

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas
Área Biología, opción Biología celular y molecular
Tesis de Maestría

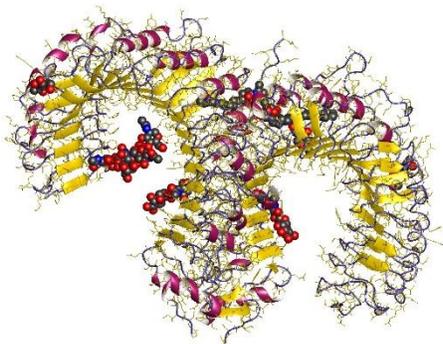
**Análisis de glicoproteínas de *Trypanosoma cruzi* como potenciales
ligandos de receptores de tipo Toll de la Inmunidad innata**

Lic. Mercedes Landeira Escames

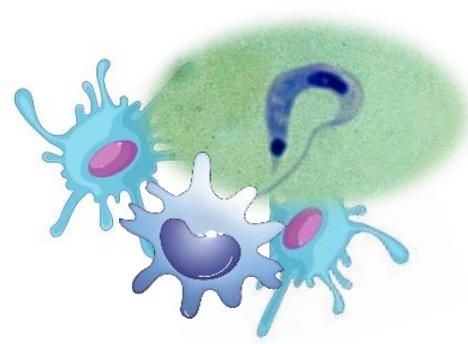
Orientadora: Dra. Teresa Freire

Co-orientadoras: Dra. Cecilia Giacomini y Dra. María Florencia Festari

Laboratorio de Inmunomodulación y desarrollo de Vacunas,
Departamento de Inmunobiología, Facultad de Medicina, UdelaR
Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, UdelaR



15 de diciembre de 2021



CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	6
ABREVIATURAS	9
AGRADECIMIENTOS	11
RESUMEN	12
INTRODUCCIÓN.....	13
Parte 1 – GENERALIDADES SOBRE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	13
1.a – ENFERMEDAD DE CHAGAS	13
1.b – BIOLOGÍA DE T. CRUZI	14
1.c – CICLO DE VIDA DE T. CRUZI	15
1.d– CEPAS DE T. CRUZI	17
1.e – MOLÉCULAS PARASITARIAS GLICOSILADAS.....	18
Parte 2 – SISTEMA INMUNE INNATO	22
2.a – RECEPTORES Y CÉLULAS DE LA INMUNIDAD INNATA	22
2.b – RECEPTORES DE TIPO TOLL (TLRs)	24
2.c – VÍNCULO ENTRE LA INMUNIDAD INNATA Y ADAPTATIVA	25
2.d – RESPUESTA INNATA INDUCIDA POR T. CRUZI.....	26
Parte 3 – RELACIÓN CÁNCER-PARÁSITOS	28
3.a – PROPIEDADES ANTITUMORALES DE MOLÉCULAS PARASITARIAS	28
3.b – ANTECEDENTES DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN.	30
Parte 4 – GLICOSIDASAS COMO HERRAMIENTAS PARA EL ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS.....	33
4.a – ESTUDIO DE LAS ESTRUCTURAS DE GLICOCONJUGADOS	33
4.b – INMOVILIZACIÓN	34
4.c – GLICOSIDASAS DE INTERÉS GLICOBiolóGICO	38
4.d – LECTINAS COMO REPORTEROS DE DEGLICOSILACIÓN	41
HIPÓTESIS.....	43
OBJETIVO GENERAL.....	43
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
MATERIALES Y MÉTODOS	44
OBTENCIÓN DE LISADOS PARASITARIOS	44
Cultivo de parásitos <i>Trypanosoma cruzi</i> en estadio Epimastigota	44
Lisados parasitarios de epimastigotas desnaturalizados (epi-TC-DOC).....	44

Lisados parasitarios de epimastigotas nativos (epi-TC-Nativos).....	44
Diálisis del Lisado epi-TC	45
ANÁLISIS DE LOS LISADOS PARASITARIOS	45
Cuantificación de proteínas	45
Ensayos ELLA (Enzyme-Linked Lectin assay)	46
Electroforesis SDS – PAGE.....	47
Tinción de Glicoproteínas	48
Lectin Blot	48
ENZIMAS INMOVILIZADAS	49
Medida de Actividad Enzimática	49
Inmovilización de enzimas	54
Evaluación de la Inmovilización	57
DEGLICOSILACIÓN CON DERIVADOS INMOVILIZADOS	58
Deglicosilación de lisados de <i>T. cruzi</i>	58
Deglicosilación de Glicoproteínas Modelo.....	59
Degalactosilación de asialofetulina y asialolactoferrina.....	59
Desialilación de fetulina y lactoferrina	59
PURIFICACIÓN DE MUCINAS ANCLADAS A GPI DE <i>T. CRUZI</i>	60
CULTIVO CELULAR.....	60
Líneas Celulares.....	61
Ensayo de activación HEK-293 TLRs clásicas.....	62
Ensayo de MTT.....	63
ELISA de IL-8 (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).....	63
Ensayo de activación HEK-Blue	64
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	65
RESULTADOS	65
1- Estudio del reconocimiento por TLRs de un lisado parasitario de <i>T. cruzi</i>	66
Caracterización general de los lisados	66
Identificación de la presencia de ligandos de TLRs en lisados epi-TC.....	67
2- Estudio de los motivos carbohidratos presentes en los lisados parasitarios.	75
Búsqueda de proteínas glicosiladas en los lisados parasitarios.....	75
Reconocimiento del lisado epi-TC-DOC Dm28c por lectinas	77
Variabilidad de los motivos carbohidratos del lisado epi-TC-DOC de Dm28c	80

Reconocimiento de los lisados epi-TC-DOC y epi-TC-Nativo de las cepas Sylvio, Esmeraldo, Arse, TcvT-1 y Dm28c por lectinas	83
Reconocimiento de los lisados parasitarios por ConA.....	85
3- Deglicosilación específica del lisado parasitario mediante el uso de glicosidasas inmovilizadas ..	89
Estabilidad del lisado de <i>T. cruzi</i> a 37°C.....	90
Inmovilización de Glicosidasas.....	91
Deglicosilación de lisados de <i>T. cruzi</i>	94
Demanosilación con α -manosidasa	98
Defucosilación con α -fucosidasa	101
Degalactosilaciones con β -galactosidasa.....	103
Desialilación con neuraminidasa	107
4- Determinación del papel de los carbohidratos parasitarios en el reconocimiento por TLRs.....	111
Papel de los glicanos parasitarios en inducir la activación del hTLR2.....	111
Papel de los glicanos parasitarios en inducir la activación del m/hTLR4.....	115
5- Análisis del reconocimiento por TLRs de Mucinas ancladas a GPI purificadas a partir de <i>T. cruzi</i> ...	119
DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS	124
BIBLIOGRAFÍA.....	135

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Estadíos de *T. cruzi*.

Figura 2. Ciclo de infección de *T. cruzi*.

Figura 3. Glicoconjugados representativos en la superficie de *T. cruzi* epimastigotas.

Figura 4. Configuraciones de galactosa (Gal) encontradas en mucinas de *T. cruzi*.

Figura 5. Vínculo entre la inmunidad innata y adaptativa.

Figura 6. Diversidad de receptores de tipo Toll.

Figura 7. Los glicoconjugados presentes en el lisado epimastigota Dm28c de *T. cruzi* median la protección tumoral.

Figura 8. Clasificación de métodos de inmovilización enzimática.

Figura 9. Mecanismo de activación de la agarosa por el método CDAP para inmovilización de proteínas.

Figura 10. Electroforesis comparativa de lisados epi-TC-DOC y epi-TC-Nativo de Dm28c cuantificados por BCA y por Nanodrop.

Figura 11. Activación de HEK-293/TLRs clásicas con ligandos presentes en el lisado epi-TC-DOC Dm28c.

Figura 12. Activación de HEK-293/TLRs-*Blue* con ligandos presentes en epi-TC-Nativo Dm28c.

Figura 13. Activación de HEK-293/TLRs-*Blue* con ligandos presentes en epi-TC-Nativo Tcvt-1.

Figura 14. Activación de HEK-293/TLRs-*Blue* con ligandos presentes en epi-TC-Nativo Sylvio X10.

Figura 15. Activación de HEK-293/TLRs-*Blue* con ligandos presentes en epi-TC-Nativo Esmeraldo CL3.

Figura 16. Activación de HEK-293/TLRs-*Blue* con ligandos presentes en epi-TC-Nativo Arse.

Figura 17. Electroforesis por SDS PAGE de lisados epi-TC-DOC y epi-TC-Nativo de diferentes cepas de *T. cruzi* y posterior tinción de las proteínas totales con azul de coomasie y de las glicoproteínas con tinción específica para carbohidratos.

Figura 18. ELLA de epi-TC-DOC DM28c.

Figura 19. Reconocimiento de motivos carbohidratos por lectinas en diferentes lotes de epi-TC-DOC Dm28c.

Figura 20. ELLA de lisados epi-TC-DOC y epi-TC-Nativo provenientes de diferentes cepas de *T. cruzi*.

Figura 21. Lectin Blot de lisados epi-TC-DOC (DOC) y epi-TC-Nativos (Nat) con ConA.

Figura 22. ELLA de lisado epi-TC-DOC incubado a 37°C por 24 horas con agitación.

Figura 23. Reconocimiento por parte de lectinas de los lisados parasitarios deglicosilados con PNGasa F.

Figura 24. Esquema de la deglicosilación por PNGasa F.

Figura 25. Reconocimiento por parte de lectinas de los lisados parasitarios deglicosilados con α -manosidasa.

Figura 26. Reconocimiento por parte de lectinas de los lisados parasitarios deglicosilados con α -Fucosidasa.

Figura 27. Reconocimiento por parte de lectinas del lisado epi-TC-DOC de DM28c deglicosilado con β -Galactosidasa.

Figura 28. Estructura de los carbohidratos presentes en las glicoproteínas modelo Fetuína, Asialo Fetuína, Lactoferrina y Asialo Lactoferrina.

Figura 29. Deglicosilación de glicoproteínas modelo con β -Galactosidasa inmovilizada en agarosa.

Figura 30. Reconocimiento por parte de lectinas del lisado epi-TC-DOC de Dm28c deglicosilado con Neuraminidasa.

Figura 31. Deglicosilación de glicoproteínas modelo con Neuraminidasa inmovilizada en agarosa.

Figura 32. Activación de HEK-293/hTLR2-*Blue* con ligandos presentes en epi-TC-DOC Dm28c depletado de *N*-glicanos.

Figura 33. Activación de HEK-293/hTLR2-*Blue* con ligandos presentes en epi-TC-Nativo de Dm28c (A) y TvcT-1 (B) depletados de manosas terminales.

Figura 34. Activación de HEK-293/hTLR2-*Blue* con ligandos presentes en epi-TC-Nativo de DM28c y TvcT-1 depletados de fucosas terminales.

Figura 35. Activación de HEK-293 h/mTLR4-*Blue* con ligandos presentes en epi-TC-DOC Dm28c depletado de *N*-glicanos.

Figura 36. Activación de HEK-293/h/mTLR4-*Blue* con ligandos presentes en epi-TC-Nativo de DM28c y TcvT-1 depletados de manosas terminales.

Figura 37. Activación de HEK-293/h/mTLR4-*Blue* con ligandos presentes en epi-TC-Nativo de Dm28c y TcvT-1 depletados de fucosas terminales.

Figura 38. Estructura de Mucina de *T. cruzi* anclada a GPI. Extraído de referencia Acosta Serrano et. al. 1995.

Figura 39. Electroforesis SDS-PAGE de mucinas purificadas a partir de la cepa Dm28c.

Figura 40. Evaluación de la reactividad por parte de lectinas de las diferentes fracciones obtenidas en la cromatografía realizada para purificar las mucinas de la cepa Dm28c de *T. cruzi*.

Figura 41. Activación de HEK-293/mTLR4 clásicas con las mucinas purificadas a partir de la cepa DM28c. La línea Null corresponde al control de la línea mTLR4.

Figura 42. Árbol molecular de asociación de diferentes especies con la especificidad de los dominios extracelulares de los TLR de mamíferos.

Tabla 1. Lectinas utilizadas en este trabajo.

Tabla 2. Líneas HEK-clásicas y sus ligandos activadores.

Tabla 3. Líneas HEK-*Blue* y sus ligandos activadores

Tabla 4. Soluciones buffer evaluadas con los lisados epi-TC-DOC.

Tabla 5. Inmovilización de glicosidasas

ABREVIATURAS

ADN – Ácido Desoxirribonucleico
ARN - Ácido Ribonucleico
Asn - Asparagina
BCA – Ácido Bicinconínico
BSA – Albúmina de Suero Bovino
CDAP-BF4 - Ciano-4-dimetil-amino-piridinio tetrafluoro borato
CLR – Receptor Lectina Tipo C
ConA – Lectina de *Canavalia ensiformis*, ConcavalinaA
DC – Célula Dendrítica
DC-SIGN – DC-specific ICAM-3-grabbing non-integrin
DMSO – Dimetilsulfósido
DTT – Ditiotreitól
ECA – Aglutinina de *Erythrina cristagali*
EDTA – Ácido etilendiaminotetraacético
ER – Retículo endoplásmico
FBS – Suero fetal bovino
Gal – Galactosa
GH – Glicósido hidrolasa
Glc – Glucosa
GalNAc – *N*-acetil galactosamina
GlcNAc – *N*-acetil glucosamina
HPA – Aglutinina de *Helix pomatia*
IFN – Interferon
IL- – Interleuquina
LPS – Lipopolisacárido – Ligando de TLR4
Mφ – Macrófago
Mal II – Lectina de *Maackia amurensis* II
MBL – Lectina de unión a manosa
MeOH – Metanol
MHC – Complejo mayor de histocompatibilidad
MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio
NK – Natural Killer
NO – Óxido nítrico
OMS – Organización Mundial de la Salud
PAMP – Patrón Molecular Asociado a Patógenos
PBS – Buffer fosfato salino
PNA – Aglutinina de *Arachis hypogaea*
PNGasa-F – Peptido-*N*-glicosidasa F
PRR – Receptor de reconocimiento de patrones
SBA – Aglutinina de *Glycine max*
SDS – Sodio dodecil sulfato
Ser – Serina
SNA – Aglutinina de *Sambucus Nigra*
T_H1 – Linfocito T colaborador de tipo 1

T_H2 – Linfocito T colaborador de tipo 2
Thr – Treonina
TLR – Receptor de tipo Toll
TNF α – Factor de necrosis tumoral alfa
Treg – Linfocito T regulador
VVA – Isolectina de *Vicia villosa*
WGA – Aglutinina de *Ariticum vulgaris*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecerle a mi orientadora y co-orientadoras Teresa Freire, Cecilia Giacomini y Florencia Festari. Gracias por abrirme las puertas de su laboratorio en un área nueva para mí, por todo su trabajo y dedicación para contribuir con mi formación desde el primer día, por su tiempo y dedicación invertidos en este proyecto y por ser grandes profesoras. Gracias por preocuparse por mí cuando surgieron dificultades y por ser un gran equipo.

A mis compañeros de laboratorio, Vale, Moni, Santi, Pablo y Miguel. Gracias por estar siempre dispuestos a ayudar, por su compañerismo y amistad. Por su buena onda siempre y por formar un gran equipo de trabajo. También a Lorena y a María Eugenia por colaborar en las últimas deglicosilaciones para que pudiera cumplir con los plazos.

A los participantes del proyecto, Eduardo, Viviana y Álvaro, por su gran contribución en el desarrollo del proyecto, por las charlas científicas enriquecedoras y por aportar material para el desarrollo de este trabajo.

A los miembros de este tribunal, los Dres. Karen Ovsejevi, Álvaro Pittini y Cecilia Porciúncula, por aceptar evaluar este trabajo en tan corto tiempo.

A PEDECIBA, GSK-ANII y CAP, por el apoyo económico para realizar este posgrado

A Seba, por ser mi compañero de vida incondicional, por compartir conmigo los momentos lindos y por aguantarme en los de más estrés. Gracias por todo el apoyo y amor.

A mi familia, mis padres, mi hermano y mis abuelos. Gracias por formarme como persona, por motivarme a ser mejor cada día, por apoyarme en todo lo que me propongo. Gracias por ayudarme siempre, por todo su cariño y por estar presentes.

RESUMEN

Resultados de nuestro equipo de trabajo han demostrado que componentes del parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* inducen respuestas anti-tumorales limitando el crecimiento tumoral no sólo en protocolos preventivos, sino también en condiciones terapéuticas, y que estas se asocian a la presencia de células asesinas naturales (NK) activadas. Además, hemos evidenciado que los glúcidos presentes en el lisado parasitario son esenciales en mediar la respuesta anti-tumoral protectora. Considerando estos antecedentes, junto con el hecho de que diferentes moléculas de *T. cruzi* pueden interactuar con receptores de la inmunidad innata (como el TLR2, TLR4, TLR9), el objetivo general de esta tesis consistió en determinar si los glicanos presentes en proteínas parasitarias participan en el reconocimiento por parte de receptores innatos, en particular los receptores de tipo *Toll* (TLR). Para ello, llevamos a cabo una caracterización de los glicanos presentes en los componentes parasitarios a través del uso de lectinas y de glicosidasas inmovilizadas. También caracterizamos el perfil de reconocimiento de lectinas del lisado a través de inmunoensayos, los cuales brindan información sobre los azúcares que se encuentran presentes en el mismo. Evidenciamos la presencia de manosas, glucosas, galactosa, o *N*-acetil- α -galactosas terminales. Además, generamos lisados parasitarios deglicosilados utilizando glicosidasas inmovilizadas, que nos permitieron estudiar la interacción receptor-ligando de estos componentes y ver si se ve afectada por la ausencia de grupos carbohidratos específicos. Por otra parte, purificamos proteínas del tipo mucina de la superficie de *T. cruzi*, que son de gran interés en este contexto ya que son fuertemente reconocidas por la lectina Concanalina-A y son potenciales ligandos de TLR. En conclusión, en esta tesis hemos desarrollado herramientas que permitieron profundizar en la caracterización glicobiológica de un lisado parasitario con componentes que inducen una respuesta inmune anti-tumoral y su interacción con receptores de la inmunidad innata.

INTRODUCCIÓN

Parte 1 – GENERALIDADES SOBRE *TRYPANOSOMA CRUZI*

1.a – ENFERMEDAD DE CHAGAS

La tripanosomiasis americana, conocida también como enfermedad de Chagas, es una enfermedad parasitaria descrita en el año 1909 por el Médico e Investigador Carlos Chagas, causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Esta enfermedad se transmite a mamíferos, entre ellos los humanos, mediante vectores insectos hematófagos de la subfamilia *Triatominae*, conocidas comúnmente como chinches o vinchucas. El contagio ocurre cuando las heces del insecto que contienen a los parásitos entran en contacto con la sangre del huésped, en la zona de la herida producida por su picadura ¹.

A pesar de que se han identificado más de 130 especies de triatominos, solamente algunos pocos actúan como vectores competentes para *T. cruzi*. Dentro de ellos, se destaca a *Triatoma infestans* por su abundancia en Sudamérica, el cual presenta una amplia distribución y puede habitar en áreas domésticas de alta densidad de población². Además, la enfermedad puede transmitirse por mecanismos no vectoriales, como la transfusión sanguínea, la transmisión vertical, los trasplantes de órganos o la ingesta de alimentos contaminados ³.

La prevalencia actual de esta enfermedad se estima en 6 millones de personas. A pesar de esto, la transmisión por vectores fue interrumpida en varios países de América, entre ellos Uruguay. A través del control vectorial y otras medidas de salud pública se ha logrado reducir la incidencia de nuevos casos, así como el número de muertes por esta enfermedad ⁴⁵. Sin embargo, el flujo de emigrantes desde regiones endémicas hacia distintas áreas no endémicas como EEUU, Canadá y Europa, ha convertido a esta enfermedad en un problema de salud pública en otros países.

El 30% de los pacientes infectados manifiesta síntomas graves típicos de la fase crónica, que se relacionan con alteraciones estructurales y funcionales del corazón, esófago, colon, o la combinación de estos, dando 3 formas mayoritarias: cardíaca, digestiva o cardiodigestiva. La forma cardíaca es la más severa, afecta al 20-30% de los individuos y es potencialmente mortal ⁶¹.

La patogenia es compleja y pobremente comprendida. Se piensa que involucra un componente autoinmune, una respuesta inflamatoria del hospedero, así como también daño causado por la persistencia del parásito en el tejido. Sin embargo, se ha acumulado evidencia que indica que el daño en el miocardio causado por la infección crónica con *T. cruzi* es consecuencia directa de la persistencia del parásito y de la inflamación crónica asociada y no tanto por los mecanismos autoinmunes ^{7 1}.

1.b – BIOLOGÍA DE T. CRUZI

El parásito *T. cruzi* es un protista unicelular, cuya morfología se caracteriza por la presencia de una única mitocondria y un flagelo presente en los estadios extracelulares. En la zona interna a la membrana celular se encuentran numerosos microtúbulos que se extienden a lo largo de todo el flagelo. Su membrana celular consiste en una bicapa lipídica donde se encuentran inmersas diferentes proteínas irregularmente distribuidas. Gran parte de estas se encuentran glicosiladas. Además, están presentes fosfolípidos, prevalentemente fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol. Con menor abundancia también se encuentran esfingomielina, fosfatidilserina, cardiolipina, ácido fosfático, fosfatidilinositol fosfato y fosfatidilinositol bifosfato. En la zona más superficial del parásito se encuentra la glicocálix, que es una fina capa de glicoconjugados que recubre externamente a todo el soma y es la que tiene contacto directo con el huésped. Ésta cambia tanto de composición como de grosor entre los diferentes estadios del parásito, siendo tres veces más densa en tripomastigotas que en epimastigotas (Figura 1) ⁸.

Por otro lado, en su citoplasma presenta algunos organelos característicos, como el kinetoplasto, que se fusiona con su mitocondria tubular y presenta paredes y crestas irregulares. De hecho, se considera que son parte de la misma estructura. Su apariencia depende del estadio en el que se encuentre. Esta estructura contiene altas concentraciones de ADN extranuclear, conocido como el ADNk, compuesto de aproximadamente 5.000 – 20.000 minicírculos y 50 maxicírculos que carecen de histonas. Los minicírculos son heterogéneos en su secuencia a pesar de presentar un tamaño similar. Dentro de ellos se encuentran fundamentalmente genes que codifican para ARNs guía necesarios en el proceso de edición de ARN mitocondrial. Este organelo contiene el 16 – 30% del genoma del parásito

^{9,10}.

