parasite Echinococcus granulosus*. The Biochemical Journal, 2004. **382** p. 501-510.
65. Ingold, K., B. Gottstein, and A. Hemphill, *High molecular mass glycans are major structural elements associated with the laminated layer of in vitro cultivated Echinococcus multilocularis metacestodes*. International Journal of Parasitology., 2000. **30**(2): p. 207-214.
66. Hulsmeier, A.J., et al., *A major Echinococcus multilocularis antigen is a mucin-type glycoprotein*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(8): p. 5742-5748.
67. Koizumi A, H.N., Kaburaki A, Yamano K, Schweizer F, Takeda T., *Synthetic studies on the carbohydrate moiety of the antigen from the parasite Echinococcus multilocularis*. Carbohydrate Research, 2009. **344**(7): p. 856-868.



68. Koizumi, A.Y., K; Schweizer, F; Takeda, T; Kiuchi, F; Hada, N., *Synthesis of the carbohydrate moiety from the parasite Echinococcus multilocularis and their antigenicity against human sera*. European Journal of Medicinal chemistry, 2011. **46**(5): p. 1768-1778.
69. Freire, T., et al., *Antígenos mucínicos de O-glicosilación simple: nuevas similitudes moleculares entre células cancerosas y parásitos*. Actas de Fisiología, 2002. **8**: p. 18.
70. Díaz, A., et al., *The major surface carbohydrates of the Echinococcus granulosus cyst: mucin-type O-glycans decorated by novel galactose-based structures*. Biochemistry, 2009. **48**(49): p. 11678-11691.
71. Davies, M., et al., *High-performance liquid chromatography of oligosaccharide alditols and glycopeptides on a graphitized carbon column*. Journal of Chromatography, 1992. **609**(1-2): p. 125-131.
72. Casaravilla, C. and A. Díaz, *Studies on the structural mucins of the Echinococcus granulosus laminated layer*. Molecular and Biochemical Parasitology, 2010.
73. Parkinson, P., et al., *A Transcriptomic Analysis of Echinococcus granulosus Larval Stages: Implications for Parasite Biology and Host Adaptation*. PLoS Neglected Tropical Diseases, en publicación. Aceptado para publicación.
74. Baz, A., et al., *Antibody response in CD4-depleted mice after immunization or during early infection with Echinococcus granulosus*. Parasite Immunology, 1999. **21**(3): p. 141-510.
75. Dematteis, S., et al., *Modulation of the cellular immune response by a carbohydrate rich fraction from Echinococcus granulosus protoscoleces in infected or immunized Balb/c mice*. Parasite Immunology, 2001. **23**(1): p. 1-9.
76. Baz, A., et al., *Echinococcus granulosus: induction of T-independent antibody response against protoscolex glycoconjugates in early experimental infection*. Exp Parasitol, 2008. **119**(4): p. 460-6.
77. Walker, M., et al., *Isolation and characterization of a secretory component of Echinococcus multilocularis metacestodes potentially involved in modulating the host-parasite interface*. Infection and Immunity., 2004. **72**(1): p. 527-536.
78. Basika, T., et al., *Phagocyte-specific S100 proteins in the local response to the Echinococcus granulosus larva*. Parasitology, 2012. **139**(2): p. 271-283.