Otro organelo característico de *T. cruzi* es el kinetosoma, también llamado cuerpo basal. Se trata de la continuación del flagelo y se asocia de forma cercana al kinetoplasto por la presencia de numerosos filamentos proteicos ¹¹. Por otro lado, otra estructura muy importante son los glicosomas, que consisten en organizaciones esféricas o alargadas claramente delimitadas por una membrana que contienen en su interior una variedad de enzimas glicosidasas ¹². Se consideran un tipo específico de peroxisoma de la familia de los trypanosomátidos, ya que en algunas especies se encontró catalasa dentro ellos.

El flagelo es otro organelo presente en algunos estadios de *T. cruzi* y está conformado por 9 pares de microtúbulos arreglados en forma circular, concéntricos a dos pares de microtúbulos inmersos en el citoplasma y rodeados por la membrana celular a lo largo de toda su extensión (Figura 1). Este se inserta en una región llamada bolsillo flagelar, que consiste en una invaginación del soma desde el cual se extiende el flagelo. Esta región se caracteriza por tener una alta actividad endo y exocítica.

Se pueden observar también reservosomas, que son inclusiones de proteasas y otras proteínas obtenidas por endocitosis, que se encuentran fundamentalmente en la región posterior del citoplasma del parásito, y desaparecen cuando el parásito pasa de estadio epimastigota a tripomastigota ¹³.

1.c – CICLO DE VIDA DE *T. CRUZI*

El ciclo de vida de *T. cruzi* involucra vertebrados (humano) e invertebrados (insectos hematófagos de la subfamilia *Triatomina*). Como se dijo anteriormente, el contagio se produce cuando las heces del insecto que contienen a los parásitos entran en contacto con la sangre del huésped, en la zona de la herida producida por su picadura (Figura 2).

Este parásito tiene tres formas evolutivas, identificadas por distinta morfología utilizando técnicas de microscopía óptica (Figura 1). Con el objetivo de adaptarse a diferentes microambientes exteriores, *T. cruzi* debe sufrir transformaciones biológicas que causan cambios estructurales y metabólicos, que le permiten sobrevivir y realizar una infección exitosa. Dependiendo de la posición del kinetoplasto en referencia al núcleo y la presencia o no del flagelo, se pueden diferenciar 3 estadios: epimastigota, tripomastigota y amastigota (Figura 1).

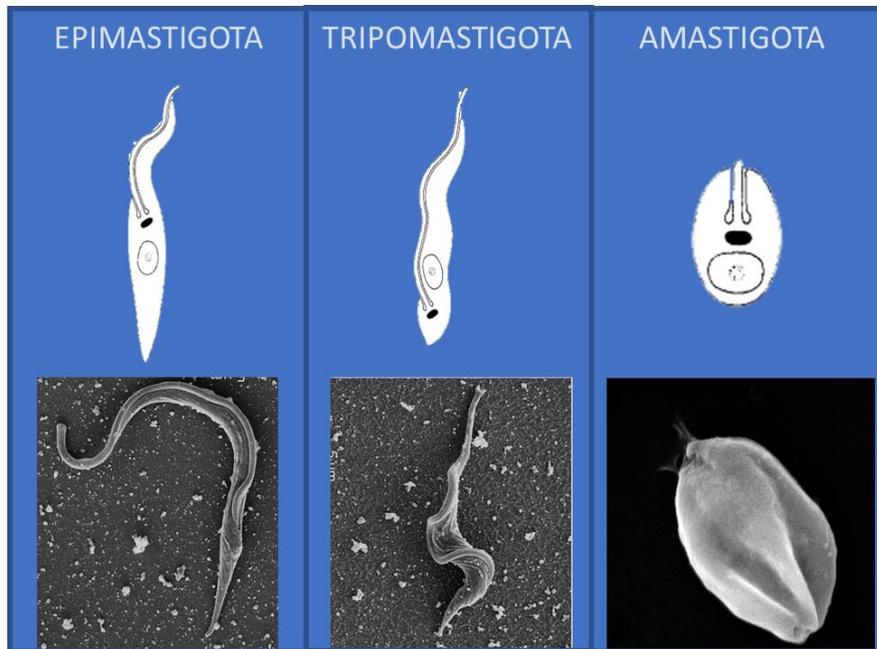


Figura 1. Estadíos de *T. cruzi*. En la parte superior se representa a modo de esquema la morfología de cada estadío del parásito. En la parte inferior se muestran imágenes de su morfología observada por microscopía electrónica de barrido. En el esquema se representa al núcleo como un óvalo sin relleno, al kinetoplasto como un óvalo más pequeño negro y al flagelo como una cinta que nace en el kinetoplasto.

La forma epimastigota de *T. cruzi* se encuentra en el tracto digestivo de su vector insecto. Presenta un flagelo libre, un kinetoplasto anterior al núcleo y una membrana pobremente ondulada. Mide entre 20 y 40 μm incluyendo al flagelo. Su núcleo es esférico y generalmente ocupa una ubicación central en el soma (Figura 1, izquierda). Es algo móvil, presenta mucha actividad replicativa por fisión binaria longitudinal y a menudo forma rosetas (pequeños cúmulos de parásitos con contacto estrecho). Esta forma no resiste los 37°C, su temperatura óptima de crecimiento es 20-28°C.

El estadío tripomastigota no posee capacidad replicativa y corresponde a la forma infectiva extracelular. Mide aproximadamente 17 μm y presenta un núcleo largo y central. Su kinetoplasto tiene alta cantidad de ADN y se encuentra en la zona terminal posterior. Su flagelo es corto y la membrana ondulada es estrecha (Figura 1, centro). Está presente en invertebrados y vertebrados como metacíclico y sanguíneo, respectivamente. El metacíclico se encuentra en las porciones finales del intestino o en los tubos de Malpighi del vector invertebrado. El tripomastigota sanguíneo se encuentra en la sangre y fluidos del huésped vertebrado.

Los parásitos invaden los macrófagos en el sitio de entrada y se transforman en amastigotas, que corresponden a la forma intracelular de *T. cruzi*, ubicados en los tejidos de su huésped vertebrado.

Se caracteriza por la ausencia de flagelo y de membrana ondulada, por lo tanto, su movimiento es solamente por rotación (Figura 1, derecha). Mide aproximadamente 4 μm de diámetro y replica por fisión binaria cada 12 horas. Si se libera a la circulación, es capaz de infectar otra célula.

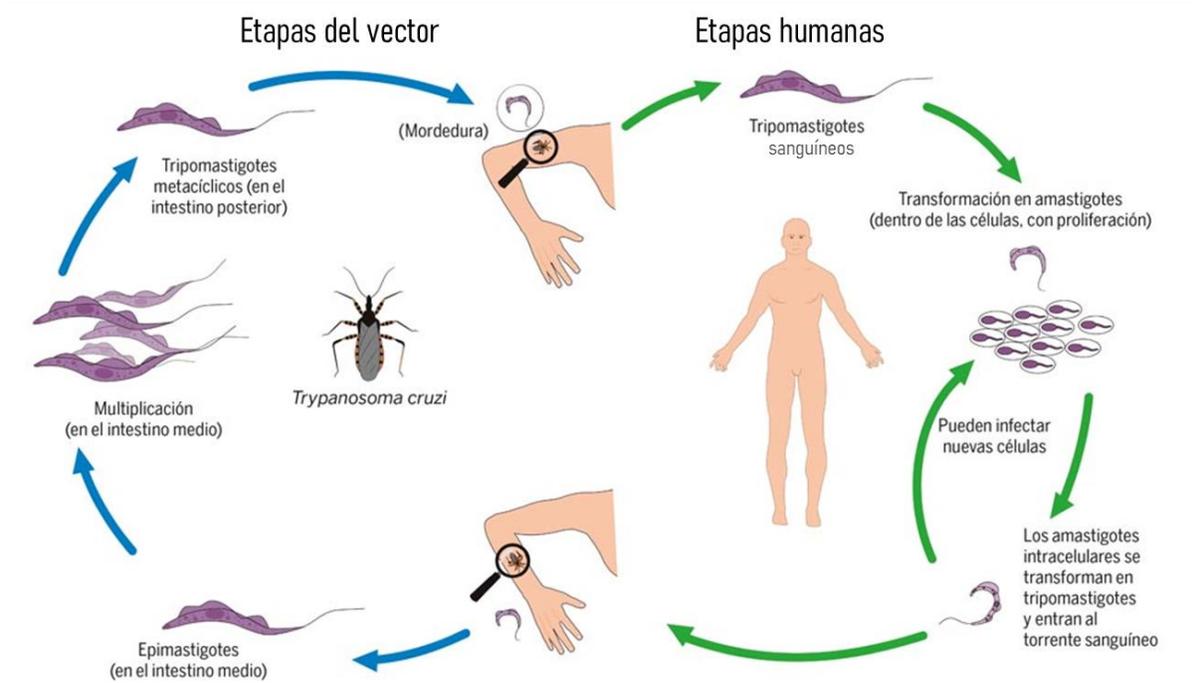


Figura 2. Ciclo de infección de *T. cruzi*. Se esquematizan las diferentes etapas del ciclo de vida del parásito, detallando al huésped en cada caso. Modificado de <https://www.gaceta.unam.mx/>.

1.d- CEPAS DE *T. CRUZI*

La especie *Trypanosoma cruzi* consiste en una población heterogénea de diversas cepas, con cierta variabilidad genética entre ellas. Una de las primeras caracterizaciones biológicas fue descrita por Brener en 1977, que identificó y describió a las cepas Y y CL. De hecho, CL fue la primera cepa totalmente secuenciada en 2005 y por este motivo es utilizada actualmente como cepa de referencia ¹⁴. A lo largo de los años se ha descrito una gran diversidad de cepas, que fueron categorizadas según las

Unidades de Tipificación Discretas (DTU) acordadas en un consenso internacional en el año 2009, las cuales clasifican a las cepas según su linaje genético en 6 grupos que van de I a VI ¹⁵. A continuación, se detallan las cepas parasitarias utilizadas en este trabajo.

DM28c: Esta cepa fue aislada en 1984 de una zarigüeya (*Didelphis marsupialis*) en Carabobo, Venezuela. Pertenece al grupo TcI, un grupo relacionado con el ciclo selvático que también se asocia con la enfermedad de Chagas en la Amazonia brasileña, Colombia y Centroamérica. Es una cepa altamente infectiva, por lo que es usada para experimentos *in vivo* ¹⁶¹⁷¹⁸.

Sylvio X10: Esta cepa también forma parte del grupo TcI y es una cepa de referencia común que representa a este grupo, usada con frecuencia en experimentos *in vivo* e *in vitro*. Fue aislada originalmente en 1983 de un individuo masculino en el estado de Pará, Brasil, que padecía la enfermedad de Chagas aguda ¹⁹.

TcvT-1c: Esta cepa se aisló en el año 2012 de un perro hembra de 5 años en Virginia, Estados Unidos. Sin embargo, el parásito no es patógeno en ratones inoculados experimentalmente, por lo que no se utiliza en experimentos *in vivo*. El análisis del ADN de esta cepa parasitaria cultivada *in vitro* determinó el genotipo de grupo TcIV, que es común en América del Norte ²⁰.

Esmeraldo CL3: La cepa Esmeraldo CL3 de *T. cruzi* se aisló en 1977 de un paciente masculino de 20 años con enfermedad de Chagas en fase aguda en Sao Felipe, Estado de Bahía, Brasil. Representa el grupo TcII, que se asocia al cono Sur de América Latina ²¹.

AR-SE23C (Arse): Esta cepa se encuentra categorizada dentro del grupo TcV y se aisló en Santiago del Estero Argentina, de un paciente de 57 años con infección crónica y estatus clínico de Miocardiopatía de Chagas. Estos parásitos presentan altos niveles de moléculas antioxidantes y son capaces de infectar ratones, los cuales muestran altos niveles de parasitemia y mortalidad. Sin embargo, son susceptibles a drogas como benzonidazol ¹¹.

[1.e – MOLÉCULAS PARASITARIAS GLICOSILADAS.](#)

Hace varias décadas se ha comenzado con el estudio de la glicosilación de *T. cruzi*. La superficie de este parásito está cubierta por una capa densa de glicoconjugados, y estos varían según el estadio en el que se encuentre ²². Cada estadio tiene sus motivos característicos de glicosilación, además de diferir

también en su abundancia, siendo el estadio tripomastigota el que presenta mayores niveles de glicosilación ²³. De hecho, se ha reportado por análisis de criofractura que la membrana de los epimastigotas tiene un espesor de 5 nm, mientras que la de los tripomastigotas es de 15 nm ²⁴, lo cual podría estar relacionado con diferente densidad de glicocálix.

La mayor parte de la capa de gliconjugados que recubre al parásito está compuesta por miembros de la familia de las glicoproteínas de tipo mucina (Figura 3). Se trata de proteínas polianiónicas altamente glicosiladas (alrededor de un 60% de su masa corresponde a grupos carbohidratos) que son ricas en residuos de treonina, serina y prolina y contienen pocos aminoácidos hidrofóbicos. Estas glicoproteínas están ancladas a la membrana plasmática por una región que contiene glicofosfatidilinositol (GPI) ²⁵.

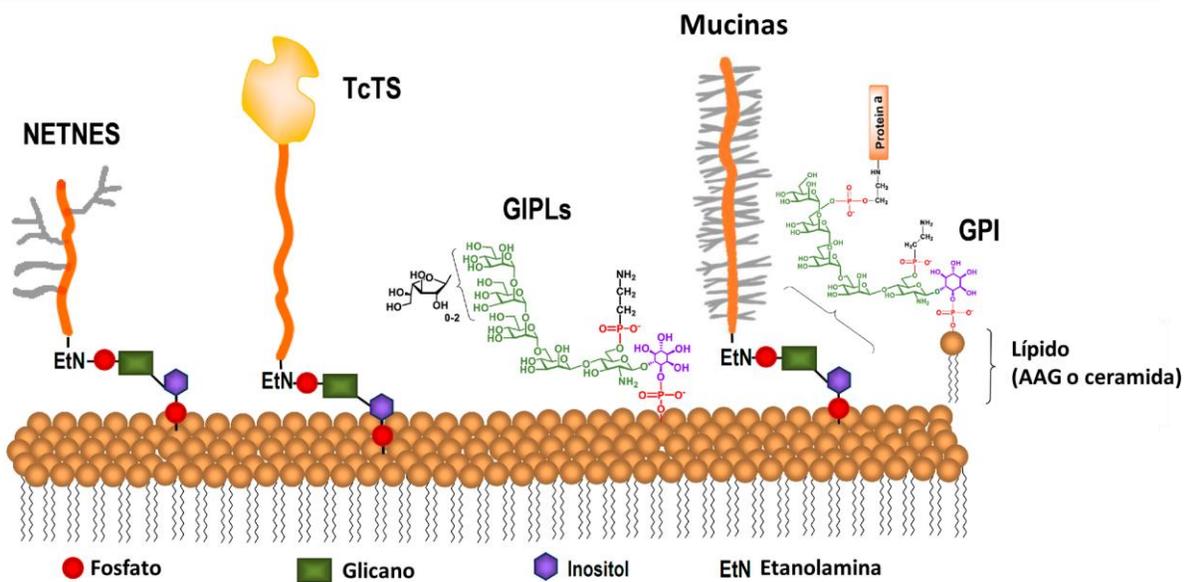


Figura 3. Glicoconjugados representativos en la superficie de *T. cruzi* epimastigotas. EtN: Etanolamina, AAG: Alquilacilglicerol, NETNES: glicoproteína de tripanosomátidos de secuencia AQENETNESGSID, GPI: Glicofosfatidilinositol, GIPL: Glicoinositolfosfolípido. TcTS: Trans-sialidasas. Modificado de <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/17/3913/htm>

Varios trabajos han sido publicados sobre el estudio de estas mucinas de superficie y se les han dado nombres diferentes, siendo descritas por primera vez en 1975 por Alvez y Colli, los cuales las llamaron glicoproteínas A, B y C en epimastigotas ²⁶. Además, describieron un glicoconjugado con un peso molecular relativo mayor por SDS-PAGE que llamaron banda D, que fue caracterizado luego como lipofosfopéptidoglicano (LPPG), y que actualmente se conoce como glicoinositolfosfolípido (GIPL). El

GIPL tiene funciones biológicas bien caracterizadas en epimastigotas, como la adhesión al intestino del vector, donde los residuos de β -galactosilfuranosa cumplen un rol clave ²⁷. Más tarde, estas glicoproteínas tipo mucina fueron descritas en epimastigotas como glicoconjugados sialilados de 43 kDa bajo el nombre de GP24, GP31 y GP37. Un modelo de parásitos deficientes en UDP-glucosa 4'-epimerasa (TcGALE^{+/-}) permitió demostrar que la presencia de galactosa es fundamental para la supervivencia y morfología de *T. cruzi*, ya que los epimastigotas deficientes en esta proteína presentaron un flagelo acortado y aspecto redondeado de tipo “nuez”, además de una reducción en la expresión de mucinas y GPIL ²⁸.

En el estadio infectivo de tripomastigota metacíclico estas glicoproteínas fueron inicialmente reportadas como antígenos de 35/50 kDa, resistentes a las proteasas e involucradas en los procesos de adhesión e invasión celular del huésped. En este caso es de gran importancia la tolerancia a la digestión en el sistema digestivo del insecto, característica asociada con su resistencia a las proteasas ²⁹. La misma familia de glicoproteínas fue identificada más tarde como antígenos reconocidos por anticuerpos anti- α -galactósidos.³⁰ Sin embargo, no se ha investigado en profundidad si el estadio amastigota intracelular de *T. cruzi* expresa mucinas glicosiladas en su superficie.

Una característica de las mucinas de los tripomastigotas de *T. cruzi* es que son los mayores aceptores de ácido siálico de las transialidasas de superficie. El ácido siálico del hospedero se transfiere a *O*-glicanos y la sialilación de la superficie del parásito ocurre en todos los estadios de su desarrollo ³¹, menos en la forma amastigota, que no tiene actividad transialidasa. La adquisición de ácido siálico es importante para la infectividad del parásito y para su supervivencia dentro del huésped vertebrado ³².

La estructura primaria de los *O*-glicanos de las mucinas de *T. cruzi* ha sido estudiada tanto en epimastigotas como en tripomastigotas metacíclicos de diferentes cepas. La estructura más relevante en la glicosilación de estas proteínas son los residuos de Ser/Thr que tienen unida a un glicano que comienza con de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) en lugar de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), que es lo que caracteriza a las mucinas de vertebrados ³³. Otra característica inusual es que en algunas cepas alrededor del 20% del total de *O*-GlcNAc no está elongada, mientras que el resto puede ser modificado con 1 a 5 residuos de galactosa, dependiendo de la cepa. La mayoría de estos residuos de galactosa se presentan como β -galactopiranosas unidas de forma lineal y ramificada en las posiciones 4 y 6 de la GlcNAc. En algunas cepas residuos de β -galactofuranosa se pueden unir a la posición 4 de la GlcNAc. Aunque la mayoría de estos residuos de β -galactopiranosas son potentes aceptores de ácido siálico, se

piensa que algunos de ellos no pueden ser sialilados por impedimento estérico debido a la hidratación

34.

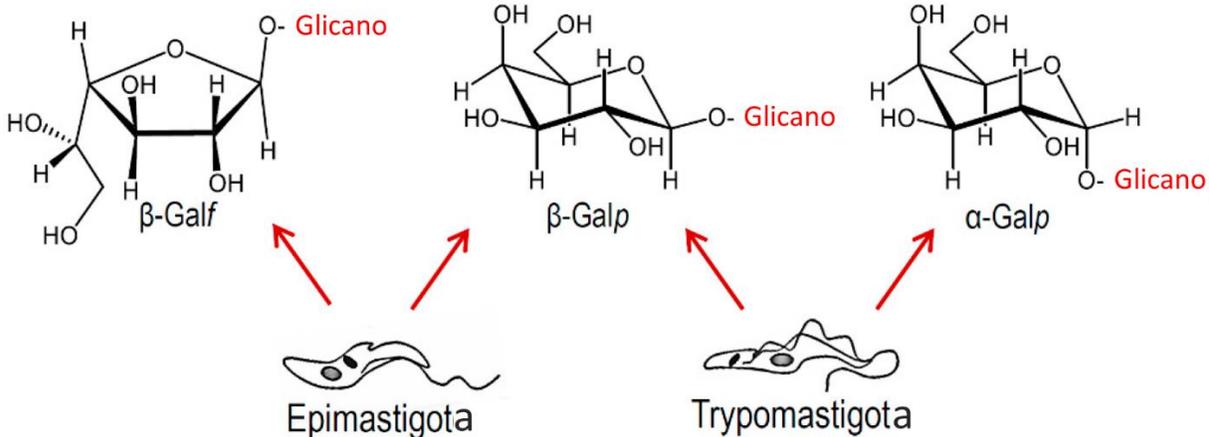


Figura 4. Configuraciones de galactosa (Gal) encontradas en mucinas de *T. cruzi*. Se muestra las estructuras de α y β galactofuranosa o piranosa de los estadios parasitarios epimastigota y tripomastigota. Modificado de <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/17/3913/htm>

Las mucinas de los tripomastigotas no parecen contener residuos de *O*-GlcNAc cortos, sino que presentan estructuras de oligosacáridos más complejas que también contienen ácido siálico terminal. Una diferencia fundamental entre los *O*-glicanos de las mucinas de tripomastigota y epimastigota es que en los primeros puede haber α -galactosilos en el extremo no reductor³⁵. La estructura mayoritaria que contiene a estos residuos es Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc. Estos oligosacáridos α -galactosilados son altamente inmunogénicos en humanos en las condiciones naturales de la infección y, de hecho, representan el mayor blanco antigénico de los anticuerpos que se generan en la enfermedad de Chagas tanto aguda como crónica^{36,37}. Otras glicoproteínas de superficie menos abundantes en *T. cruzi* en el mismo estadio también contienen α -galactosilos presentes en *N*-glicanos³⁸.

Las mucinas de *T. cruzi* están ancladas a GPI, y su porción lipídica varía según el estadio (Figura 3). En epimastigotas hay especies de alquilacil-PI mientras que en metacíclicos predominan las inositol-fosfoceramidas. Estas diferencias sutiles afectan la capacidad de las mucinas tripomastigotas de inducir secreción de citoquinas proinflamatorias y óxido nítrico (NO) por macrófagos murinos estimulados con

IFN- γ . De todas formas, la mayoría de estas mucinas están “enmascaradas” durante la invasión del huésped ²⁵.

La estructura de los glicanos también varía según el estadio. Se ha visto que en epimastigotas y en metacíclicos el *core* (o núcleo) del glicano está compuesto por estructuras lineales de Man α 1-2Man α 1-2Man α 1-6Man α 1-4GlcN. En contraste, aquellos presentes en tripomastigotas pueden ser más elongados, conteniendo hasta 8 residuos de Galactosa consecutivos ³⁹.

Parte 2 – SISTEMA INMUNE INNATO

2.a – RECEPTORES Y CÉLULAS DE LA INMUNIDAD INNATA

La inmunidad innata es el componente evolutivamente más antiguo del sistema inmunológico, compuesto por barreras (piel y mucosas), componentes solubles (complemento, citoquinas, péptidos anti-microbianos) y células (macrófagos, células dendríticas, NK, granulocitos y linfocitos innatos). El sistema inmune innato (SII) lleva este nombre porque proporciona protección contra patógenos sin la necesidad de una previa activación o contacto con los mismos ⁴⁰. Por lo tanto, el SII es la primera línea de defensa en respuesta a las señales no propias y de peligro producidas por la invasión de patógenos o la lesión tisular o celular. Muchas son las células que participan en la respuesta inmune innata y no sólo se trata de células inmunes profesionales, sino también de células no inmunes, como por ejemplo, las células epiteliales ⁴¹.

Mientras que algunos leucocitos innatos tienen la tarea de localizar patógenos en todo el cuerpo y destruirlos por diversos medios, otras células inmunes innatas, como las células dendríticas, tienen otra función más compleja. Una vez que una célula dendrítica ha internalizado o engullido al patógeno o moléculas derivadas de éste, migrará hacia un sitio linfóide con el objetivo de activar la inmunidad adaptativa a través de su interacción con linfocitos T (Figura 5) ⁴¹.

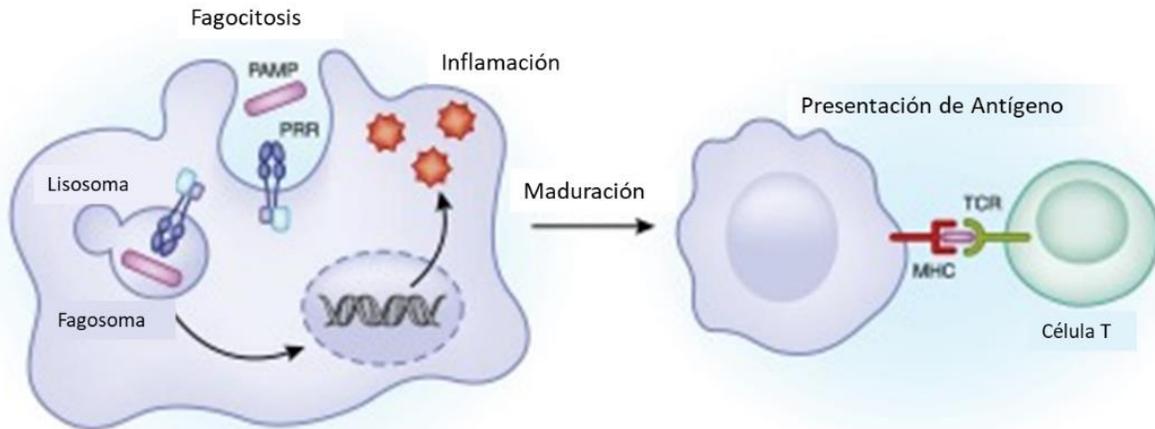


Figura 5. Vínculo entre la inmunidad innata y adaptativa. A la izquierda, una célula presentadora de antígenos (APC) reconoce un PAMP a través de sus PRRs. Posteriormente fagocita al patógeno o moléculas producidas por éste, liberando luego moléculas pro-inflamatorias y madurando. A la derecha, la APC madura presenta péptidos provenientes del patógeno asociados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de tipo II en su superficie. Este complejo péptido-MHCII es reconocido por un linfocito T, que iniciará una respuesta inmune adaptativa. Modificado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4527020/>.

A diferencia de los linfocitos T y B, los leucocitos innatos reaccionan rápidamente. Los macrófagos (M ϕ) son células fagocíticas capaces de internalizar y destruir microorganismos invasores. A diferencia de los neutrófilos, que son mayoritarios en la sangre y poseen vida corta, los macrófagos están presentes en todos los tejidos del organismo y presentan una vida media relativamente larga. Los macrófagos también son bien conocidos por inducir inflamación, ya que producen citoquinas y quimioquinas que atraen a otras células inmunes al sitio de la infección y las activan ⁴¹.

Por otro lado, las células dendríticas (DCs) también son capaces de internalizar y destruir microbios invasores mediante fagocitosis; sin embargo, su función es desencadenar una respuesta inmune adaptativa, ya que son las únicas capaces de activar e inducir la diferenciación de los linfocitos T vírgenes ⁴². Tanto las DCs como los macrófagos son células presentadoras de antígeno profesionales (APCs) debido a su capacidad eficiente de internalizar patógenos y presentarlos bajo forma de péptidos asociados a moléculas de MHCII para que sean reconocidos por los receptores de la células T (TCR) (Figura 5) ⁴³.

2.b – RECEPTORES DE TIPO TOLL (TLRs)

Varios tipos de células, particularmente las de la inmunidad innata, incluyendo M ϕ y DCs, expresan receptores de tipo *Toll* (TLRs). Estos receptores conforman el grupo de “receptores de reconocimiento de patrones” moleculares presentes en patógenos (PRRs), que, a través de su señalización, activan determinados mecanismos moleculares asociados a la inmunidad innata. Los TLRs son proteínas transmembrana de tipo I con ectodominios que contienen repeticiones ricas en leucina, que median en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) derivados de patógenos y patrones moleculares asociados a daños (DAMPs) derivados de células muertas o lesionadas. Los TLRs, además, poseen dominios transmembrana e intracelulares de Toll-interleucina-1 (IL-1) (TIR) además de dominios repetidos ricos en leucina, y algunas moléculas adaptadoras se unen a ellos para activar las vías de señalización intracelulares (Figura 6) ^{44,45}.

Varios organismos expresan TLRs, especialmente mamíferos, y se han reportado 13 tipos de ellos. Los TLR1 al 9 se conservan tanto en el ratón como en el ser humano. Sin embargo, en ratones, una inserción retroviral ha hecho que la molécula TLR-10 no sea funcional. Los TLR-11, -12 y -13 no están presentes en humanos. Los TLRs se localizan en diferentes lugares dentro de la célula. Los TLR-1, 2, 4, 5, 6 y 10 se expresan en la superficie celular, mientras que los TLR-3, 7, 8, 9, 11, 12 y 13 se expresan en las membranas endosomales (Figura 6) ⁴⁶. Los TLRs ubicados en la superficie celular reconocen principalmente componentes derivados de patógenos presentes en su membrana, como lípidos, lipoproteínas y proteínas. Por ejemplo, el TLR4 reconoce el lipopolisacárido (LPS) derivado de las bacterias Gram-negativas, las proteínas de la envoltura de los virus sincitiales, los fosfolípidos de glicoinositol de tripanosomas y las proteínas de choque térmico 60 y 70 ^{47,48}.

Una vez que los PAMPs o DAMPs se unen a su TLR correspondiente, se reclutan moléculas adaptadoras, como MyD88 (Proteína 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide), TRIF (Proteína adaptadora que contiene dominio TIR que induce interferón- β [IFN- β]), TIRAP (Proteína adaptadora que contiene el dominio TIR), o TRAM (molécula adaptadora que contiene el dominio TIR). Las vías de señalización activadas producen citoquinas inflamatorias, interferones (IFNs), quimioquinas y una variedad de proteínas inducibles ⁴⁹.

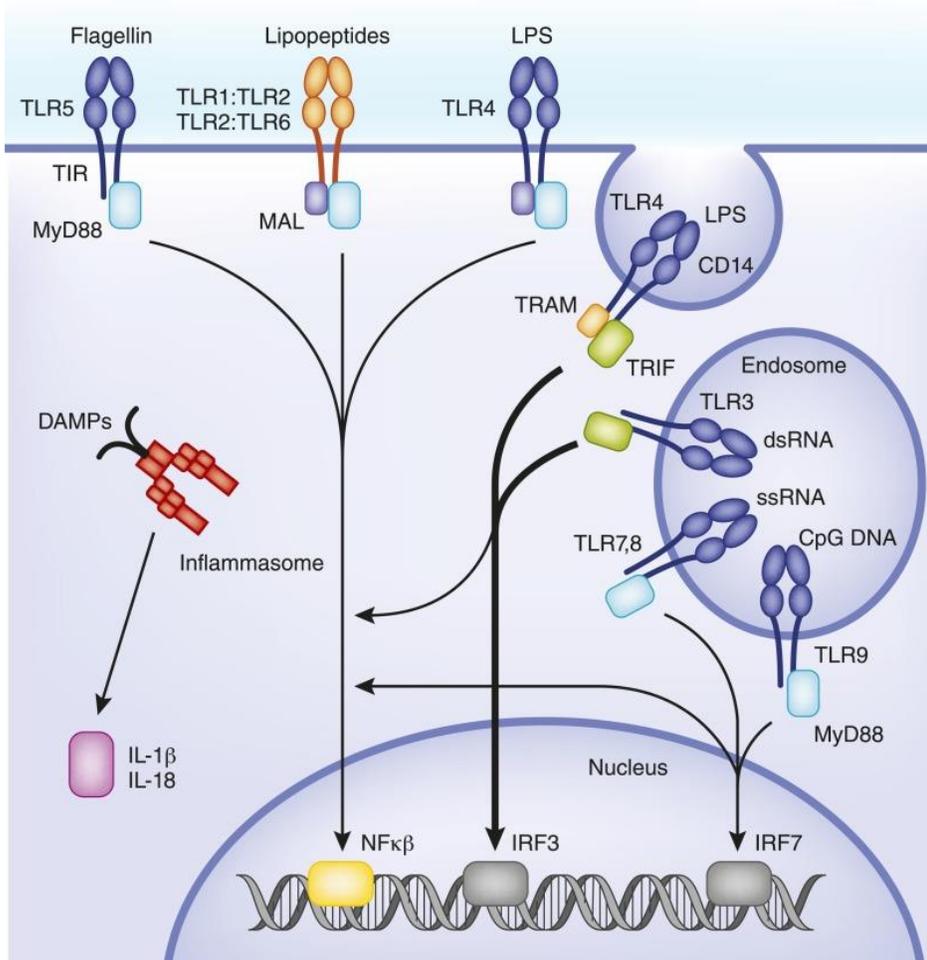


Figura 6. Diversidad de receptores de tipo Toll. Se esquematiza la ubicación membranaria de los TLRs en la membrana celular o en endosomas, junto con sus agonistas activadores clásicos. Una vez que los TLRs reconocen a su PAMP o DAMP, la cascada de señalización lleva a la activación de los factores de transcripción NF-κβ, IRF3 o IRF7. Extraído de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25414319/#&gid=article-figures&pid=figure-1-uid-0>

2.c – VÍNCULO ENTRE LA INMUNIDAD INNATA Y ADAPTATIVA

Para muestrear su entorno en tejidos periféricos, las DCs tienen actividad constitutiva de macropinocitosis del líquido extracelular; también expresan varios receptores diferentes que median la endocitosis y fagocitosis de antígenos y patógenos⁵⁰. Captan antígenos, generan complejos MHC-péptido, migran desde los sitios de adquisición de antígenos a órganos linfoides secundarios y, finalmente, interactúan físicamente con los linfocitos T y los activan (Figura 5), para así generar una respuesta de ataque o de tolerancia (dependiendo de la naturaleza del antígeno). De hecho, como ya se mencionó, las DCs son las únicas células presentadoras de antígenos que inducen la activación de las

células T vírgenes, tanto *in vitro* como *in vivo* ⁵⁰. Por otro lado, las DCs son particularmente eficientes para la presentación cruzada, es decir presentar péptidos derivados de patógenos extracelulares en el contexto del MHCI y activar linfocitos T CD8⁺. Varios grupos han propuesto que la ruta de internalización de antígenos es crítica para la carga de péptidos en moléculas de MHC de clase I ⁵⁰.

Los Mφ cumplen un amplio espectro de funciones debido a la heterogeneidad y plasticidad que poseen. Son células altamente especializadas en detectar el microambiente y modificar sus propiedades en consecuencia. Los fenotipos de macrófagos pueden simplificarse en dos extremos: un perfil proinflamatorio (M1) y un perfil antiinflamatorio/pro-resolutivo (M2). Según esta definición, los macrófagos M1 pueden iniciar y mantener respuestas inflamatorias, secretando citoquinas proinflamatorias, activando células endoteliales e induciendo el reclutamiento de otras células inmunitarias al tejido inflamado; por otro lado, los macrófagos M2 promueven la resolución de la inflamación, fagocitan las células apoptóticas, impulsan la deposición de colágeno, mantienen la integridad del tejido y liberan mediadores antiinflamatorios. Cambios dramáticos en el metabolismo celular acompañan a estos cambios fenotípicos y funcionales de los macrófagos. En particular, los macrófagos M1 dependen principalmente de la glucólisis y presentan dos interrupciones en el ciclo de Krebs que resultan en la acumulación de itaconato (un compuesto microbicida) y succinato. La polarización de los Mφ es reversible, ya que son lo suficientemente plásticos para integrar múltiples señales, como las provenientes de microorganismos, tejidos dañados y del entorno tisular normal. Tres factores controlan la polarización: los mecanismos epigenéticos y de supervivencia celular que prolongan o acortan el desarrollo y la viabilidad de los Mφ, el microambiente tisular y factores extrínsecos, como los productos microbianos y las citoquinas liberadas en la inflamación ⁵¹.

2.d – RESPUESTA INNATA INDUCIDA POR *T. CRUZI*

En el control de la infección por *T. cruzi*, las células inmunitarias innatas juegan un papel importante en la supresión de la replicación del parásito y de la propagación por los tejidos del huésped durante las fases agudas de la infección. Se favorece la inducción de mediadores proinflamatorios como interleuquina-12 (IL-12), factor de necrosis tumoral (TNF)-α y óxido nítrico (NO) a través de la activación de receptores innatos ⁵². En las respuestas inmunes a patógenos intracelulares, la IL-12 es un mediador clave para la producción de IFN-γ, que induce la generación de células T cooperadoras de tipo 1 (T_H1) y la activación de las células NK ⁵³. El IFN-γ juega un papel crucial en la activación de Mφ y favorece la

producción de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno, así como la expresión de hidrolasas en el fagolisosoma, que permiten eliminar patógenos intracelulares. De hecho el NO es citotóxico o citostático para microorganismos intracelulares ⁵⁴. En los Mφ, el IFN-γ induce la expresión de la NO sintasa inducible (iNOS). Durante la infección con *T. cruzi*, estas moléculas actúan conjuntamente para iniciar una respuesta inmune capaz de controlar la replicación del parásito. De hecho, se ha demostrado una alta susceptibilidad a la infección por *T. cruzi* en ratones deficientes en IFN-γ, iNOS e IL-12 ⁵⁵⁻⁵⁷.

Entre los miembros de la familia de los TLRs, el TLR2 fue el primer receptor reportado en intervenir en la respuesta inmune innata inducida por *T. cruzi*. Las glicoproteínas ancladas a GPI tipo mucinas, distribuidas en la superficie celular de la membrana de los tripomastigotas de *T. cruzi* inducen la síntesis de citoquinas proinflamatorias y NO en células inmunes innatas ^{58,59}. Todos los eucariotas poseen GPI, pero algunos parásitos incluyendo *T. cruzi*, *Plasmodium falciparum*, *Leishmania major* y *Toxoplasma gondii*, expresan 10¹⁰⁰ veces más GPI que células de mamífero. Además, el GPI de estos parásitos es estructuralmente diferente al de las células huésped, como ya se mencionó. La inducción de respuestas proinflamatorias por los GPI de *T. cruzi* se atribuye a la interacción con ácidos grasos insaturados parasitarios presentes en el GPI ^{60,61}.

Además de los anclajes de GPI, la proteína Tc52 excretada por *T. cruzi*, ha sido identificada como un potente inductor de la activación del TLR2 en células inmunes innatas, tanto de humanos como de ratones [19]. La Tc52 derivada de *T. cruzi* induce la expresión de moléculas coestimuladoras y la producción de citoquinas y quimioquinas junto con la activación de NF-κB en las DCs durante su maduración en modelos murinos de tipo salvaje, pero no en ratones TLR2^{-/-}. Por lo tanto, el TLR2 activa respuestas proinflamatorias y de defensa innata del huésped a través del reconocimiento de moléculas derivadas de *T. cruzi* ⁶².

Aunque estudios previos indican que TLR4 no está involucrado en el reconocimiento de los anclajes de GPI ⁶⁰, se ha demostrado que los glicoinositolfosfolípidos (GIPL), que son un subconjunto de anclajes a GPI de la etapa epimastigota de *T. cruzi* (Figura 3), activan las vías de señalización a través de CD14 y TLR4 ⁶³. En ratones mutantes para TLR4, la producción de quimioquinas y la quimiotaxis de neutrófilos inducidas por GIPL se redujeron drásticamente en comparación con los ratones control. Estos hallazgos sugieren la participación del TLR4 en el reconocimiento de anclajes GPI derivados de *T. cruzi*. Sin embargo, ratones TLR4^{-/-} mostraron resistencia normal a la infección por *T. cruzi* ⁶⁴, por lo que no sería el único mediador de la inmunidad innata.

Otro TLR relacionado con el reconocimiento de *T. cruzi* es el TLR9, que reconoce regiones CpG del genoma del parásito. En efecto, macrófagos derivados de ratones TLR9^{-/-} no producen niveles normales de TNF- α , IL-6, IL-12p40 y NO en respuesta al ADN genómico de *Trypanosoma brucei*, un tripanosomátido relacionado con *T. cruzi*^{65,66}.

Además, se han dilucidado mecanismos independientes de TLRs asociados a las respuestas inmunes innatas contra *T. cruzi*. Se ha demostrado que NOD1, que reconoce microorganismos en el citoplasma de las células, , participa en las respuestas inmunitarias innatas contra *T. cruzi*⁶⁷. Se ha descrito un nuevo sistema de interacción independiente de TLRs entre el parásito y el huésped , el cual es mediado por Ca²⁺⁶⁸. Por tanto, la inmunidad innata contra *T. cruzi* depende de interacciones complejas entre diversas moléculas.

Finalmente, se ha identificado que los CLRs (Receptores de Lectina tipo C) también participan en el reconocimiento de *T. cruzi* por parte del sistema inmune innato. En un modelo murino mMGL^{-/-} (que solo expresa MGL en M ϕ y DCs), los ratones infectados por *T. cruzi* desarrollaron una mayor parasitemia y mayores tasas de mortalidad en comparación con los ratones salvajes. Además, estos investigadores vieron que mMGL es necesario para la activación óptima de los M ϕ y puede sinergizar con las vías inducidas por el TLR-4 para producir TNF- α , IL-1 β y NO durante la fase temprana de la infección⁶⁹.

Parte 3 – RELACIÓN CÁNCER-PARÁSITOS

3.a – PROPIEDADES ANTITUMORALES DE MOLÉCULAS PARASITARIAS

Se han reportado estudios epidemiológicos que señalan una correlación entre diversas infecciones parasitarias y una menor incidencia de cáncer en humanos. Un ejemplo fue reportado en pacientes con quiste hidático, que presentan una prevalencia de cáncer significativamente menor que pacientes sanos⁷⁰. Asimismo, la supervivencia de pacientes adultos con leucemia de células T que además estaban infectados con *Strongyloide stercoralis* es significativamente más larga que en pacientes no infectados⁷¹.

Por otra parte, se ha observado una incidencia menor de cáncer de colon en pacientes con megacolon chagásico⁷², sugiriendo la existencia de una protección contra el cáncer de colon en personas con enfermedad de Chagas. El desarrollo de megacolon chagásico durante la fase crónica de la

infección por *T. cruzi*, se asocia con un influjo aumentado de células T citotóxicas en los ganglios linfáticos entéricos y pérdida de la innervación muscular ⁷³. En línea con estas observaciones, las infecciones por parásitos, incluyendo *T. cruzi*, *Toxoplasma gondii* ^{74,75} y *Plasmodium yoelii* ⁷⁶, han conferido resistencia al crecimiento del tumor en varios modelos animales.

Se ha demostrado que esta actividad anti-tumoral de los parásitos está mediada, al menos en parte, por la activación de la respuesta inmune. En un modelo animal murino se observó que las inyecciones intratumorales de una cepa viva atenuada de *T. gondii* evocó fuertes respuestas inmunes antitumorales *in vivo*, lo que promovió la regresión de tumores de melanoma B16-F10 primarios establecidos en los ratones ⁷⁷. Por otro lado, el tratamiento con este parásito en el contexto del crecimiento de tumores de ovario con características inmunosupresoras, restauró la capacidad de células presentadoras de antígeno CD11c⁺ para desencadenar una potente respuesta antitumoral de células T CD8⁺ ⁷⁸. Por otra parte, también se encontró que la infección con el parásito causante de la malaria suprime el crecimiento del cáncer de pulmón Lewis, a través de la inducción de respuestas antitumorales innatas y adaptativas específicas, caracterizadas por una mayor producción de citoquinas de tipo T_H1 ⁷⁹.

Roskin y Exemplarskaia fueron los primeros en reportar que *T. cruzi* es capaz de inhibir el crecimiento de células tumorales. Sin embargo, a pesar de los avances considerables sobre los efectos antineoplásicos de *T. cruzi*, los mecanismos subyacentes a la inhibición del crecimiento del tumor son poco conocidos ⁸⁰⁻⁸³. Se ha discutido la posibilidad de que los efectos antitumorales de *T. cruzi* se deban a la liberación de una sustancia tóxica por parte del parásito ⁸⁴. A su vez, los efectos antitumorales podrían estar asociados a la actividad pro-apoptótica de componentes de *T. cruzi* ⁸⁵. En efecto, se ha observado que una proteína recombinante equivalente a la molécula de superficie gp82 de *T. cruzi*, induce específicamente muerte apoptótica de células de melanoma sin alterar a los melanocitos normales ⁸⁶. Por otro lado, la calreticulina de *T. cruzi* (TcCRT) tiene propiedades anti-angiogénicas ⁸⁷, que pueden explicar los efectos antitumorales *in vivo* de TcCRT en el modelo de tumor mamario murino TA3 resistente al metatrexate ⁸⁸. También se ha propuesto que la respuesta inmune desencadenada por *T. cruzi* puede ser efectiva contra células tumorales ⁸². Esta hipótesis se sustenta por la observación de que el crecimiento de adenocarcinomas de Ehrlich es inhibido significativamente en ratones inyectados con esplenocitos de animales inmunizados con lisados de *T. cruzi* ⁸⁹. La inhibición del crecimiento tumoral por las células inmunocompetentes transferidas pasivamente sugiere que *T. cruzi* y las células del

adenocarcinoma de Ehrlich podrían mostrar epítomos comunes. De hecho, los autores confirmaron la presencia de algunos antígenos de superficie comunes.