79. Carlson, DM., *Structures and immunochemical properties of Oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucin*. The Journal of Biological Chemistry, 1968. 241(12): p. 616-626
80. Morelle, W. and J.C. Michalski, *Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry*. Nature Protocols, 2007. 2(7): p. 1585-1602.
81. Hakomori, S., *A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide*. Journal of Biochemistry, 1964. 55: p. 205-258
82. J., Z., *Mass spectrometry of oligosaccharides*. Mass Spectrometry Reviews, 2004. 23: p. 161-227.
83. Ceroni A, M.K., Geyer H, Geyer R, Dell A, Haslam SM., *GlycoWorkbench: a tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans*. Journal of Proteome Research, 2008. 7(4): p. 1650-1659
84. Ceroni A, D.A., Haslam SM., *The GlycanBuilder: a fast, intuitive and flexible software tool for building and displaying glycan structures*. Source Code for Biology and Medicine 2007. 7(2).
85. Domon, B., Costello, C, *A systematic nomenclature of carbohydrate fragmentation in FAB-MS/MS spectra of glycoproteins*. Glycoconjugate Journal, 1988. 5: p. 12.
86. Fournet B, S.G., Leroy Y, Montreuil J., *Gas-liquid chromatography and mass spectrometry of methylated and acetylated methyl glycosides. Application to the structural analysis of glycoprotein glycans*. Anal Biochem, 1981. 116(2): p. 489-502.
87. Loss A, B.P., Bohne A, Loss A, Schwarzer E, Lang E, von der Lieth CW., *SWEET-DB: an attempt to create annotated data collections for carbohydrates*. Nucleic Acids Research, 2002. 30(1): p. 405-408.
88. Lutteke, T., et al., *GLYCOSCIENCES.de: an Internet portal to support glycomics and glycobiology research*. Glycobiology, 2006. 16(5): p. 71-81.
89. van Halbeek, H., *NMR developments in structural studies of carbohydrates and their complexities*. Current Opinion in Structural Biology 1994. 4: p. 12.
90. L., S., *The quantitative estimation of cerebroside in nervous tissue, with especial reference to gangliosides*. Journal of Neurochemistry, 1956. 1: p. 5-15.
91. Wieruszeski JM, M.J., Montreuil J, Strecker G, Peter-Katalinic J, Egge H, van Halbeek H, Mutsaers JH, Vliegthart JF., *Structure of the monosialyl oligosaccharides derived*



from salivary gland mucin glycoproteins of the Chinese swiftlet (genus *Collocalia*). Characterization of novel types of extended core structure, Gal beta(1----3)[GlcNAc beta(1---6)] GalNAc alpha(1----3)GalNAc(-ol), and of chain termination, [Gal alpha(1----4)]0-1[Gal beta(1----4)]2GlcNAc beta(1----.). *The Journal of Biological Chemistry*, 1987. **262**(14): p. 6650-6657.

92. Keeler, J., *Understanding NMR spectroscopy*. 2nd ed 2010, Chichester: John Wiley. xiii, 511 p.
93. Strecker, G., et al., *Primary structure of 12 neutral oligosaccharide-alditols released from the jelly coats of the anuran *Xenopus laevis* by reductive beta-elimination*. *Glycobiology*, 1995. **5**(1): p. 137-146.
94. Bennett, E.P., et al., *Cloning of a human UDP-N-acetyl-alpha-D-Galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase that complements other GalNAc-transferases in complete O-glycosylation of the MUC1 tandem repeat*. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. **273**(46): p. 30472-30481.
95. Ingold, K., et al., *Characterization of the laminated layer of in vitro cultivated *Echinococcus vogeli* metacestodes*. *Journal of Parasitology*, 2001. **87**(1): p. 55-64.
96. Irimura, T., et al., *Diverse glycosylation of MUC1 and MUC2: potential significance in tumor immunity*. *Journal of Biochemistry*, 1999. **126**(6): p. 975-985.
97. Burchell, J., et al., *Development and characterization of breast cancer reactive monoclonal antibodies directed to the core protein of the human milk mucin*. *Cancer Research*, 1987. **47**(20): p. 5476-5482.
98. Beum, P.V. and P.W. Cheng, *Biosynthesis and function of beta 1,6 branched mucin-type glycans*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2001. **491**: p. 279-312.
99. Stanley, P. and R.D. Cummings, *Structures Common to Different Glycans*, in *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, et al., Editors. 2009, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY. p. 175-197.
100. Habibi, B., et al., *Blood group antigens on fetal red cells obtained by umbilical vein puncture under ultrasound guidance: a rapid hemagglutination test to check for contamination with maternal blood*. *Pediatric Research*, 1986. **20**(11): p. 1082-1084.
101. Hirvonen, T., et al., *The i blood group antigen as a marker for umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells*. *Stem Cells and Development*, 2012. **21**(3): p. 455-464.