Por último, los antígenos carbohidratos que se expresan en parásitos cumplen funciones fundamentales como, por ejemplo, participar en la evasión de la respuesta inmune ⁹⁰, inhibir la proliferación de células T ⁹¹ y promover respuestas autoinmunes.⁹²

3.b – ANTECEDENTES DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN.

Nuestro grupo de investigación ha demostrado la presencia de antígenos de *O*-glicosilación incompleta específicos de cáncer en parásitos helmintos, lo cual es interesante dado la lejanía entre parásitos y mamíferos desde un punto de vista taxonómico y evolutivo. Este aspecto se ha propuesto como posible herramienta para inducir una respuesta inmune que contrarreste los mecanismos de inmunotolerancia tumoral.

En los últimos años, nuestro equipo de investigación comprobó que la inmunización con péptidos derivados de mucinas del parásito helminto *Echinococcus granulosus*, pueden inducir una potente actividad antitumoral *in vivo*, debido a un incremento en la frecuencia de células NK activadas y a la inducción de esplenocitos con capacidad de mediar la muerte de las células tumorales ⁹³. Además, se observó que la inoculación con antígenos de *E. granulosus* provenientes de líquido hidático humano inhibe significativamente el crecimiento del cáncer de colon (tanto en modelos profilácticos como terapéuticos) a través de la inducción de una inmunidad antitumoral ⁹⁴. En estos modelos, los ratones inmunizados con líquido hidático desarrollaron anticuerpos específicos contra las células tumorales ⁹⁴. Esto es consistente con el hecho de que los parásitos y las células cancerosas podrían expresar antígenos en común ⁹⁵.

En este contexto, nuestro grupo identificó diversos antígenos de *O*-glicosilación incompleta asociados a cáncer como Tn, sTn y Tk en *E. granulosus* ⁹⁶, *Fasciola hepática* ⁹⁷, así como en otros helmintos ^{98,99}.

Respecto a *T. cruzi*, nuestro grupo ha obtenido en los últimos años datos que indican que la inmunización con lisados de epimastigotas de *T. cruzi* atenúa la carcinogénesis de colon en un modelo murino inducido por dimetilhidrazina (DMH), en comparación con animales no infectados¹⁰⁰. Un hecho

similar ha sido reportado en otras oportunidades, con la diferencia de que en este modelo los ratones estaban infectados ⁷⁴. Esta observación genera varias preguntas con respecto a los mecanismos que inducen una actividad antitumoral mediada por este parásito *in vivo*. Nuestro grupo de investigación también reportó la capacidad de reacción cruzada de anticuerpos específicos contra *T. cruzi* y células tumorales. De hecho, en una serie de 123 tumores humanos, estos anticuerpos reconocieron el 68% de las muestras de cáncer de colon y 60% de los tumores de cáncer de mama, mientras que no se encontró en la tinción de los tejidos normales ¹⁰¹. En relación a la respuesta inmunitaria provocada por lisados de *T. cruzi*, se encontró que induce la activación de células T CD8⁺ y CD4⁺ específicas y una mayor toxicidad por parte de los esplenocitos ¹⁰¹. En particular, nuestro grupo de investigación ha encontrado que los carbohidratos presentes en un lisado de epimastigota proveniente de la cepa Dm28c de *T. cruzi*, son esenciales en la inducción de una inmunidad protectora (Figura 7).

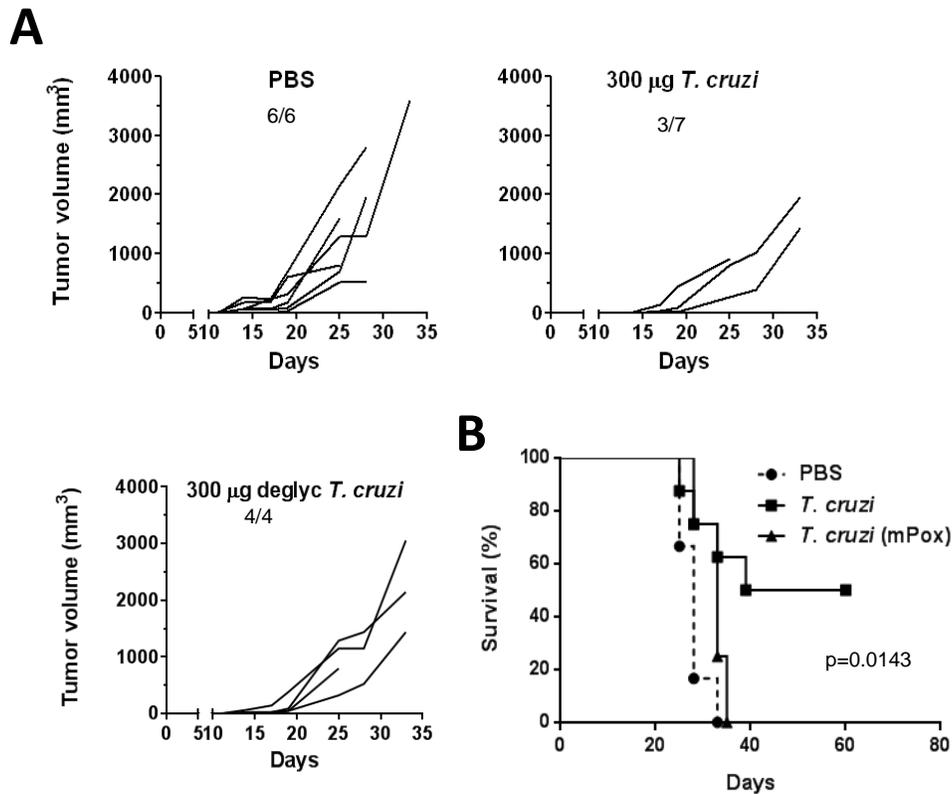


Figura 7. Los glicoconjugados presentes en el lisado de epimastigota de la cepa Dm28c de *T. cruzi* median la protección tumoral. (A) Se inocularon ratones C57BL/6 (n=4-7) tres veces en intervalos de dos semanas con lisado parasitario (300 µg), lisado de *T. cruzi* oxidado con m-periodato (mPox-*T. cruzi*) o PBS (control) en hidróxido de aluminio antes de la inyección subcutánea de células tumorales de pulmón LL/2 (100,000 células/ratón). El crecimiento tumoral se midió regularmente utilizando un calibre. (B) Sobrevida de los ratones inoculados o controles durante un período de 80 días luego de la inyección de las células tumorales. Resultados no publicados.

Por otro lado, la resistencia del huésped a la infección por *T. cruzi* depende tanto de los linfocitos T CD8⁺ como de una respuesta T CD4⁺ mediada por Th1, que se caracteriza por una fuerte producción de IL-12 e IFN- γ ¹⁰². Esto podría explicarse por la activación de los TLRs presentes en las DCs que son estimulados por agonistas producidos por *T. cruzi*¹⁰³, induciendo así la producción de grandes cantidades de IL-12 y la diferenciación de las células T_H1 productoras de IFN γ . Las células T_H1 a su vez, mejoran la inmunidad antitumoral a través de la activación de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos, células NK y M ϕ . En el mismo sentido, nuestro grupo de investigación ha encontrado que la muerte de células tumorales en el modelo de carcinogénesis colónica anteriormente mencionado se asoció con un aumento del número de células CD11b/c⁺, His48⁻, MHCII⁺, que representan células presentadoras de antígeno, como los M ϕ o DCs. Un aumento en las DCs en el bazo de los animales inmunizados con *T. cruzi* podría contribuir a la activación y diferenciación de células T CD4⁺ y T CD8⁺, y por ende, a la muerte de las células tumorales. Por su parte, se han descrito DCs asesinas secretoras de IFN γ capaces de inducir citólisis de células tumorales¹⁰⁴. Además, los M ϕ son capaces de matar a las células tumorales por apoptosis, en un proceso que requiere la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la secreción de proteasas de serina¹⁰⁵.

En otro modelo propuesto por nuestro grupo de investigación, se comprobó el potencial antitumoral de vacunas formuladas a partir de un extracto de epimastigotas de *T. cruzi* de la cepa Dm28c en un modelo de cáncer de mama con enfermedad diseminada de relevancia clínica utilizando las células tumorales murinas 4T1¹⁰⁶. Además, en este trabajo también se evidenció la presencia de antígenos de reacción cruzada entre el parásito y células tumorales de la línea 4T1, a partir del reconocimiento de estructuras antigénicas tumorales por parte de anticuerpos anti-*T. cruzi*¹⁰¹.

Todas estas evidencias demuestran que los lisados parasitarios de epimastigotas de *T. cruzi*, en particular de la cepa Dm28c, inducen inmunidad profiláctica o terapéutica que permite el desencadenamiento de una respuesta inmune que retrasa el crecimiento tumoral. Por otro lado, los carbohidratos presentes en el lisado parasitario, parecerían ser claves en la inducción de la inmunidad anti-tumoral protectora (Figura 7).

Parte 4 – GLICOSIDASAS COMO HERRAMIENTAS PARA EL ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS

4.a – ESTUDIO DE LAS ESTRUCTURAS DE GLICOCONJUGADOS

En el contexto de esta tesis resulta interesante la elucidación estructural de los glicoconjugados parasitarios, al igual que estudiar su función biológica. Esto nos permitirá comprender el rol que desempeñan los carbohidratos en el proceso de reconocimiento por parte del sistema inmune del hospedero, al igual que en el desarrollo de la enfermedad.

La caracterización estructural de los glicanos constituye un proceso complejo, ya que, a diferencia de los oligonucleótidos y proteínas, las cadenas de glicanos raramente se expresan como polímeros lineales. Los poli y oligosacáridos están compuestos por combinaciones de monosacáridos con distintas configuraciones anoméricas (α o β) que pueden formar diversos enlaces glicosídicos, incluyendo ramificaciones en distintos puntos de la cadena oligosacáridica ^{107,108}. Por lo cual, la elucidación completa de una secuencia oligosacáridica requiere de una combinación de métodos químicos, físicos y fisicoquímicos que aporten información que contribuya a una elucidación completa ^{109–112}. Dentro de las técnicas más usadas para la elucidación estructural de los glicanos se encuentran la identificación de sitios de glicosilación, análisis de glicanos por microarrays de lectinas, cromatografía gaseosa, espectrometría de masa o cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa, enriquecimiento de glicoproteínas por cromatografía de afinidad, digestión enzimática de glicanos utilizando glicosidasas, entre otras ^{111,113–115}. Sin embargo, el estudio del rol de los glicanos en los procesos biológicos resulta más complejo ya que la enorme mayoría de las herramientas disponibles implican la destrucción del esqueleto proteico de las glicoproteínas, no permitiendo la evaluación de cambios en su funcionalidad generados por la remoción total o parcial de sus glicanos.

En este aspecto, las endo y exoglicosidasas constituyen una excelente herramienta ya que permiten la remoción selectiva de glicanos sin alterar la estructura tridimensional de las glicoproteínas, lo que permite que las moléculas deglicosiladas puedan ser evaluadas en procesos biológicos de forma de determinar la relevancia del glicano o monosacárido removido en el mismo ^{116–118}. A su vez, el uso de las glicosidasas inmovilizadas permite su fácil separación del medio de reacción evitando el uso de condiciones drásticas para detener la reacción enzimática y la interferencia de la glicosidasa en los estudios biológicos posteriores sin necesidad de incluir pasos de purificación para separar la glicosidasa

del medio de reacción. A su vez la inmovilización de las enzimas permite su reuso, lo cual es clave dado el elevado costo de las mismas.¹¹⁹

4.b – INMOVILIZACIÓN

Las propiedades de una enzima inmovilizada están dadas por las propiedades de la primera junto con las del soporte y la química de inmovilización seleccionada. Por lo cual, estos aspectos deben ser cuidadosamente seleccionados en función del proceso en el cuál va a ser utilizada la enzima inmovilizada.

Estrategias de inmovilización

Se define a una enzima inmovilizada como aquella que se encuentra restringida en una región definida del espacio, conservando su actividad catalítica. El uso de enzimas inmovilizadas ofrece ventajas como un aumento de su estabilidad, la posibilidad de re-utilizarlas y su fácil separación del medio de reacción ¹²⁰. Esto último es relevante para su aplicación en procesos de deglicosilación ya que evita procedimientos tediosos de purificación para separar la glicosidasa del medio de reacción de forma que no interfiera en estudios biológicos posteriores. A su vez, permite detener la reacción enzimática sin necesidad de utilizar condiciones drásticas como aumento de la temperatura o variaciones de pH, que podrían afectar la estructura de las glicoproteínas a ser deglicosiladas. Sin embargo, hay muy pocos reportes en la literatura en relación al uso de glicosidasas inmovilizadas aplicadas a la identificación de la naturaleza de los carbohidratos en las glicoproteínas ^{121,122}, el cual es uno de los objetivos de este trabajo y de nuestro equipo de investigación.

Los métodos utilizados para la inmovilización de proteínas pueden clasificarse en dos grandes grupos: reversibles e irreversibles (Figura 8). Los métodos reversibles permiten la elución de la enzima una vez que la actividad decae, por lo que el soporte puede reutilizarse. La inmovilización reversible se da generalmente bajo condiciones suaves ^{120,123}. El método más sencillo es la adsorción, que se basa en interacciones no covalentes superficiales y reversibles entre la enzima y el soporte (como puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, electroestáticas o interacciones hidrofóbicas). Si bien estas fuerzas de enlace se consideran débiles, cuando existen en gran cantidad es posible una unión efectiva. Otro de los métodos de inmovilización reversible es a través de los puentes disulfuro. Aunque se forma un

enlace covalente entre la enzima y el soporte, este puede ser escindido por un agente reductor [121], [125], [126].

Por otra parte, los métodos de inmovilización irreversibles se clasifican en covalentes, entrecruzamiento y entrapamiento o inclusión^{120,123}. La inmovilización por unión covalente al soporte es la que se utiliza mayormente y su principal ventaja es que no tiene lugar la liberación de enzima al medio de reacción. El enlace covalente se forma entre los grupos funcionales presentes en la superficie del soporte y residuos aminoacídicos expuestos en la superficie de la proteína. Es importante que los grupos involucrados en dicha unión no lo estén en la actividad catalítica, ya que en este caso se da una pérdida de actividad^{120,123}.

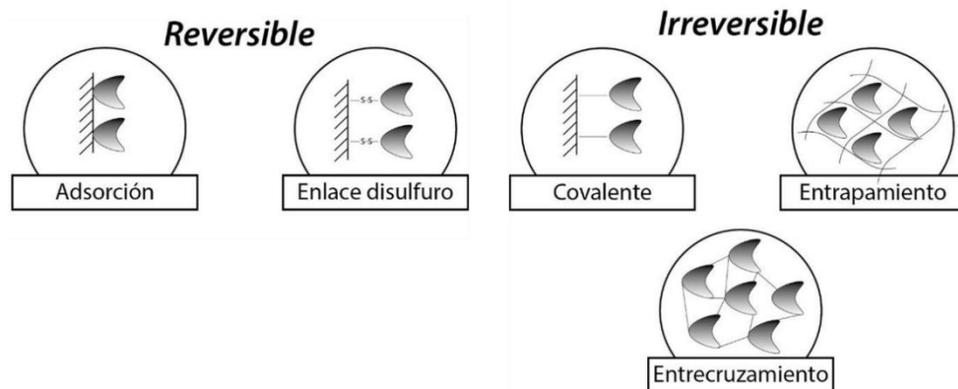


Figura 8. Clasificación de métodos de inmovilización enzimática. Se esquematiza la unión de la enzima al soporte para cada caso.

Otro método de inmovilización irreversible de proteínas es por entrecruzamiento. Este método se basa en la formación de enlaces covalentes entre enzimas, o en el caso del co-entrecruzamiento, con proteínas inertes como gelatina o albumina sérica bovina por medio de un reactivo bifuncional como el glutaraldehído. Como resultado se obtiene un agregado proteico insoluble de alto peso molecular¹²³.

Por otra parte, en la inmovilización por entrapamiento las moléculas de enzimas se encuentran libres pero restringidas por una red polimérica del gel. Se trata de un método no covalente, en el que los poros del gel se encuentran controlados, de manera que no haya pérdida enzimática y pueda haber una circulación libre entre sustrato y producto. Este método tiene la ventaja de que las condiciones de inmovilización no afectan la actividad enzimática^{120,123}.

En esta tesis se realizó la inmovilización de glicosidasas utilizando el agente cianilante ciano-4-dimetil amino-piridinio tetrafluoro borato (CDAP-BF₄), método en el cual nuestro grupo de investigación tiene amplia experiencia ^{116–118,126}. Mediante una reacción de cianilación se genera la activación de los grupos hidroxilos presentes en un soporte de tipo polisacárido, con el reactivo CDAP-BF₄. Este paso genera estructuras mayoritariamente del tipo cianato ésteres. Estos grupos activados reaccionan a continuación con los grupos amino de las proteínas, dando como productos principales derivados de tipo isourea (Figura 9). Este procedimiento es una modificación de la técnica original de activación descrita para el bromuro de cianógeno (CNBr) ¹²⁷, pero en este caso se utiliza un reactivo mucho más estable y seguro de manipular en ambientes de laboratorio en comparación con el CNBr, por lo que se considera una alternativa menos riesgosa para el usuario.

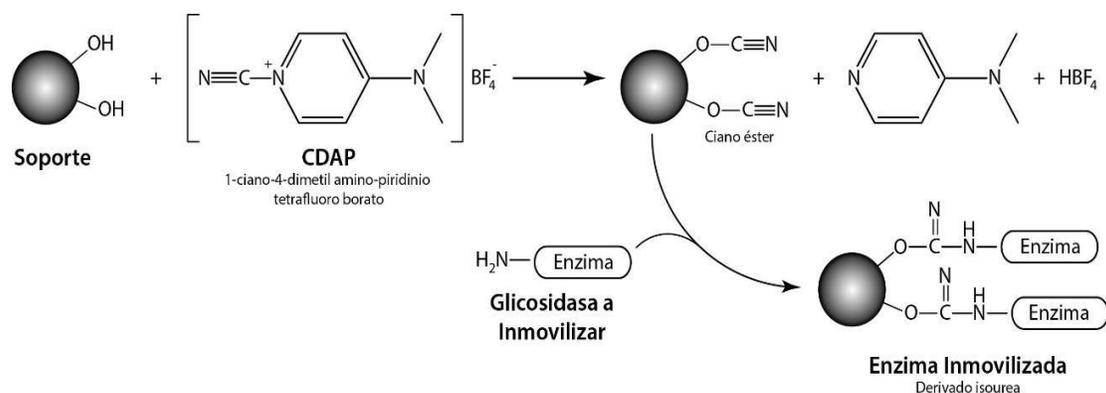


Figura 9. Mecanismo de activación de la agarosa por el método CDAP para inmovilización de proteínas. El proceso de inmovilización consta de dos pasos: la activación del soporte y la inmovilización de las enzimas. La activación de los soportes se realizó mediante la utilización del agente cianilante CDAP, el cual forma grupos ciano éster en los grupos hidroxilos presentes tanto en agarosa como en las nanopartículas. Posteriormente, se llevó a cabo la inmovilización de la enzima, mediante incubación de la misma con el soporte activado, conduciendo a la formación de un derivado isourea entre los grupos amino libres de las enzimas y los grupos ciano éster formados en el paso anterior

Soportes para inmovilización

Las características del soporte son esenciales para determinar la efectividad del sistema de enzimas inmovilizadas. El soporte ideal debería ser hidrofílico, inerte, compatible con la enzima, fácil de funcionalizar, resistente al ataque microbiano, estable, accesible y de bajo costo. Los soportes se pueden clasificar en orgánicos e inorgánicos de acuerdo a su composición química y pueden ser subdivididos en naturales y sintéticos. Se han utilizado una gran variedad de soportes para la inmovilización. Dentro de los soportes orgánicos naturales más utilizados se encuentra la agarosa y dentro de los inorgánicos sintéticos se encuentra la sílica ^{123,128}.

Cuando la glicosidasa inmovilizada va a ser utilizada para la hidrólisis de sustratos macromoleculares como es el caso de las glicoproteínas (lo que realizamos en esta tesis), se deben tener en cuenta los problemas difusionales que dificultan el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima. Los soportes porosos permiten una mayor carga enzimática, pero pueden presentar limitaciones difusionales para los sustratos ^{129,130}. Las nanopartículas resultan una alternativa interesante ya que se caracterizan por su tamaño reducido, lo que sugiere que el comportamiento de la enzima inmovilizada puede asemejarse al de la enzima soluble. Además, en caso de ser magnéticas se facilita su separación posterior por el uso de una gradilla imantada. En caso de no ser magnéticas, una simple centrifugación genera una separación eficiente del medio de reacción. Las nanopartículas presentan una relación superficie/volumen alta que aumenta la capacidad de carga y reduce las limitaciones difusionales. Sin embargo, las nanopartículas carecen de las ventajas de los soportes porosos como la agarosa, que ofrecen un efecto protector en la interfase con el medio externo. Sin embargo, si se tiene en cuenta que este efecto tiene lugar cuando la enzima se inmoviliza dentro del poro del soporte esto puede llegar a ser una desventaja cuando se trabaja con sustratos macromoleculares ya que se puede dificultar el acceso del mismo al sitio activo de la enzima ^{118,130,131}.

En base a nuestra experiencia en el trabajo con glicosidasas inmovilizadas se seleccionaron distintos soportes según las características de cada enzima. A continuación se detallan algunas características de los soportes utilizados.

Agarosa

La agarosa es un polímero macroporoso natural formado por residuos de galactosas unidas por enlace β 1-4 y anhidro 3,6 galactosa unida por enlaces α 1-3 que se encuentra entrecruzado. Al ser polihidroxilada es fácilmente activable, es inerte y presenta una buena resistencia. La Agarosa 4B (Cytiva) presenta un tamaño de partículas de 45-165 nm con un diámetro promedio de 30 nm y un área superficial de $5\text{m}^2/\text{mL}$ ^{123,132}.

Nanopartículas de sílica magnéticas

Las nanopartículas magnéticas recubiertas de sílica pueden ser fácilmente activables y presentan ventajas respecto a las nanopartículas de sílica en que pueden ser separadas del medio de reacción por la acción de un imán ^{123,129}.

Nanopartículas de sílica

Son hidrofílicas al igual que química y físicamente estables. Las mismas pueden ser sólidas, no porosas o mesoporosa. Su estructura, tamaño de partícula, estabilidad y porosidad dependen de los parámetros de síntesis. Las mismas son fáciles de funcionalizar ya que poseen grupos silanol en su superficie (Si-OH) ^{133,134}.

4.c – GLICOSIDASAS DE INTERÉS GLICOBIOLÓGICO

Las glicosidasas se pueden clasificar en endo y exoglicosidasas. Las primeras catalizan la ruptura de enlaces glicosídicos en el interior de la cadena glicosídica, separando de raíz la cadena oligosacáridica de la estructura proteica de una glicoproteína. Las exoglicosidasas hidrolizan el enlace glicosídico de residuos terminales, permitiendo la liberación secuencial y específica de los distintos residuos que componen la cadena oligosacáridica de una glicoproteína ¹³⁵. A continuación, se presentan las glicosidasas utilizadas en este trabajo:

β -Galactosidasa

Esta enzima se encuentra en plantas, microorganismos y animales, y es de gran interés para la industria alimenticia. La β -galactosidasa cataliza la hidrólisis de residuos de galactosa unidos por enlaces β -1,4 en general unidos a *N*-acetil glucosamina o glucosa, por lo cual es útil para la hidrólisis de residuos terminales de galactosa presentes en *N*-glicanos híbridos o complejos, al igual que en *O*-glicanos. En esta tesis se utilizó la β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*, que tiene un peso molecular de 105 kDa y un pH óptimo en el entorno de 5,5. En relación a la estabilidad de la enzima, se ha reportado que en el intervalo de pH de 4,0 a 9,0 es estable. La actividad de β -Galactosidasa es inhibida por varios metales, entre ellos cobre y plata ¹³⁶⁻¹³⁹.

α -Manosidasa

Las α - manosidasas se encuentran en semillas de plantas y tejidos de animales. Son específicas para la hidrólisis de unidades de α -manosa terminales y se pueden clasificar en Clase I y II. Las de clase I se encuentran distribuidas en los grupos GH38, GH47y GH92 de las glicósido-hidrolasas (GHs) de la base de datos CAZy (Carbohydrate Active Enzymes). Presentan un mecanismo catalítico que invierten la configuración en el carbono anomérico, son específicas para la ruptura de enlaces α 1-2 y son inhibidas por kifunesina y 1-deoxymanojirimicina. Por otro lado, las α -manosidasas de Clase II en su mayoría pertenecen al grupo GH38 de las GHs y presentan un mecanismo catalítico que mantiene la configuración del centro anomérico. Poseen un amplio rango de capacidad catalítica hidrolizando enlaces α 1-2, 1-3 y 1-6 y son inhibidas por swainsonina ^{138,140-144}. La α -manosidasa de *Bacteroides thetaiotaomicron* fue la enzima utilizada en el presente trabajo. Tiene un peso molecular de 87 kDa e hidroliza unidades de manosa terminales unidas por enlaces α -(1-3), α - (1-4) y α - (1-6). Su pH óptimo se encuentra entre 6,5 y 6,9 y su temperatura óptima es de 40°C. La misma es estable en un rango de pH de 6 - 9 y a temperaturas inferiores a 50°C. Su actividad es dependiente de Ca^{+2} ^{145,146}.

α -Fucosidasa

Las α -fucosidasas son enzimas que catalizan la liberación de L-fucosa unida por enlaces α -1-2, 1-3, 1-4 y 1-6 y pertenecen a las familias 29 y 95 de las GHs. Las que pertenecen a la familia GH95 son específicas para la hidrólisis de residuos de fucosa terminal unidas por enlace α 1-2 y su mecanismo de catálisis invierte la configuración del centro anomérico. Por otro lado, las α -fucosidasas clasificadas en la familia GH29 presentan un mecanismo de catálisis que mantiene la configuración del carbono anomérico¹⁴⁷⁻¹⁴⁹.

La α -L-fucosidasa de *Homo sapiens* es una enzima lisosomal responsable de hidrolizar fucosa α -(1-2,3,4,6) unida por su extremo reductor a una *N*-acetilglucosamina de los carbohidratos de las glicoproteínas. Tiene un peso molecular de 52 kDa, su pH óptimo se encuentra en el rango de 4,0 – 4,4 y su temperatura óptima es de 50°C. La misma es estable en un rango de pH de 4 -9 y a temperaturas inferiores a 50°C¹⁵⁰.

Neuraminidasa

Las neuraminidasas se utilizan para escindir el ácido *N*-acetilneuramínico terminal (ácido siálico) de una variedad de glicoproteínas. La enzima de *Clostridium perfringens* es una proteína monomérica de 71 kDa cuyo pH óptimo se encuentra en un rango de 5 – 5,5 y su temperatura óptima en un rango de 51-55 °C. Es específica para la liberación de residuos de ácido siálico terminales que están unidos en α -(2,3)- α -(2,6)- o α -(2,8) a Gal, GlcNac, GalNAc, AcNeu, GlcNeu, oligosacáridos, glicolípidos o glicoproteínas, aunque escinde los residuos de ácido siálico con enlaces α -(2-3) de forma más eficaz^{151,152}.

PNGasa F

La Péptido: *N*-glicosidasa F (PNGasa F) de *Elithabethkingia miricola* funciona escindiendo el enlace entre el residuo de GlcNac de *N*-glicanos y una asparagina presentes en glicoproteínas. Esto da como resultado una proteína desaminada y un glicano libre. Tiene un peso molecular de 36kDa y un pH

óptimo de 8,6. Es estable en un rango de pH de 7,5 – 9,5 y es estable a 4°C por lo menos durante 6 meses. La misma es compatible con una gran variedad de buffers orgánicos e inorgánicos ^{153–155}.

4.d – LECTINAS COMO REPORTEROS DE DEGLICOSILACIÓN

Las lectinas son un grupo heterogéneo de proteínas que se caracterizan por su capacidad de unirse con gran especificidad a diferentes carbohidratos o glicoconjugados ^{156,157}. Estas macromoléculas logran precipitar glicoconjugados, actúan como aglutinadoras de eritrocitos por excelencia y tienen un rol preponderante en el reconocimiento e interacción célula-célula. Las lectinas son ampliamente utilizadas en investigación debido a su capacidad de reconocer diferentes composiciones y estructuras de azúcares, por lo que comprenden herramientas muy útiles para el estudio de glicoproteínas ¹⁵⁸.

La lectina Concavalina A (ConA) de *Canavalia ensiformis* fue la primera aglutinina en ser aislada en el año 1919. El investigador James B. Sumner que observó que ConA era capaz de aglutinar glóbulos rojos de conejo y también que tenía la capacidad de unirse a almidón, mucinas y glucógeno, pero la interacción podía ser evitada por la sacarosa. ¹⁵⁹

Actualmente se conocen muchas lectinas, provenientes fundamentalmente de plantas que son muy utilizadas para el reconocimiento de estructuras glicosídicas. En nuestro caso particular constituyen una buena herramienta para seguir procesos de deglicosilación ya que nos permiten evaluar cambios en el reconocimiento de una lectina por una glicoproteína o mezcla de glicoproteínas como consecuencia de la remoción enzimática de un glicano en particular.

Abajo se describen brevemente las especificidades de las utilizadas en esta tesis ^{159–162}.

Concavalina A (ConA): presenta afinidad por los monosacáridos glucosa y manosa y *N*-glicanos con alto contenido de manosa.

***Narcissus pseudonarcissus* Agglutinin (NPA):** presenta afinidad por residuos de α -Manosa.

***Arachis hypogaea* (PNA):** Es específica para el reconocimiento de motivos carbohidratos Gal- β (1-3)-GalNAc.

***Lectin from Erythrina cristagalli* (ECA):** Presenta afinidad por galactosa, particularmente en el motivo Gal- β (1-4)-GlcNAc.

***Bandeiraea simplicifolia* (BS1-B4):** presenta una afinidad por residuos de α -D-galactosa terminales, así como una afinidad secundaria por los residuos de *N*-acetil- α -D-galactosamina terminales.

***Helix pomatia* (HPA):** Es específica para el reconocimiento de residuos de *N*-acetilgalactosamina terminales.

***Vicia Villosa* Lectin (VVA):** Específica para el reconocimiento Tn (un único residuo de α -*N*-acetilgalactosamina unido a serina o treonina en un polipéptido), con afinidad secundaria por GalNAc unida tanto en α como en β .

***Sambucus Nigra* Lectin (SNA):** Reconoce preferentemente al ácido siálico unido a la galactosa terminal en α -2,6.

***Maackia Amurensis* Lectin II (MAL II):** Reconoce ácido siálico en un enlace (α -2,3).

***Lotus tetragonolobus* lectin (LTA):** reconoce específicamente oligosacáridos que contienen α -L-fucosas.

***Ulex europaeus* (UEA I):** Reconoce fuertemente residuos de fucosa con enlaces α -(1,2), pero el reconocimiento es muy bajo cuando la fucosa se encuentra unida por enlaces α - (1,3) o α - (1,6).

Soybean agglutinin (SBA): Esta lectina se une preferentemente a estructuras de oligosacáridos con *N*-acetilgalactosamina unida a α o β terminales y, en menor grado, a residuos de galactosa.

***Wheat germ* Agglutinin (WGA):** Es específica para el reconocimiento de motivos carbohidratos de GlcNAc. Por otra parte, se ha reportado que también reconoce motivos de ácido siálico

HIPÓTESIS

Teniendo en cuenta los mecanismos inmunoevasores de *T. cruzi*, la evidencia de protección tumoral luego de realizar inoculaciones con lisado total de este parásito, así como la pérdida de la misma por oxidación de los carbohidratos presentes en este lisado, la hipótesis de este trabajo es que los glicoconjugados de este parásito son reconocidos por la inmunidad innata, particularmente por receptores TLRs, y que la inducción de su señalización es, al menos en parte, dependiente de la presencia de carbohidratos.

OBJETIVO GENERAL

Considerando la hipótesis anterior, el objetivo general de este trabajo es determinar la activación de un repertorio de TLRs por parte de lisados totales de *T. cruzi*, caracterizar a los glicoconjugados allí presentes y estudiar si dicha activación es dependiente de la presencia de carbohidratos específicos a través del uso de glicosidasas inmovilizadas generadas durante el transcurso de esta tesis.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

El objetivo general de esta tesis de Maestría puede desglosarse en los siguientes objetivos específicos:

- 1- Estudiar el reconocimiento por TLRs de lisado parasitarios provenientes de diferentes cepas de *T. cruzi*.
- 2- Estudiar los motivos carbohidratos presentes en los lisados de diferentes cepas.
- 3- Deglicosilar de forma selectiva lisados parasitarios mediante el uso de glicosidasas inmovilizadas.
- 4- Determinar del papel de los carbohidratos parasitarios en el reconocimiento por TLRs.
- 5- Analizar el reconocimiento por TLRs de mucinas ancladas a GPI purificadas a partir de lisados de *T. cruzi*.

MATERIALES Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DE LISADOS PARASITARIOS

Cultivo de parásitos *Trypanosoma cruzi* en estadio Epimastigota

Para este trabajo se utilizaron epimastigotas provenientes de las cepas de *T. cruzi* Dm28c, SylvioX10, Esmeraldo CL3, AR-SE23C (Arse) y TcvT-1. Los parásitos epimastigotas se cultivaron a 28°C en medio hepático con triptosa (LIT) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, (previamente descomplementado por una hora a 50°C), Hemina 25 ng/mL (Sigma), Penicilina 10 Unidades/mL y Streptomycin 10 µg/mL (Gibco). Se realizaron cambios de medio cada 3 días, manteniendo los cultivos en fase exponencial, entre 70 y 90 millones de parásitos/mL. El conteo de los parásitos se realizó en cámara de Neubauer.

Lisados parasitarios de epimastigotas desnaturalizados (epi-TC-DOC)

Partiendo de cultivos de aproximadamente 1×10^9 parásitos totales, se realizaron dos lavados con Buffer Fosfato Salino (PBS) compuesto por Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1,8 mM, NaCl 137 mM y KCl 2,7 mM, con posterior centrifugación a 2000 g. Luego, se resuspendió el pellet de parásitos en 7 mL de buffer DOC (Ácido Desoxicólico 1%, Glicina 0,15 M pH 9.0 y NaCl 0,5 M). Se agitaron durante 60 minutos en rueda giratoria a temperatura ambiente, luego por 30 minutos a 37°C y por último 30 minutos a 4°C. Transcurrido este tiempo se centrifugó el lisado a 20.000 g por 60 minutos y se conservó el sobrenadante. Finalmente, se agregó inhibidor de proteasas (Sigma) compuesto de aprotinina, bestatina, leupeptina, E-64 y pepstatina A, sin quelantes metálicos. Se alicuotaron fracciones de 1 mL y se almacenaron a -80°C.

Lisados parasitarios de epimastigotas nativos (epi-TC-Nativos)

Partiendo de cultivos de aproximadamente 4×10^9 parásitos totales, se realizaron dos lavados con PBS, con posterior centrifugación a 2000 g. Luego, se resuspendió el pellet de parásitos en 700 µL de buffer de lisis (Hepes 50 mM pH 7,4 conteniendo ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM, Ditiotreitól (DTT) 1 mM e inhibidor de proteasas (Sigma) pH 7,4) y se transfirió a viales. A continuación,

se realizaron 3 ciclos de congelado/descongelado por inmersión en nitrógeno líquido, sumergiendo directamente los viales en este y luego en baño de agua a 37°C. Posteriormente, se volvió a centrifugar y se conservó el sobrenadante. Finalmente, se realizó una diálisis contra PBS utilizando una membrana de *cutoff* de 3,5 kDa (Thermo).

Diálisis del Lisado epi-TC -DOC

Con el objetivo de eliminar el detergente DOC del lisado epi-TC antes de deglicosilarlo con los derivados enzimáticos (detallado más adelante en esta sección), se realizaron diversas diálisis utilizando diferentes buffers dependiendo de los requerimientos de la glicosidasa que se utilizaría posteriormente. Este paso fue importante para mantener la integridad de las glicosidasas y favorecer las condiciones de pH óptimo de cada enzima. En todos los casos se utilizó una membrana de diálisis de 3,5 KDa (Thermo) y 500 mL del buffer seleccionado con agitación a 4°C durante 24 horas. Para retirar completamente el DOC del lisado, se realizaron 3 cambios de buffer.

ANÁLISIS DE LOS LISADOS PARASITARIOS

Cuantificación de proteínas

El contenido proteico del material utilizado fue evaluado por dos métodos de cuantificación diferentes:

- **Método del Ácido Bicinconínico (BCA)**

En una placa de 96 pocillos se mezclaron 10 µL de muestra y 10 µL de diluciones seriadas del estándar utilizado Albúmina sérica bovina (BSA) en el rango de 0,1 – 1 mg/mL) con 200 µL de BCA:CuSO₄ (50:1) y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Se midió la absorbancia a 570 nm y se graficó en función de la concentración de estándar. La ecuación de la recta derivada de la porción lineal de la curva del estándar fue utilizada para determinar la concentración de las muestras.

- **Absorbancia λ_{280}**

Alternativamente, el contenido proteico de los lisados parasitarios fue cuantificado midiendo su absorbancia a 280 nm utilizando un Nanodrop (NanoDrop 1000, Thermo). Los valores de

absorbancia se traducen a concentración en función de una curva de calibración interna del equipo, usando como base la ley de Beer. Para muestras que consisten en mezclas de proteínas se requiere de una estimación del ϵ . La mayoría de los coeficientes de extinción de proteínas ($\epsilon_{1\%}$) oscilan entre 4.0 a 24.0. El promedio para una mezcla de muchas proteínas diferentes probablemente es aproximadamente 10, por lo que se asume un $\epsilon_{1\%} = 10$.

Ensayos ELLA (Enzyme-Linked Lectin assay)

Este ensayo consiste en una adaptación del enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) indirecto, donde las moléculas responsables del reconocimiento antigénico son lectinas conjugadas a Estreptavidina que reconocen diferentes motivos carbohidratos (Tabla 1), en lugar de un anticuerpo.

En primer lugar, se sensibilizó una placa de ELISA con 1 μg /pocillo de lisado epi-TC diluido en buffer Carbonato 0,1 M pH 9,6 (100 μl / pocillo, incubación a 4°C durante toda la noche). Al día siguiente, se realizaron dos lavados con PBS-Tween 0,1% (solución de lavado) y se bloqueó con 200 μL /pocillo de una solución de gelatina 1% en PBS durante dos horas a 37°C. Transcurrido este tiempo, se realizaron 3 lavados y se realizó una incubación con 100 μL /pocillo de las diferentes lectinas biotinizadas detalladas en la Tabla 1 (provenientes de Sigma y Vector) en una solución de Gelatina 0,5% y Tween 0,1% en PBS (PTG), durante una hora a 37°C. Cada una de las lectinas fue utilizada a concentraciones optimizadas experimentalmente entre 0,1 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para obtener una señal detectable evitando la saturación en el revelado. Luego se realizaron dos lavados y una incubación a 37°C durante una hora con Estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (HRP, BD Biosciences) diluida en PTG, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Por último, se procedió al revelado con una solución de o-Fenilendiamina (OPD) (Sigma) 0,5 mg/mL en buffer Citrato 20 mM Fosfato 50 mM pH 5,0 y H_2O_2 0,12%. Para ello, se agregaron 200 μL de esta solución en cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad entre 1 y 15 minutos, tiempo necesario para que se desarrolle el complejo coloreado sin llegar a la saturación. Luego se agregaron 50 μL /pocillo de H_2SO_4 12% para detener la reacción y estabilizar el complejo. Finalmente, se midió la absorbancia a 492 nm en un lector de placas (Multiskan GO, ThermoFisher). Se graficó la absorbancia de cada muestra, tomando como señal basal un control sin lectina.

Tabla 1. Lectinas utilizadas en este trabajo.

<i>Nombre completo</i>	<i>Abreviación</i>	<i>Especificidad</i>
Concavalina A	ConA	α -Man > α -Glc
<i>Narcissus pseudonarcissus</i> Lectin	NPA	α -Man
<i>Ulex europaeus</i> I Lectin	Ulex	α -Fuc
<i>Lotus Tetragonolobus</i> Lectin	LTA	α -Fuc
<i>Arachis hypogaea</i> Lectin	PNA	Gal- β (1-3)-GalNAc > Gal- β (1-3)-GlcNAc > Gal- β (1-4)-GlcNAc
<i>Erythrina Cristagalli</i> Lectin	ECA	Gal- β (1-4)-GlcNAc > Lac > GalNAc > Gal
<i>Bandeiraea simplicifolia</i> Lectin	BS1-B4	α -Gal > α -GalNAc
<i>Helix pomatia</i> Agglutinin	HPA	α y β -GalNAc
Soybean Agglutinin	SBA	α o β -GalNAc > Tn
<i>Sambucus Nigra</i> Lectin	SNA	Neu5Ac- α (2-6)Gal > NeuAc- α (2-6)GalNAc, Lac
<i>Maackia Amurensis</i> Lectin II	MAL-II	Neu5Ac- α (2-3)Gal
<i>Vicia Villosa</i> Lectin	VVA	Tn , α -GalNAc > β -GalNAc
Wheat germ Agglutinin	WGA	GlcNac- β (1,4)GlcNac β (1,4)GlcNac > GlcNac β (1,4)GlcNac > GlcNac

Electroforesis SDS – PAGE

Las proteínas de los lisados parasitarios fueron separadas en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y reductoras, sembrando 10 μ g/carril en buffer de muestra (buffer Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 conteniendo 2,5% SDS, 0,002 % azul de bromofenol, 0,7135 M (5%) β -mercaptoetanol, 10 % glicerol). La tinción de los geles se realizó con Coomasie Brilliant Blue G-250 2 μ g/mL durante una hora y se destiñeron con solución *Destain* compuesta por MeOH:CH₃COOH:H₂O (4,5:1:4,5), hasta visualizar claramente el patrón de bandas.

Tinción de Glicoproteínas

Las proteínas de los lisados parasitarios fueron separadas por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12%, sembrando 10 µg/carril en buffer de muestra. Posteriormente los geles fueron teñidos utilizando el kit GlicoPro (Sigma) siguiendo las indicaciones del fabricante. Este sistema se basa en el método del Ácido Peryódico-Schiff (PAS) y está diseñado para la tinción selectiva de glicoproteínas, que adquieren un color fucsia fuerte. Con este procedimiento ocurre la tinción de los grupos diol vecinales que se encuentran principalmente en azúcares periféricos y ácidos siálicos, seguido de la formación de bases de schiff con fuccina que posteriormente son reducidas dando lugar a una coloración fucsia fuerte, por lo cual evidencia la presencia de glicoconjugados en general.

Lectin Blot

Las proteínas de los lisados parasitarios fueron separadas por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12%, sembrando 10 µg/carril en buffer de muestra. Luego fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham) a 95 mA durante 1 hora por transferencia semi-seca (TE 70 PWR, Amersham Biosciences) en buffer Tris-HCl 20 mM pH 8,3 conteniendo Glicina 200 mM y Etanol 10%.

Las membranas se bloquearon durante toda la noche a 4°C con BSA 5% en PBS. Luego se hicieron 3 lavados con PBS / Tween 0.1% durante 10 minutos. Posteriormente fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente en presencia o ausencia (control) de la lectina ConA 0,4 µg/mL en PBS con BSA 1% + Tween 0,1% con agitación suave. Posteriormente, se realizaron 5 lavados con PBS-Tween 0,2% durante 10 minutos con agitación fuerte y se incubaron con Estreptavidina conjugada a HRP diluida en PBS siguiendo las recomendaciones del fabricante. Finalmente se lavaron 3 veces con PBS-Tween 0,2 % durante 10 minutos. El revelado se realizó mediante quimioluminiscencia utilizando el kit ECL Western Blot Substrate (Pierce) y el equipo de Imaging ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare).

ENZIMAS INMOVILIZADAS

Medida de Actividad Enzimática

PNGasa F

Para la medida de actividad de PNGasa F se utilizó como sustrato la enzima Ribonucleasa B (RNasa B), que contiene un único glicano con alto contenido de manosa, y se cuantificó la desaparición del mismo como se describe a continuación.