102. Bierhuizen, M.F., M.G. Mattei, and M. Fukuda, *Expression of the developmental I antigen by a cloned human cDNA encoding a member of a beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase gene family*. *Genes and Development*, 1993. **7**(3): p. 468-478.
103. Morelle, W. and G. Strecker, *Structural analysis of the oligosaccharide-alditols released by reductive beta-elimination from the jelly coat of Rana utricularia eggs*. *Biochemical Journal*, 1997. **321** (Pt 3): p. 879-887.
104. Guerardel, Y., et al., *O-glycan variability of egg-jelly mucins from Xenopus laevis: characterization of four phenotypes that differ by the terminal glycosylation of their mucins*. *Biochemical Journal*, 2000. **352** Pt 2: p. 449-463.
105. Huang, H.H., P.L. Tsai, and K.H. Khoo, *Selective expression of different fucosylated epitopes on two distinct sets of Schistosoma mansoni cercarial O-glycans: identification of a novel core type and Lewis X structure*. *Glycobiology*, 2001. **11**(5): p. 395-406.
106. Khoo, K.H., et al., *A unique multifucosylated -3GalNAc beta 1-->4GlcNAc beta 1-->3Gal alpha 1- motif constitutes the repeating unit of the complex O-glycans derived from the cercarial glycocalyx of Schistosoma mansoni*. *Journal of Biological Chemistry*, 1995. **270**(29): p. 17114-17123.
107. Nyame, K., R.D. Cummings, and R.T. Damian, *Schistosoma mansoni synthesizes glycoproteins containing terminal O-linked N-acetylglucosamine residues*. *Journal of Biological Chemistry*, 1987. **262**(17): p. 7990-7995.
108. Ben-Ismail, R., B. Carme, and M. Gentilini, *[Abnormal anti-P1 activity during hepatic distomatosis fasciolasis (author's transl)]*. *Nouvelle Presse Medicale*, 1978. **7**(47): p. 4300.
109. Ben-Ismail, R., B. Carme, and M. Gentilini, *[Detection of blood group P1 activity in F. hepatica and F. gigantica (author's transl)]*. *Pathologie Biologie*, 1979. **27**(8): p. 487-489.
110. Ben-Ismail, R., et al., *Non-specific serological reactions with Echinococcus granulosus antigens: role of anti-P1 antibodies*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1980. **29**(2): p. 239-245.
111. Bombardieri, S., et al., *An evaluation of an agar gel diffusion test with crude and purified antigens in the diagnosis of hydatid disease*. *Bulletin of the World Health Organization*, 1974. **51**(5): p. 525-530.



112. Duk, M., et al., *Anti-alpha-galactosyl antibodies recognizing epitopes terminating with alpha1,4-linked galactose: human natural and mouse monoclonal anti-NOR and anti-P1 antibodies*. *Glycobiology*, 2005. **15**(2): p. 109-118.
113. Deplazes, P. and B. Gottstein, *A monoclonal antibody against Echinococcus multilocularis Em2 antigen*. *Parasitology.*, 1991. **103 Pt 1**: p. 41-49.
114. Yamano, K., et al., *Galalpha1-4Galbeta1-3GalNAc is the dominant epitope of Em2 antigen, the mucin-type glycoprotein from Echinococcus multilocularis*. *Parasitology Research*, 2012. **111**(2): p. 795-805.
115. Kuijk, L.M. and I. van Die, *Worms to the rescue: can worm glycans protect from autoimmune diseases?* *IUBMB Life*, 2010. **62**(4): p. 303-312.