En primer lugar, se desnaturalizó la RNasa B, con el objetivo de exponer el glicano favoreciendo su acceso al sitio activo de la PNGasa F, lo que facilita la reacción de deglicosilación. Se partió de 240 μL de RNasa B 4,17 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en buffer Tris-HCl 20 mM pH 7,5 suplementado con NaCl 50 mM y EDTA 5 mM (buffer de actividad de PNGasa F), a la cual se agregaron 20 μL de SDS 5% y 20 μL de DTT 1 M. Se hirvió la mezcla en baño de agua durante 5 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 40 μL de Tritón X100 al 10% y 40 μL de buffer fosfato de sodio 0,5 M pH 7,5.

Se incubaron 324 μL de RNasa B desnaturalizada con 36 μL de una dilución adecuada de PNGasa F soluble o 50 μL de suspensión estándar de la PNGasa inmovilizada en buffer de actividad de PNGasa a 37 °C con agitación suave. Cada 10 minutos se tomaron alícuotas de 40 μL , se le agregaron 20 μL de buffer de muestra de electroforesis SDS-PAGE y se calentó a 100°C durante 5 minutos en baño de agua. Para el control o blanco del ensayo, a 36 μL de esta de RNasa desnaturalizada se le adicionaron 4 μL de agua y 20 μL de buffer de muestra de electroforesis SDS-PAGE y se calentó durante 5 minutos en baño de agua a 100°C.

La suspensión estándar de PNGasa inmovilizada se preparó resuspendiendo un peso conocido de la misma, que en este caso correspondió a todo el derivado inmovilizado, en 1 mL de buffer de actividad.

Las muestras de RNasa B deglicosiladas fueron analizadas por SDS-PAGE, donde la RNasa B glicosilada migra aproximadamente hacia los 17 kDa y la RNasa B deglicosilada migra con un peso molecular aparente de 15 kDa¹¹⁷. Se utilizaron geles de poliacrilamida al 15% y se tiñó con Coomassie Brilliant Blue G-250. Los geles fueron escaneados y analizados utilizando el software Image J, y se

cuantificó la densidad óptica de las bandas correspondiente a la RNasa B en las alícuotas tomadas a diferentes tiempos.

Se definió una unidad de enzima (UE) como cantidad de PNGasa F capaz de catalizar la deglicosilación de 1 nanomol de RNasa B desnaturalizada por minuto a 37 °C y pH 7,5. La actividad enzimática fue expresada como UE/mL para la enzima soluble y UE/g de soporte para la inmovilizada.

Para calcular la cantidad de nanomoles de RNasa B a cada tiempo, se tomó como referencia la densidad óptica de la banda correspondiente al blanco del ensayo (nanomoles de RNasa B iniciales).

La cantidad de nanomoles iniciales de RNasa B en cada gel se calculó según la fórmula:

$$\text{Nanomoles de RNasa iniciales} = \frac{\text{Vol RNasa } (\mu\text{L}) \times [\text{RNasa}] (\mu\text{g}/\mu\text{L}) \times 2 \times \text{Vol sembrado electroforesis } (\mu\text{L})}{\text{PM RNasa B } (\mu\text{g}/\text{nanomol}) \times \text{Vol del ensayo } (\mu\text{L}) \times 3}$$

Siendo Vol RNasa: volumen de RNasa agregado al ensayo, [RNasa]: concentración de RNasa stock en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Vol sembrado electroforesis: Volumen de siembra del ensayo en el gel de SDS-PAGE, PM RNasa B: peso molecular de RNasa B (15 kDa lo que es equivalente a 15 $\mu\text{g}/\text{nanomol}$), Vol ensayo: Volumen final de la reacción de deglicosilación. El factor 2/3 hace referencia a la dilución del ensayo con agregado de buffer de muestra para la electroforesis.

Tomando en cuenta el cálculo de nanomoles de RNasa B inicial, se procedió a calcular los nanomoles de RNasa B remanentes a cada tiempo según:

$$\text{Nanomoles de RNasa B (t)} = \frac{\text{D.O (t = x)} \times \text{nanomolesde RNasa B iniciales}}{\text{D.O (t = 0)}}$$

Siendo D.O (t=x): densidad óptica de la banda correspondiente a RNasa B a cierto tiempo de comenzado el ensayo de actividad y D.O (t=0): densidad óptica de la banda correspondiente a RNasa B inicial (tiempo 0).

A partir de estos datos, se graficaron los nanomoles de RNasa B en función del tiempo obteniéndose los nanomoles de producto liberados por minuto. Para obtener el valor de la actividad enzimática (UE/ μL soluble o UE/ μg inmovilizada), la pendiente de la recta fue dividida entre la cantidad

de PNGasa F presente en el volumen de mezcla reactiva sembrada en la electroforesis calculada de la siguiente forma:

- *Enzima soluble*

$$\text{PNGasa } (\mu\text{L}) = \frac{\text{Vol PNGasa F en reacción } (\mu\text{L}) \times \text{Vol sembrado EF } (\mu\text{L}) \times 2}{\text{Vol de reacción} \times 3}$$

- *Enzima inmovilizada*

$$\text{PNGasa en ensayo } (\mu\text{g}) = \frac{[\text{susp. strd PNGasa inmov}] (\mu\text{g}/\mu\text{L}) \times \text{Vol susp. strd } (\mu\text{L}) \times \text{Vol sembrado EF } (\mu\text{L}) \times 2}{\text{Vol de reacción} \times 3}$$

Siendo susp. strd PNGasa inmov: suspensión estándar de PNGasa F inmovilizada, vol. susp strd: volumen de suspensión estándar agregada al ensayo, vol sembrado EF: volumen de siembra en la electroforesis del ensayo de actividad, vol de reacción: volumen final del ensayo de actividad, y vol PNGasa F en reacción: volumen de PNGasa F agregado al ensayo de actividad. El factor 2/3 hace referencia a la dilución del ensayo con agregado de amortiguador de muestra.

α -Manosidasa

Para el ensayo de actividad de la α -manosidasa se utilizó como sustrato p-nitrofenil- α -D-manopiranosido (PNPM) (Sigma). Se incubaron 70 μL de una dilución adecuada de enzima soluble o suspensión estándar de enzima inmovilizada con 630 μL de PNPM 5 mM en buffer ácido-2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) 0.1M pH 6,5 suplementado con 2,5 mM CaCl_2 (buffer de actividad de α -manosidasa) a 37°C bajo agitación en baño seco. Se tomaron alícuotas de 70 μL cada 2 minutos durante 12 minutos, y se agregaron a 130 μL de buffer borato de sodio 0,2 M pH 9,8 en microplaca, para detener la reacción enzimática. Se midió absorbancia a 405 nm en un lector de placas de ELISA. Se determinó la concentración de p-nitrofenol (PNP) utilizando una curva de calibración realizada en las mismas condiciones (a 70 μL de PNP de distintas concentraciones en buffer de actividad de α -manosidasa (0.039-1.25 mM) y se le agregaron 130 μL de buffer borato de sodio 0,2 M pH 9,8).

La suspensión estándar de α -manosidasa inmovilizada se preparó resuspendiendo 50 mg de derivado en 1 mL de buffer de actividad de α -manosidasa. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

La unidad de enzima (UE) fue definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de PNP por minuto a pH 6.5 y 37°C. La actividad enzimática fue expresada como UE/mL para la enzima soluble y UE/g de soporte para la inmovilizada.

α -Fucosidasa

Para el ensayo de actividad de la α -fucosidasa se utilizó como sustrato p-nitrofenil- α -L-fucopiranosido (PNPF) (Megazymes). Se incubaron 70 μ L de diluciones adecuadas de enzima soluble o suspensión standard de α -fucosidasa inmovilizada con 630 μ L de PNPF 2 mM en buffer acetato de sodio 0,1 M pH 4,0 (buffer de actividad de α -fucosidasa) a 37 °C bajo agitación en baño seco. Se tomaron alícuotas de 70 μ L cada 2 minutos durante 12 minutos, y se agregaron a 130 μ L de buffer borato de sodio 0,2 M pH 9,8 en microplaca, para detener la reacción enzimática. Se midió absorbancia a 405 nm en un lector de placas de ELISA. Se determinó la concentración de PNP utilizando una curva de calibración realizada en las mismas condiciones (a 70 μ L de PNP de distintas concentraciones en buffer de actividad de α -fucosidasa (0.039-1.25 mM) y se le agregaron 130 μ L de buffer borato de sodio 0,2 M pH 9,8).

La suspensión estándar de α -fucosidasa inmovilizada se preparó en PBS. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

La unidad de enzima (UE) fue definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de PNP por minuto a pH 4,0 y 37° C. La actividad enzimática fue expresada como UE/mL para la enzima soluble y UE/g de soporte para la inmovilizada.

Neuraminidasa

Para el ensayo de actividad de neuraminidasa se utilizó como sustrato 2'-(4-metilumbeliferil)- α -D-ácido *N*-acetilneuramínico (4MU-NANA) (Sigma) y se procedió de acuerdo a lo reportado previamente en Bidondo et al. 2021 ¹¹⁸.

Brevemente, 15 μ L de Neuraminidasa soluble o 45 μ L de suspensión estándar de Neuraminidasa inmovilizada fueron incubados con 11 o 33 μ L de 4MU-NANA 2 mM y 275 o 825 μ L de buffer acetato de Potasio 0.15 M pH 4.6, respectivamente a 37 °C por 30 minutos. Se retiraron alícuotas de 50 μ L cada 5 minutos y se añadieron a 450 μ L de buffer glicina-NaOH 0,2 M pH 10.6 para frenar la reacción enzimática. Se realizó una dilución 1/10 de esta solución en buffer glicina-NaOH 0,2 M pH 10,6 y se transfirió a una placa de ELISA negra de fondo plano. Se midió la fluorescencia a $\lambda=360/460$.

Una unidad de enzima (UE) se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μ mol de 4-MU-NANA por minuto a pH 4,6 y 37 °C. La actividad enzimática fue expresada como UE/mL.

B-Galactosidasa

La actividad enzimática de la β -Galactosidasa se determinó utilizando el sustrato cromogénico o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG, Sigma-Aldrich). Se incubaron 100 μ L de una dilución adecuada de la enzima soluble o suspensión standard de la enzima inmovilizada con 2 mL de ONPG 25 mM preparado en buffer acetato de sodio 50 mM pH 5,5 (buffer de actividad de β -galactosidasa) a temperatura ambiente. La velocidad de formación del producto o-nitrofenol (ONP) se midió a una longitud de onda de 405 nm, utilizando un espectrofotómetro equipado con agitación para mantener la suspensión homogénea durante la medida (Shimadzu UV 160^a). Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado. El coeficiente de extinción molar para el ONP a pH 5,5 es de $7,5 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Una unidad de enzima (UE) fue definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de ONP por minuto a temperatura ambiente y pH 5,5. La actividad enzimática fue expresada como UE/mL para la enzima soluble y UE/g de soporte para la inmovilizada.

Inmovilización de enzimas

Activación de soportes

La activación de los soportes se realizó utilizando el agente cianilante 1-ciano-4-dimetilamino piridinio tetrafluoro borato (CDAP-BF₄) de forma de introducir grupos cianato éster.

Activación de Agarosa

La activación sobre agarosa se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado previamente por Giacomini et al ¹²⁶.

Se lavaron 3 g de agarosa 4B con: 50 mL de agua destilada, 50 mL de acetona:agua (3:7) y 50 mL de acetona:agua (6:4). Se escurrió el gel haciendo vacío y se resuspendió en 2 mL de acetona:agua (6:4), manteniéndolo en baño hielo. Posteriormente, se agregaron 2 mL de CDAP 160 mM en acetona:agua (6:4) bajo agitación vigorosa durante 3 minutos. A continuación, se agregaron 240 µL de trietilamina (TEA) 0,2 M gota a gota durante un periodo de 2 a 3 minutos. Después de 3 minutos de agitación continua, se transfirió rápidamente la mezcla de reacción a un recipiente conteniendo 50 mL de HCl 50 mM enfriado a 4°C. Luego de un máximo de dos minutos el gel se lavó rápidamente en una placa filtrante con 50 mL de agua a 4°C y se utilizó en forma inmediata para la inmovilización de la enzima correspondiente. Todo el procedimiento de activación fue realizado en baño de hielo y todos los reactivos utilizados fueron pre-enfriados a 4°C. La agarosa activada se utilizó en forma inmediata para la inmovilización de las enzimas correspondientes.

En este soporte activado fueron inmovilizadas α -fucosidasa, β -Galactosidasa, Neuraminidasa y α -manosidasa.

Activación de Nanopartículas de Sílica magnéticas

La activación de nanopartículas magnéticas se llevó a cabo como fue reportado previamente por Rodríguez et al. 2018 ¹¹⁶.

La activación de nanopartículas fue optimizada en nuestro laboratorio. Todos los reactivos fueron pre-enfriados a 4°C. 30 g de nanopartículas de sílica magnéticas (SIMAG-Hydroxyl) fueron lavadas con 5 mL de PBS, acetona:agua (3:7) y acetona agua (6:4). El sobrenadante fue removido utilizando una gradilla imantada. Las nanopartículas fueron resuspendidas en 0,3 mL de acetona:agua (6:4) e incubadas con 37,5 mg de CDAP disuelto en 1 mL de acetona:agua (6:4) y se agitó vigorosamente por 3 minutos a 4 °C. Inmediatamente luego, se añadieron 0,18 mL de TEA 0,2 M gota a gota en un período de 1 a 2 minutos. A los 3 minutos el sobrenadante fue retirado y se agregó 1 mL de HCl 50 mM. Luego de no más de 2 minutos, este sobrenadante fue retirado y las nanopartículas fueron lavadas con 5 mL de agua destilada fría. Se utilizaron en forma inmediata para la inmovilización de PNGasa F.

Activación de Nanopartículas de Sílica

El procedimiento fue optimizado en nuestro laboratorio en el marco de esta maestría. Se agitó y se sonicó durante 5 minutos una solución de nanopartículas de sílica 20 mg/mL (Hiq-nano 500 nm) y se tomó un volumen de 2 mL de la misma. Se centrifugó, se descartó el sobrenadante y se lavaron con 7 mL de buffer fosfato 50 mM pH 7,5 suplementado con NaCl 50 mM y EDTA 5 mM (buffer de inmovilización), 7 mL de acetona:agua (3:7) y finalmente con 7 mL de acetona:agua (6:4). Los lavados se realizaron en tandas de 1 mL separando el sobrenadante por centrifugación en minicentrífuga. A continuación las nanopartículas fueron resuspendidas en 400 µL de acetona:agua (6:4). Posteriormente se agregaron 1.4 mL de una solución de CDAP 152 mM en acetona:agua (6:4) en 4 tandas de 350 µL durante 3 min a 4°C bajo agitación vigorosa. Inmediatamente después, se agregaron 240 µL de TEA 0,2 M en cuatro tandas de 60 µL durante un lapso de 2 minutos, y se incubó por 3 minutos más. A continuación, se removió el sobrenadante por centrifugación en microcentrífuga y se agregaron 1,4 mL de HCl 50 mM. Luego de 1 minuto el sobrenadante fue removido y las nanopartículas fueron lavadas con 5 mL de buffer de inmovilización de PNGasa en 5 tandas de 1 ml. Se separa el sobrenadante y se pesan las nanopartículas activadas para determinar el peso de las nanopartículas húmedas y se utilizaron de forma inmediata para la inmovilización de PNGasa F. Todo el procedimiento de activación fue realizado en baño de hielo y todos los reactivos utilizados fueron pre-enfriados a 4°C.

*Inmovilización de β -Galactosidasa de *Aspergillus oryzae**

Se llevó a cabo como fue reportado por Rodriguez et al. 2018 ¹¹⁶. Se incubaron 1,7 g de agarosa activada con grupos cianato ester con 17 mL (48,6 UE/mL, 0,26 mg/mL) de β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* (Sigma) en buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 8,3 (buffer de inmovilización de β -galactosidasa) durante 4 horas a temperatura ambiente bajo agitación suave. Se removió el sobrenadante y el derivado inmovilizado (β -Gal-Agarosa) se lavó con el buffer de actividad para β -galactosidasa y se almacenó a 4°C.

*Inmovilización de α -Manosidasa de *Bacterioides thetaiotamicron**

Se incubaron 250 mg de agarosa activada con 1 mL de α -manosidasa de *Bacterioides thetaiotamicron* (7,1 UE/mL; 2.7 mg/mL) (Megazyme) en PBS durante 4 horas a temperatura ambiente y agitación suave en roto-torque. Se separó el sobrenadante, se lavó el derivado inmovilizado (α -Man-Agarosa) con buffer MES pH 6,5 suplementado con CaCl₂ 2,5 mM y se guardó a 4°C.

*Inmovilización de α -Fucosidasa de *Homo sapiens**

Se incubaron 400 mg de agarosa activada con 1,6 mL de α -fucosidasa de *Homo sapiens* (23,5 UE/mL; 0,94 mg/mL) (Megazyme) en PBS durante 4 horas a temperatura ambiente y agitación suave en roto-torque. Se separó el sobrenadante, se lavó el derivado inmovilizado (α -Fuc-Agarosa) con PBS y se guardó a 4°C.

Inmovilización de Neuraminidasa

La inmovilización de neuraminidasa se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado por Bidondo et al. 2020¹¹⁸. Se incubaron 500 mg de agarosa activada con 1,7 mL (0,54 UE/mL; 0,25 mg/mL) de neuraminidasa de *Clostridium perfringens* (Sigma) en PBS durante a 4 horas a temperatura ambiente bajo agitación suave. Se separó el sobrenadante, se lavó el derivado inmovilizado (Neura-agarosa) con PBS y se almacenó a 4°C.

Inmovilización de PNGasa F

Se incubaron 66 mg de nanopartículas de sílica activadas húmedas (nanoS) o 170 mg de nanopartículas magnéticas (nanoM) con 1,2 mL (36 UE/mL) o 2 mL (65 UE/mL) de PNGasa F (Promega) en buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7,5; 50 mM NaCl; 5 mM EDTA respectivamente durante 4 horas a temperatura ambiente bajo agitación suave en roto-torque. Transcurrido este tiempo se agregaron 135 µL de buffer Tris 2M pH 7,5 y se incubó durante 30 minutos más. Se separó el sobrenadante por centrifugación, se lavó el derivado inmovilizado (PNGasa F-nanoM o PNGasaF-nanoS) con 5 mL de buffer de actividad de PNGasa F y se guardó a 4°C.

Evaluación de la Inmovilización

Con el fin de evaluar la eficiencia de la inmovilización, se definieron el porcentaje de inmovilización y el porcentaje de actividad enzimática expresada.

El rendimiento de inmovilización para α -manosidasa, α -fucosidasa, neuraminidasa y β -galactosidasa se evalúa cuantificando los mg de proteína ofrecidos al soporte y los que permanecieron en el sobrenadante, y así por diferencia se puede determinar el porcentaje de proteína inmovilizada.

$$\% \text{ inmovilización} = \frac{(\text{mg Prot aplicadas} - \text{mg Prot sobrenadante}) \times 100}{\text{mg Prot aplicadas}}$$

En el caso de PNGasa, la concentración de proteína en la solución de enzima que se incuba con las nanopartículas es muy baja por lo no se puede cuantificar la concentración de proteína. Esto se debe a que las nanopartículas deben ser incubadas en un volumen suficiente para mantenerse dispersas y evitar su agregación. En este caso el rendimiento de inmovilización se calcula por diferencia entre las Unidades de enzimas aplicadas al soporte y las recuperadas en el sobrenadante.

$$\% \text{ inmovilización} = \frac{(\text{UE aplicadas} - \text{UE sobrenadante}) \times 100}{\text{UE aplicadas}}$$

Por otro lado, el % de actividad enzimática expresada para todas las enzimas se calcula midiendo la actividad enzimática directamente en el soporte y expresándola como un porcentaje de la actividad aplicada.

$$\% \text{ actividad enzimática expresada} = \frac{\text{UE inmovilizadas/g} \times 100}{\text{UE aplicadas/g}}$$

dónde UE/g aplicadas corresponde a las Unidades de Enzima aplicadas al soporte y UE/g inmovilizadas, a las Unidades de Enzima expresadas en el derivado inmovilizado por unidad de masa del soporte.

La cuantificación de proteínas solubles se realizó mediante la técnica del BCA y la medida de Unidades de Enzima en cada caso fue realizada como se describe en el apartado de Medida de Actividad Enzimática de este capítulo.

DEGLICOSILACIÓN CON DERIVADOS INMOVILIZADOS

*Deglicosilación de lisados de *T. cruzi**

Para realizar la deglicosilación enzimática de los lisados de *T. cruzi* con la batería de glicoproteínas inmovilizadas se partió de una dilución del lisado de 500 µg/mL en PBS. En el caso de los lisados epi-TC-DOC se realizó una diálisis previa contra PBS y luego se diluyó hasta 500 µg/mL, y en caso de epi-TC-Nativos se diluyeron directamente. Para las deglicosilaciones realizadas con α-manosidasa y α-fucosidasa las diálisis y diluciones se hicieron en PBS pH 6,5.

Se incubaron 500 µL de epiTC-DOC o epiTC-nativo 500 µg/mL con 120 mg de PNGasa-nano M (100 UE/g), 66 mg de PNGasa-nano S (48,6 UE/g), 250 mg β-Gal-Agarosa (282 UE/g), 250 mg Neura-Agarosa (0,7 UE/g), 250 mg de α-man-Agarosa (12 UE/g) o 400 mg de α-Fuc-agarosa (37 UE/g) durante 24 horas a 37°C con agitación suave. En el caso de la deglicosilación con βGal-Agarosa la deglicosilación se hizo a temperatura ambiente. Luego se separó la enzima inmovilizada por filtración, centrifugación o aplicación de un imán (gradilla imantada) dependiendo si la enzima se encontraba inmovilizada sobre agarosa, nanopartículas de sílica o nanopartículas magnéticas y los lisados deglicosilados fueron dializados con membrana de 3,5 KDa (Thermo scientific) durante 24 horas de forma de separar los glicanos o monosacáridos liberados y se almacenaron a -20°C para su posterior análisis por ensayos de reconocimiento con lectinas específicas. Los derivados enzimáticos se lavaron con el buffer de actividad

correspondientes y se almacenaron a 4°C para volver a reutilizarlos. Se realizaron experimentos control incubando los lisados con el soporte correspondiente sin activar en las mismas condiciones.

Deglicosilación de Glicoproteínas Modelo

Degalactosilación de asialofetaina y asialolactoferrina

La asialofetaina y asialolactoferrina se obtuvieron por desialilación química de fetuina y lactoferrina respectivamente. Se disolvieron 30 mg de fetuina de suero fetal bovino (Sigma-Aldrich) o Lactoferrina (Murray Golburn Cooperative Co. LTD) en 2,55 mL de HCL 0,2 M y se incubaron en un baño seco a 80°C durante una hora. Luego de enfriar a temperatura ambiente se neutralizó la solución con NaOH 2,0 M, se centrifugó y el sobrenadante se dializó contra PBS pH 6,5 utilizando membranas de diálisis de corte 12.000-14.000 Da durante 24 hs. Posteriormente, se incubaron 500 µL de una solución de asialofetaina (0,5 mg/mL) o 500 µL de una solución de asialolactoferrina (0,5 mg/mL) con 100 mg de β-Gal-Agarosa durante 24 horas a temperatura ambiente bajo agitación suave. Se separó la enzima inmovilizada por filtración, se lavó en buffer de actividad para β-galactosidasa y se guardó a 4°C para su próximo uso. El sobrenadante se dializó contra PBS utilizando membranas de 3,5 kDa, como se indicó anteriormente, para separar la galactosa liberada y se analizó por ensayos de reconocimiento con lectina. Se realizaron experimentos control incubando la asialofetaina y asialolactoferrina con agarosa sin activar en las mismas condiciones.

Desialilación de fetuina y lactoferrina

Se prepararon soluciones de fetuina (0,23 mg/mL) y lactoferrina (0,5 mg/mL) en PBS. Las soluciones de glicoproteína se gel filtraron en columnas de sephadex G25 (NAP-5) o se dializaron de forma de remover contaminantes de bajo peso molecular. Se incubaron alícuotas de 600 µL de fetuina o 500 µL de lactoferrina con 250 mL de Neura-agarosa (0,7 UE/g) a 37°C durante 24 horas bajo agitación suave. Se separó la enzima inmovilizada por filtración, se lavó en buffer de actividad para neuraminidasa y se guardó a 4°C para su uso posterior. El sobrenadante se gel filtró en columnas de sephadex G25 (NAP-5) previamente equilibradas en bicarbonato de amonio 50 mM pH 7,8 de forma de separar el

ácido siálico liberado de las glicoproteínas. Las glicoproteínas fueron analizadas por ensayos de reconocimiento por lectinas. Se realizaron experimentos control incubando la fetuina y la lactoferrina con agarosa sin activar en las mismas condiciones.

PURIFICACIÓN DE MUCINAS ANCLADAS A GPI DE *T. CRUZI*

Para purificar las mucinas ancladas a GPI de *T. cruzi* en estadio epimastigota se siguió el protocolo propuesto por Acosta Serrano et. al. 1995³⁹.

Se partió de un precipitado liofilizado que contenía 5×10^{10} parásitos epimastigotas de la cepa Dm28c conservado a -80°C . Se realizaron tres extracciones de 50 mL con una solución de $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:2:0,8) resuspendiendo los parásitos con la ayuda de agitación mecánica por vortex, sonicado y disgregado con espátula. Se hizo un pool con los sobrenadantes de las tres extracciones, se rotaevaporó a 35°C durante 3 horas y se guardó el residuo a -20°C . El residuo de la rotaevaporación se retomó en 50 mL de $\text{BuOH}:\text{H}_2\text{O}$ (2:1), se agitó vigorosamente y se dejó decantar en bola de decantación hasta la separación completa de las dos fases. Se separó la fracción acuosa y se lavó dos veces con 25 mL de BuOH saturado en agua y se guardó durante una noche a 4°C . Se rotaevaporó la fracción acuosa durante 2 horas a 35°C a los efectos de remover completamente los residuos de BuOH y se liofilizó. Se retomó el precipitado en 500 μL de una solución de 0.5% de 1-propanol en acetato de amonio 0,1 M (Buffer A). A continuación, se realizó una cromatografía hidrofóbica utilizando una matriz de octil-sefariosa. La columna fue equilibrada con Buffer A, posteriormente se sembraron 350 μL de la extracción previa a un flujo de 12 mL/h. Se lavó con Buffer A y se eluyó con gradiente de 1-propanol (0.5%-60%) en un volumen de 65,5 mL, recogiendo fracciones de 0,5 mL. Las fracciones se dejaron evaporando en campana y luego se liofilizaron y retomaron en 100 μL de agua, solamente en aquellas donde se detectó un precipitado visible. Se cuantificó la concentración de proteínas por Absorbancia a $\lambda=280$ y se analizó por electroforesis SDS-PAGE y ensayos ELLA de reconocimiento por lectinas. En función de los resultados obtenidos en un segundo proceso de purificación se procedió de la misma forma, pero en la cromatografía hidrofóbica la elución se realizó por saltos de concentración de propanol (20%, 23%, 28%, 32%, 34%, 38% y 40%).

CULTIVO CELULAR

Líneas Celulares

Se utilizaron dos tipos de líneas celulares humanas HEK-293 (Human embryonic kidney 293 cells) modificadas por una transfección estable para expresar TLRs humanos o murinos. Una de ellas son las células HEK-293-TLRs clásicas y las otras son las células HEK-293-TLRs *Blue*. Las líneas del tipo *Blue* son una versión actualizada de las líneas clásicas. Como las líneas *Blue* se adquirieron posteriormente, los primeros ensayos de este trabajo fueron hechos utilizando las líneas clásicas.

Las líneas clásicas contienen un plásmido que codifica para un TLR murino de interés. En caso de estimular dicho TLR, se induce la activación de este receptor, la cual desencadena una cascada de señalización que conduce a la activación del factor de transcripción NF- κ B y a la consecuente producción de IL-8 humana. Esta última funciona como gen reportero y es cuantificada por ELISA. Los TLRs analizados fueron: TLR 1/2, 2, 3, 4, 5, 2/6, y 9 murinos. Además, también se incluyó la línea *Null* como control, ya que no codifica para ningún TLR en su construcción. Esta línea se utilizó para determinar una expresión basal de expresión de IL-8, ya que puede haber expresión de TLRs humanos propios de las células. Las líneas HEK-293/TLRs fueron obtenidas del repositorio de InvivoGen y cultivadas según las indicaciones del fabricante. En las líneas *Blue* se utiliza una tecnología similar, donde un plásmido contiene la secuencia del TLR de interés, pero difieren de las clásicas en su sistema de detección de la activación. Cuando el receptor TLR es activado, se desencadena la misma vía de señalización anterior que lleva a la activación de NF- κ B, pero en este caso el gen reportero es la enzima SEAP (fosfatasa alcalina embrionaria secretoria). Los niveles de SEAP son censados con el uso del medio de cultivo HEK-*Blue Detection*, que contiene un componente cromogénico azul que se genera por la actividad hidrolítica de esta enzima y que se mide por absorbancia a 655 nm. Estas líneas también fueron obtenidas del repositorio de InvivoGen y cultivadas según las indicaciones del fabricante. Se evaluaron los TLRs 2 y 4 humanos y el TLR 4 murino, que utilizan como líneas control las *Null1*, *Null2* y *Null1-V*, respectivamente.

Inicialmente se realizaron expansiones de todas las líneas y se congelaron viales de aproximadamente 1×10^6 células en FBS (Gibco) con dimetilsulfóxido (DMSO) 10%, para poder utilizar células con un bajo número de pasajes en el transcurso de este trabajo. Para mantener los cultivos se utilizó medio DMEM GlutaMAX (Gibco) suplementado con FBS (Capricon) 10%, Penicilina 10 Unidades/mL, Estreptomicina 10 μ g/mL (Gibco), Blastidina 10 μ g/mL y Normocina 100 μ g/mL. Además,

se utilizaron los antibióticos de presión selectiva *HEK-Blue Selection 1X* para las líneas que expresan TLRs y Zeocina 100 µg/mL para las líneas *Null*. Se evitó que las células superaran el 80% de confluencia, y se realizaron pasajes 1-2 veces por semana. El mantenimiento y el cultivo de las células necesitó de una familiarización y entrenamiento determinado para asegurar la viabilidad celular y la reproducibilidad de los resultados.

Ensayo de activación HEK-293 TLRs clásicas

Para colectar las células se retiró el medio y se realizó un lavado con PBS. Luego se resuspendieron en PBS, pipeteando directamente sobre la monocapa y dando golpes suaves al frasco, para lograr la disrupción de las adhesiones de forma mecánica. Se contaron en cámara de Neubauer con tinción de Azul Tripán y se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 RPM (revoluciones por minuto) a temperatura ambiente. Posteriormente, se resuspendieron en 1 mL de medio de cultivo y se realizaron las diluciones necesarias para sembrar 50.000 células en un volumen de 100 µL/pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos. Una vez sembradas, se incubaron durante 24 horas a 37°C y 5% CO₂. Al día siguiente, se agregaron los estímulos a sus concentraciones correspondientes (Tabla 2) en un volumen de 100 µL/pocillo en medio de cultivo y se volvieron a incubar durante 24 horas a 37°C y 5% CO₂. Estos estímulos fueron: medio de cultivo (control negativo), ligandos conocidos activadores de los TLR utilizados (control positivo) y lisado epi-TC-DOC y epi-TC-Nativo. A continuación, se detallan los ligandos activadores utilizados para cada TLR y su concentración.

Tabla 2. Líneas HEK-clásicas y sus ligandos activadores.

Línea Celular	Ligando activador	Concentración (ng/mL)
<i>HEK-293/mTLR1/2</i>	Lipoproteína triacilada sintética (PAM3CSK4)	20
<i>HEK-293/mTLR2</i>	Lipoproteína diacilada sintética (FSL-1)	100
<i>HEK-293/mTLR3</i>	Ácido polinosínico policitidílico (PIC)	200
<i>HEK-293/mTLR4</i>	Lipopolisacárido de <i>Escherichia coli</i> cepa K12 (LPS-EK)	50
<i>HEK-293/mTLR5</i>	Flagellina de <i>Salmonella typhimurium</i> (FLAST)	1000
<i>HEK-293/mTLR2/6</i>	FSL1	100
<i>HEK-293/mTLR9</i>	Oligonucleótido CpG Clase B, secuencia 5'-tccatgacgttctctgacgtt-3' (ODN 1826)	500

Transcurridas las 24 horas con estímulo, se retiró cuidadosamente el sobrenadante sin tocar el fondo de la placa, se guardó en una nueva placa y se congeló a -20°C hasta el momento de realizar la cuantificación de IL-8 por ELISA. A las células se les agregó 100 μL /pocillo de medio de cultivo fresco y se evaluó su viabilidad por el ensayo de MTT.

Ensayo de MTT

Con el objetivo de normalizar la medida de IL-8 generada por las células HEK-293/TLRs con la viabilidad de las mismas, se realizaron ensayos de MTT para evaluar este último parámetro. Con este fin, una vez finalizado el estímulo de los TLRs, las células se incubaron con 100 μL de medio de cultivo y 10 μL del reactivo Bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) (MTT) a 5 mg/mL en PBS durante tres horas a 37°C . Luego se agregaron 100 μL /pocillo de SDS 10% en HCl 0,01 N y se incubó nuevamente a 37°C durante toda la noche. Al otro día se midió la absorbancia a 570 nm en el lector de placas (Multiskan GO, ThermoFisher) y se graficó esta absorbancia en función de cada muestra.

ELISA de IL-8 (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Este ensayo consiste en un ELISA de tipo sándwich, en donde el inmunocomplejo formado es el antígeno reconocido por dos anticuerpos específicos para la misma molécula, pero que reconocen epítopes diferentes. Para ello se sensibilizaron placas de ELISA (MaxiSorp, Nunc) con el anticuerpo primario α -hIL-8 (BD Biosciences) 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en buffer Fosfato 100 mM (50 μL /pocillo) y se incubó a 4°C durante toda la noche. Al otro día se realizaron 2 lavados con una solución de PBS-Tween 0,1% (solución de lavado), y se bloqueó con una solución de gelatina 1% en PBS. Posteriormente se realizaron 3 lavados y se agregaron 50 μL /pocillo del sobrenadante de cultivo sin diluir y se incubó durante una hora a 37°C . También se incluyó una curva de calibración, para la cual se utilizaron diluciones seriadas de IL-8 humana recombinante. A continuación, se realizaron 3 lavados, se agregaron 50 μL /pocillo del anticuerpo secundario α -IL-8 conjugado a biotina (BD Biosciences) 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS y se incubó durante una hora a 37°C . Luego se realizaron dos lavados y se incubó con Estreptavidina conjugada a HRP (BD Biosciences) en PBS durante una hora a 37°C siguiendo las recomendaciones del fabricante. Por último, se procedió al revelado con una solución de OPD (Sigma) a una concentración de 0,5 mg/L en

buffer Citrato 20 mM Fosfato 50 mM pH 5,0 y con H₂O₂ 0,12%. Se agregaron 200 µL de esta solución en cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad entre 1 y 15 minutos, tiempo necesario para que se desarrolle el complejo coloreado sin llegar a la saturación. Luego se agregaron 50 µL de H₂SO₄ 12% para detener la reacción y estabilizar al complejo y se midió la absorbancia a 492 nm en lector de placas (Multiskan GO, ThermoFisher). Se graficó el cociente resultante de la concentración de IL-8 dividida por la absorbancia obtenida en el ensayo de viabilidad celular MTT para cada muestra.

Ensayo de activación HEK-Blue

En el caso de las líneas HEK-Blue, la detección de la activación de los TLRs es fácilmente medida en tiempo real con un lector de placas. Para este ensayo se utiliza un medio de cultivo llamado *HEK-Blue Detection* que se incuba con las células y los estímulos de activación. En caso de que haya estimulación del TLR estudiado, luego de un período de 16 a 24 horas, el medio de cultivo se torna de color azul intenso, cuantificándose este viraje de color con la medida de la absorbancia a 655 nm. De lo contrario, el color del medio permanece rojizo, presentando una absorbancia muy baja a esta longitud de onda. El procedimiento para este ensayo consiste en primer lugar en sembrar 20 µL del estímulo de TLR a las concentraciones optimizadas en una placa de 96 pocillos. Se utilizó PBS o agua como control negativo, ligandos activadores de TLRs conocidos como control positivo y lisado epi-TC-Nativo. En la Tabla 3 se detallan los ligandos activadores utilizados para cada TLR y su concentración. Posteriormente, las células se resuspendieron en medio *HEK-Blue Detection* y se sembraron 50.000 células/pocillo en un volumen de 180 µL. Se incubaron durante toda la noche a 37°C y 5% CO₂. Al otro día se midió la absorbancia a 655 nm y se graficó la misma en función de cada muestra, comparando en cada caso con la señal de sus respectivas líneas *Null*. La viabilidad celular, evaluada por el ensayo del MTT, no se vio alterada en las condiciones utilizadas.

Tabla 3. Líneas HEK-Blue y sus ligandos activadores

Línea Celular	Línea Celular Control	Ligando activador	Concentración (ng/mL)
<i>HEK-293/hTLR2-Blue</i>	<i>Null1</i>	PAM3CSK4	20
<i>HEK-293/hTLR2-Blue</i>	<i>Null1</i>	FSL-1	100
<i>HEK-293/hTLR4-Blue</i>	<i>Null2</i>	LPS-EK	100
<i>HEK-293/mTLR4-Blue</i>	<i>Null1-v</i>	LPS-EK	100

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos fueron realizados mediante test One o Two Way – ANOVA, dependiendo del número de grupos, considerando diferencias significativas cuando: * $p < 0,05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Se utilizó el programa GraphPad Prism 8.0.1.

RESULTADOS

1- Estudio del reconocimiento por TLRs de un lisado parasitario de *T. cruzi*.

Caracterización general de los lisados

En los inicios de este trabajo contamos con lisados epi-TC-DOC, generados a partir de cultivos de *T. cruzi* en estadio epimastigota de la cepa Dm28c en condiciones desnaturalizantes (lisados totales enriquecidos en proteínas de membrana). Más adelante también utilizamos lisados epi-TC-Nativos (lisados totales enriquecidos en proteínas solubles).

Antes de comenzar a estudiar su rol biológico en relación a la activación de la respuesta inmune innata, nos propusimos caracterizar de forma general este material de trabajo, y así determinar las condiciones óptimas para la actividad experimental subsiguiente.

En primer lugar, se evaluó el comportamiento del lisado epi-TC-DOC en diferentes soluciones amortiguadoras que se utilizarían en los experimentos siguientes, especialmente en los que se emplearían con las glicosidasas. Para ello, se realizaron diálisis del lisado con las diferentes soluciones buffer enumeradas en la Tabla 4, de forma de evaluar la tolerancia que presenta el lisado a los cambios de pH y testar la integridad de la muestra al cambiar el pH dentro de un rango determinado.

Tabla 4. Soluciones buffer evaluadas con los lisados epi-TC-DOC.

Solución buffer	pH	Integridad de la muestra
Bicarbonato de amonio 0,05M	7,8	Buena solubilidad
PBS	7,4	Buena solubilidad
PBS	6,5	Buena solubilidad
Acetato de Sodio 0,05 M	5,5	Precipitación
Acetato de Potasio 0,1 M	4,6	Precipitación
Citrato de Sodio 0,05 M	4,5	Precipitación

Como se puede observar en la Tabla 4, el lisado fue capaz de mantenerse en solución a pHs más alcalinos, mientras que en condiciones ácidas por debajo de pH 6,5 se generaron precipitados. Este resultado condiciona el uso de glicosidasas inmovilizadas para la remoción selectiva de carbohidratos como se describe en el capítulo de Materiales y Métodos, ya que algunas de las glicosidasas disponibles en nuestro laboratorio presentan un pH óptimo inferior a 6,5. Para esos casos se resolvió dializar los lisados contra PBS pH 6,5, ya que fue el pH más bajo en el que el lisado parasitario presentó una solubilidad aceptable.

Se realizaron corridas electroforéticas SDS-PAGE de ambos lisados (DOC y Nativo) de la cepa Dm28c, con el fin de analizar y caracterizar el peso molecular aparente de los componentes contenidos en ambos lisados. Como se puede ver en la Figura 10, los componentes presentes en los lisados epi-TC-DOC y epi-TC-Nativo mostraron características diferentes, tanto en el patrón de bandas como en la migración de las mismas. Se puede observar que el lisado DOC presentó características de *smear*. Por el contrario, para el lisado obtenido en condiciones nativas (no desnaturalizantes), pudimos observar componentes en forma de bandas discretas. Esto pudo deberse a que el lisado DOC está enriquecido en glicoproteínas (por mantener en solución a proteínas de membrana), que característicamente muestran este comportamiento en electroforesis. También podría deberse a que el detergente DOC intervenga en la corrida e impida la correcta separación de las bandas en el gel.

Otro aspecto en el que profundizamos fue en la evaluación de la metodología utilizada para cuantificar proteínas. En los inicios de este trabajo se comenzó dosificando el contenido proteico de los lisados epi-TC-DOC por el método de BCA. Este método fue útil, pero comenzamos a notar que lo que observábamos en los geles teñidos con Coomassie no se correlacionaba con la cantidad de proteína sembrada según los valores obtenidos en la cuantificación, por lo que se optó por utilizar también el método de Absorbancia a 280 nm para cuantificar los lisados. Esta cuantificación ofreció mejores resultados, por lo que se mantuvo este método en los ensayos posteriores. Estos resultados se ejemplifican en la Figura 10.

[Identificación de la presencia de ligandos de TLRs en lisados epi-TC](#)

Como se mencionó en la sección de antecedentes, nuestro laboratorio cuenta con resultados no publicados que indican que los carbohidratos presentes en el lisado total de *T. cruzi* estarían relacionados con su actividad anti-tumoral^{101,106}. Una de las hipótesis que se generó a

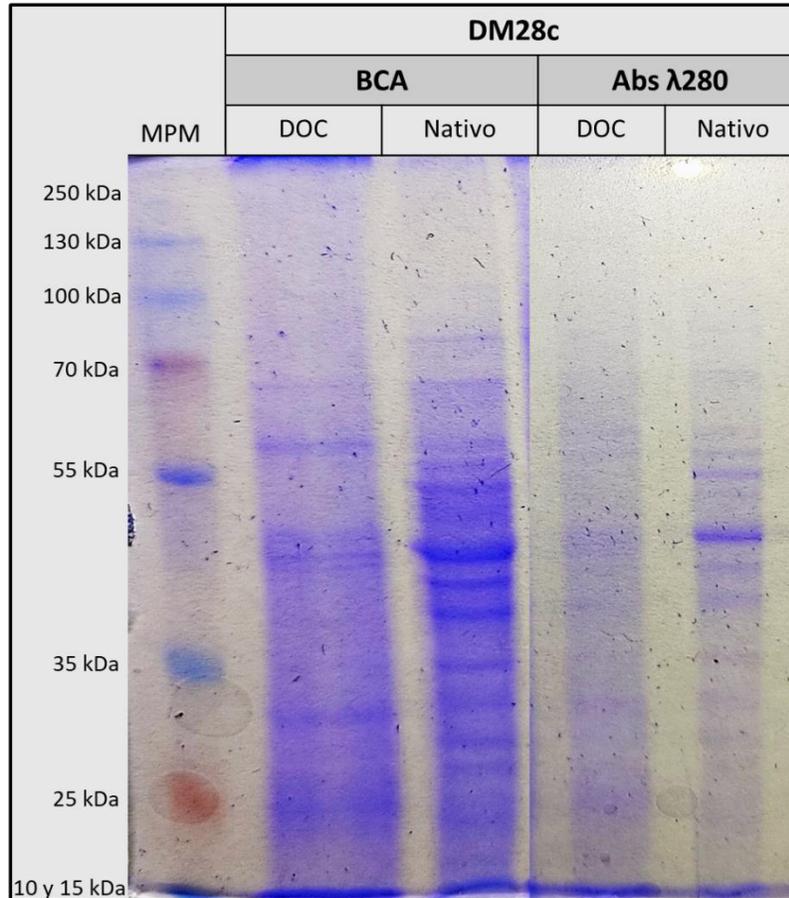


Figura 10. Electroforesis comparativa de lisados epi-TC-DOC y epi-TC-Nativo de Dm28c cuantificados por BCA y por Nanodrop. Se muestran las corridas electroforéticas de 40 µg de proteína total por carril, calculados según los resultados obtenidos con la cuantificación por el método de BCA y por Abs 280 nm. Se observa que la medida de BCA sub-estima la cantidad de proteína presente en el lisado, en comparación con la medida de Abs 280 nm.

partir de estos estudios es que los animales inmunizados con el lisado de *T. cruzi* presentan mayor activación de la inmunidad innata. En este contexto, nos propusimos estudiar la posible presencia de ligandos de los receptores innatos TLRs en los lisados de *T. cruzi*. Para ello, utilizamos un modelo experimental *in vitro* basado en líneas celulares que expresan diferentes TLRs murinos y humanos, y así poder estudiar su activación de forma aislada al resto de los componentes celulares que participan en la inmunidad innata. El análisis de la activación de TLRs por parte del lisado epi-TC-DOC en el sistema biológico HEK-293/TLRs clásico se muestra en la Figura 11. Como se presentó en el capítulo de Materiales y Métodos, estas células expresan un TLR en su membrana que tras su activación produce la secreción de IL-8 al medio de cultivo. Esta medida se normalizó con la viabilidad celular en cada caso.

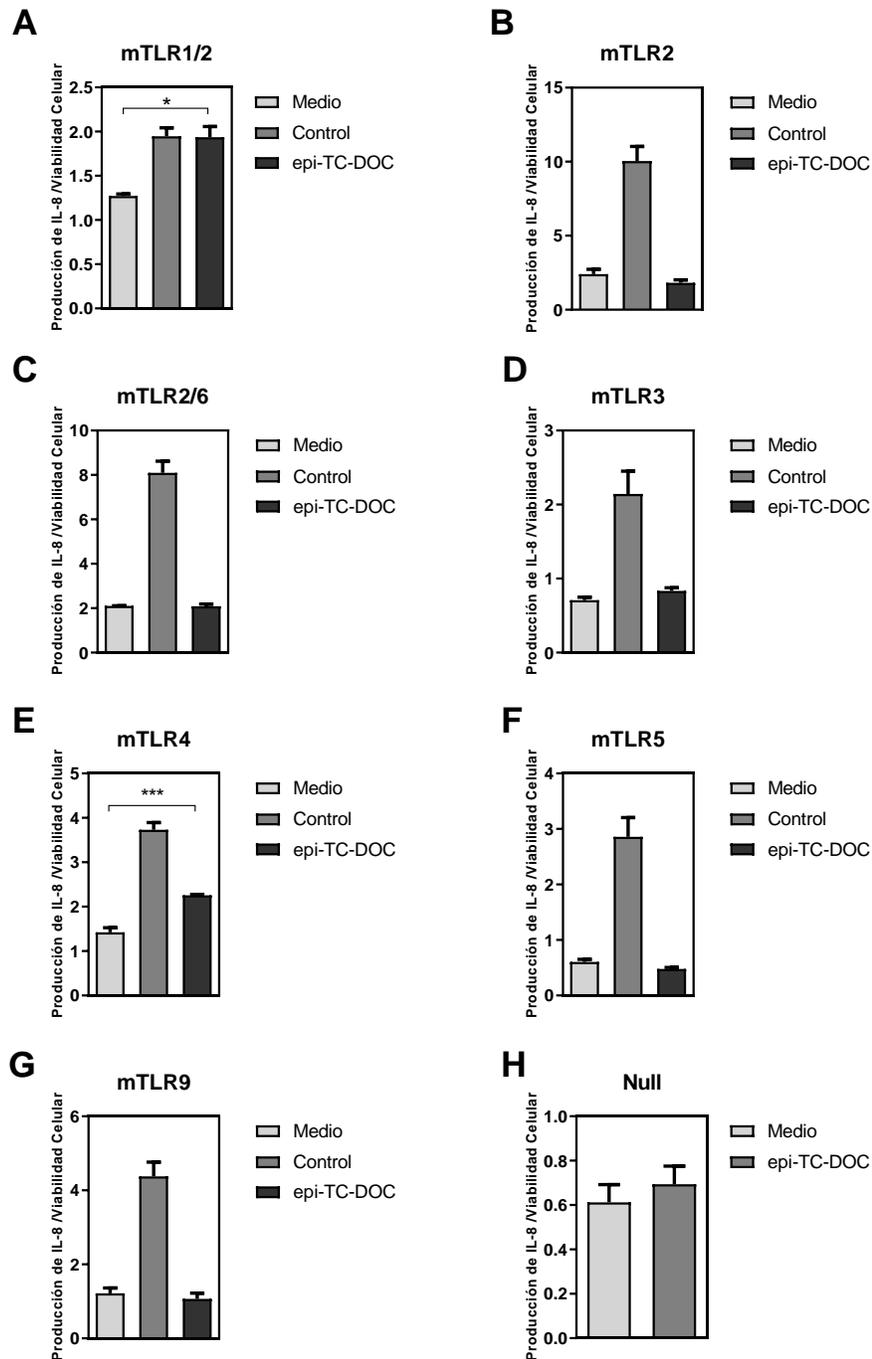


Figura 11. Activación de HEK-293/TLRs clásicas con ligandos presentes en el lisado epi-TC-DOC Dm28c. Cada gráfico corresponde a una línea celular que expresa un TLR diferente (A - G). La línea *Null* (H) corresponde al control de todas las líneas TLR (células que no expresan TLRs murinos). 50.000 células en un volumen de 100 μ L/pocillo se incubaron durante 24 horas a 37°C y 5% CO₂. Al día siguiente, se agregaron los estímulos a sus concentraciones correspondientes (Tabla 2) en un volumen de 100 μ L/pocillo en medio de cultivo y se volvieron a incubar durante 24 horas a 37°C y 5% CO₂. Estos estímulos fueron: medio de cultivo (control negativo), ligandos conocidos activadores de los TLR utilizados (control positivo) y lisado epi-TC-DOC. Los resultados se muestran como el cociente de la producción de IL-8/viabilidad celular evaluada por MTT. Las diferencias significativas están indicadas por asteriscos, donde: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

El lisado parasitario fue capaz de interaccionar y desencadenar la activación de los TLRs 1/2 y 4 murinos, ya que las células que expresan dichos receptores produjeron mayores niveles de IL-8 (Figura 14 A y E) al ser incubadas con epi-TC-DOC dializado en PBS, en relación a la condición control (medio). El resto de los TLRs estudiados (TLR 2, 2/6, 3, 5, y 9) no se activan con el lisado epi-TC-DOC, ya que la señal generada por *T. cruzi* fue similar a la generada con medio de cultivo únicamente (Figura 11 B, C, D, F y G). Para la línea *Null* no se observó diferencia entre el lisado y el control (Figura 11 H). Por lo tanto, concluimos que la interacción del lisado con los receptores TLR1/2 y TLR4 murinos debe ser estudiada con más profundidad.

Para confirmar estos resultados, se utilizó el sistema *HEK-Blue*, que posee una mayor sensibilidad ya que se trata de un sistema optimizado que utiliza como base el sistema HEK-clásico. Este se diferencia en su sistema de detección, ya que en lugar de basarse en la secreción de IL-8 tras la activación del TLR, se basa en la producción de una enzima que genera un cambio colorimétrico en el medio de cultivo, cuantificado a través de la medida de absorbancia a 655 nm. Con esta técnica se utilizaron lisados epi-TC-Nativos, ya que la presencia de DOC, incluso posterior a la diálisis contra PBS, interfiere con el sistema cromogénico de detección de *HEK-Blue*. Se utilizaron células que expresan el TLR4 murino, así como el TLR2 y TLR4 humano, para analizar posibles diferencias en el reconocimiento de los receptores provenientes del humano y del ratón. Con esta herramienta se pudo confirmar la activación por parte de TLR4 murino, humano y TLR2 humano. Como se presenta en la Figura 12, el lisado nativo Dm28c fue capaz de interaccionar y desencadenar su señalización con TLR4 murino y humano y con TLR2 humano. Dicha señalización aumentó al diluir los componentes parasitarios (Figura 12).

Posteriormente, se incluyeron otras cuatro cepas de *T. cruzi*, que fueron seleccionadas por presentar diferentes características, como su capacidad infectiva y su grupo según DTU. Estas fueron: Sylvio X10, Esmeraldo CL3, Arse y TcvT-1. Los lisados epi-TC-Nativos realizados a partir del cultivo de estas cepas también fueron estudiados para verificar la activación de los TLRs analizados con la cepa parasitaria Dm28c. Los resultados se muestran en las Figuras 13-16.

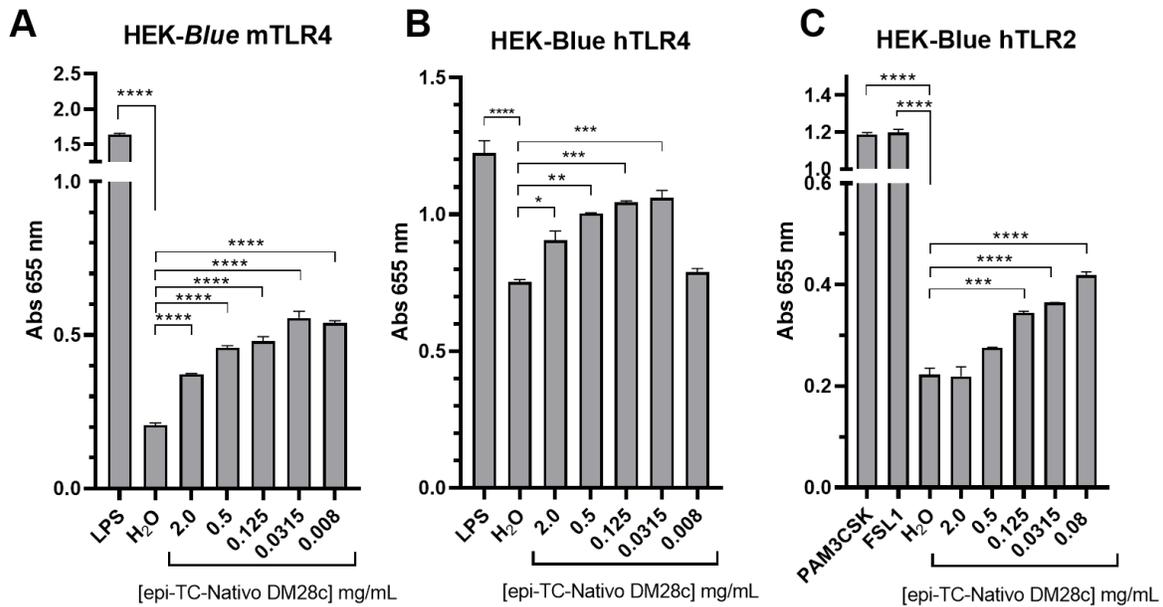


Figura 12. Activación de HEK-293/TLRs-Blue con ligandos presentes en epi-TC-Nativo Dm28c. Cada gráfico corresponde a un TLR diferente. A) TLR4 murino; B) TLR4 humano; C) TLR2 humano. Se observaron niveles de absorbancia basales al utilizar las células controles *Null*. 20 μ L del lisado o estímulos de TLR2 y 4 (controles positivos) a las concentraciones optimizadas en una placa de 96 pocillos. Posteriormente, las células se resuspendieron en medio HEK-Blue *Detection* y se sembraron 50.000 células/pocillo en un volumen de 180 μ L. Se incubaron durante toda la noche a 37°C y 5% CO₂, y se midió la absorbancia a 655 nm. Las diferencias significativas se muestran con asteriscos y corresponden a: * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, **** p <0.0001.

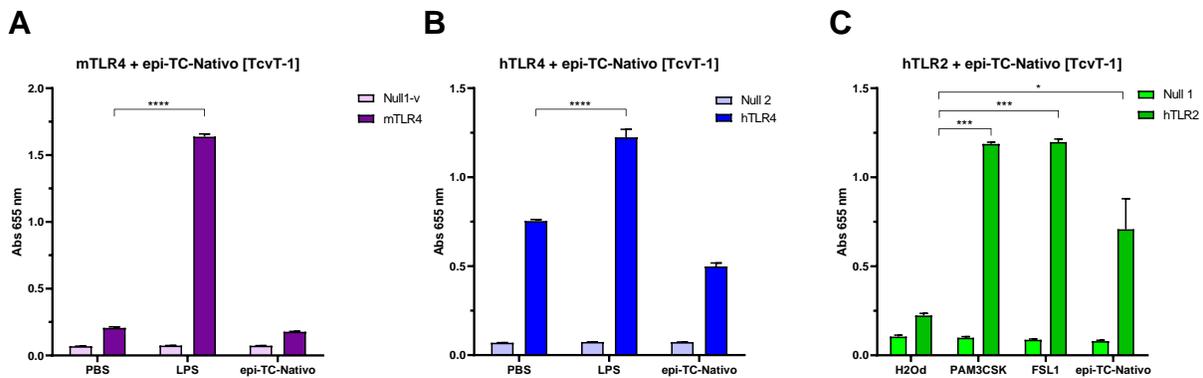


Figura 13. Activación de HEK-293/TLRs-Blue con ligandos presentes en epi-TC-Nativo TcvT-1. Cada gráfico corresponde a una línea celular que expresa un TLR diferente. A) TLR4 murino; B) TLR4 humano; C) TLR2 humano. 20 μ L del lisado o estímulos de TLR2 y 4 (controles positivos) a las concentraciones optimizadas en una placa de 96 pocillos. Posteriormente, las células se resuspendieron en medio HEK-Blue *Detection* y se sembraron 50.000 células/pocillo en un volumen de 180 μ L. Se incubaron durante toda la noche a 37°C y 5% CO₂, y se midió la absorbancia a 655 nm. Las diferencias significativas se muestran con asteriscos y corresponden a: * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, **** p <0.0001

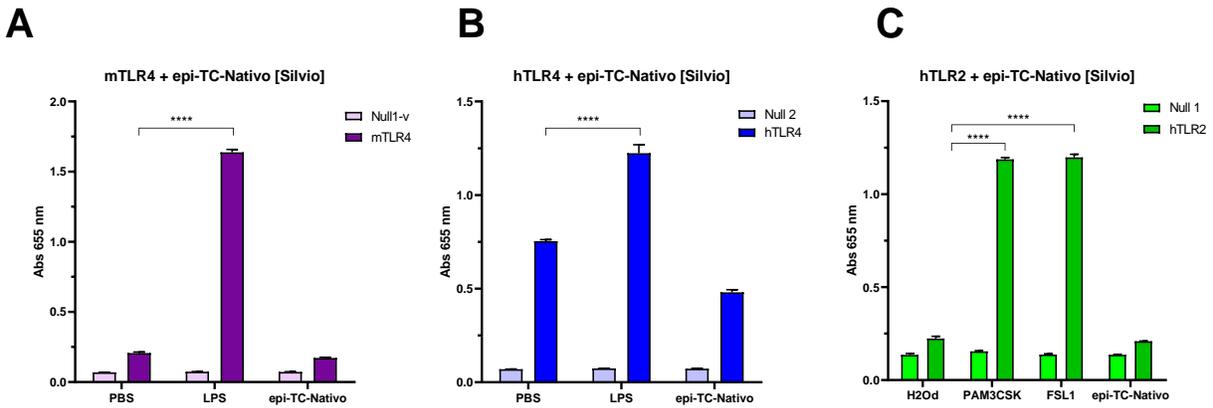


Figura 14. Activación de HEK-293/TLRs-Blue con ligandos presentes en epi-TC-Nativo Sylvio X10. Cada gráfico corresponde a una línea celular que expresa un TLR diferente. A) TLR4 murino; B) TLR4 humano; C) TLR2 humano. 20 μ L del lisado o estímulos de TLR2 y 4 (controles positivos) a las concentraciones optimizadas en una placa de 96 pocillos. Posteriormente, las células se resuspendieron en medio HEK-Blue Detection y se sembraron 50.000 células/pocillo en un volumen de 180 μ L. Se incubaron durante toda la noche a 37°C y 5% CO₂, y se midió la absorbancia a 655 nm. Las diferencias significativas se muestran con asteriscos y corresponden a: * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, **** p <0.0001.

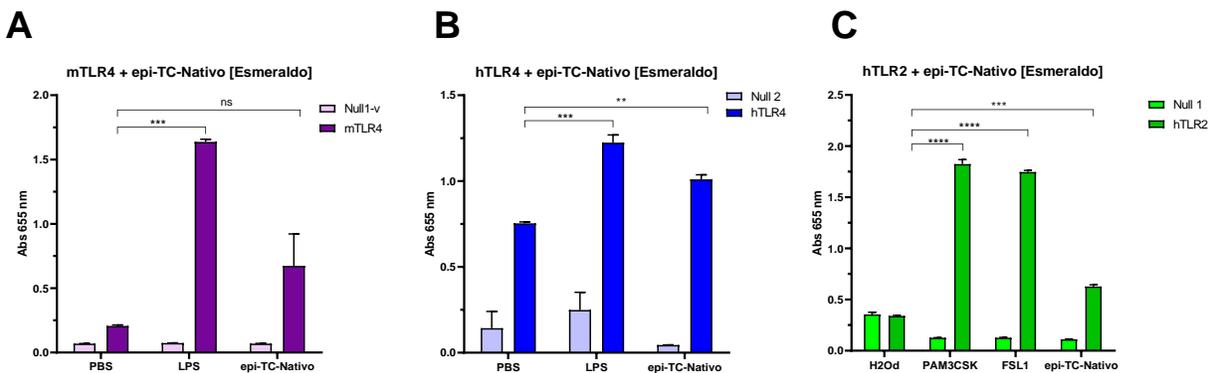


Figura 15. Activación de HEK-293/TLRs-Blue con ligandos presentes en epi-TC-Nativo Esmeraldo CL3. Cada gráfico corresponde a una línea celular que expresa un TLR diferente. A) TLR4 murino; B) TLR4 humano; C) TLR2 humano. 20 μ L del lisado o estímulos de TLR2 y 4 (controles positivos) a las concentraciones optimizadas en una placa de 96 pocillos. Posteriormente, las células se resuspendieron en medio HEK-Blue Detection y se sembraron 50.000 células/pocillo en un volumen de 180 μ L. Se incubaron durante toda la noche a 37°C y 5% CO₂, y se midió la absorbancia a 655 nm. Las diferencias significativas se muestran con asteriscos y corresponden a: * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, **** p <0.0001.

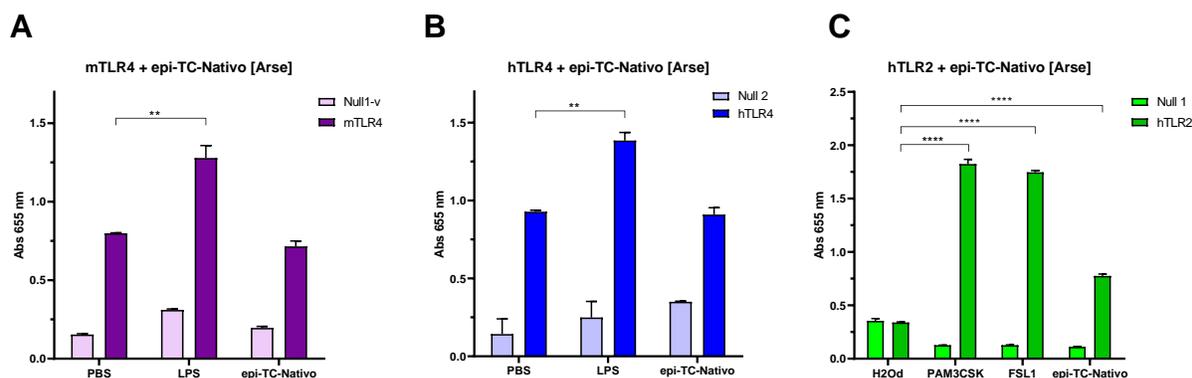


Figura 16. Activación de HEK-293/TLRs-Blue con ligandos presentes en epi-TC-Nativo Arse. Cada gráfico corresponde a una línea celular que expresa un TLR diferente. A) TLR4 murino; B) TLR4 humano; C) TLR2 humano. 20 μ L del lisado o estímulos de TLR2 y 4 (controles positivos) a las concentraciones optimizadas en una placa de 96 pocillos. Posteriormente, las células se resuspendieron en medio HEK-Blue Detection y se sembraron 50.000 células/pocillo en un volumen de 180 μ L. Se incubaron durante toda la noche a 37°C y 5% CO₂, y se midió la absorbancia a 655 nm. Las diferencias significativas se muestran con asteriscos y corresponden a: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

Como se puede observar, los componentes derivados de diferentes cepas parasitarias interactuaron de forma diferente con los TLRs estudiados. Además, se obtuvieron resultados diferentes a los observados para la cepa Dm28c. En primer lugar, las cepas TcvT-1 (Figura 13) y Arse (Figura 16) no activaron al TLR4 murino ni humano, pero sí al TLR2 humano. Por otra parte, la cepa Sylvio (Figura 14) no activó a ninguno de los TLRs estudiados. Finalmente, la cepa Esmeraldo (Figura 15) estimuló la activación de los dos TLRs humanos, mientras que con el TLR4 murino se observó una tendencia no significativa a generar activación. En todos los casos se observó una señal basal por parte de los respectivos controles *Null*, como era de esperar.

En conclusión y a modo de resumir esta sección de resultados podemos afirmar que:

- 1- Los lisados epi-TC-DOC no pueden ser utilizados en un rango de pH menor a 6,5 debido a que precipitan. Por otro lado, decidimos dosificar la concentración de proteínas utilizando el método de Absorbancia a 280 nm (con el equipo Nanodrop) ya que es un método que resultó más confiable para la cuantificación de estos lisados.
- 2- Los lisados epi-TC-DOC de la cepa Dm28c presentan ligandos activadores del TLR1/2 y TLR4 murinos.

3- Los componentes presentes en lisados epi-TC-Nativos provenientes de determinadas cepas parasitarias son capaces de activar de forma diferencial a los TLR evaluados: i) Dm28c activa al hTLR2, mTLR4 y hTLR4; ii) TcvT-1 activa al hTLR2 iii) Esmeraldo activa al hTLR4 y al hTLR2 iv) Arse activa al hTLR2. La cepa Sylvio no activó ningún TLR estudiado.

2- Estudio de los motivos carbohidratos presentes en los lisados parasitarios.

La glicosilación es una modificación postraducciona comúnmente encontrada en las proteínas presentes en la membrana celular. La síntesis proteica ocurre en el retículo endoplásmico, y luego las proteínas membranaarias son transportadas dentro de vesículas al aparato de Golgi y de allí a la membrana plasmática. Los carbohidratos se agregan a las cadenas polipeptídicas en el retículo endoplásmico y se modifican en el Golgi, por lo que la mayoría de las proteínas de la membrana plasmática son glicoproteínas con sus oligosacáridos expuestos en la superficie de la célula. En consecuencia, se forma una cubierta de carbohidratos en la superficie celular, conocida como glicocálix, compuesta por los oligosacáridos de glicolípidos y glicoproteínas asociados a la membrana ²⁵.

En trabajos anteriores se ha demostrado que la superficie de *T. cruzi* contiene un alto contenido de glicanos y que estos carbohidratos se encargan de guiar el proceso de diferenciación en el intestino del hospedero triatomado desde el estadio tripomastigota hacia el Epimastigota. De hecho, se ha correlacionado la presencia de ciertos azúcares con la capacidad infectiva de diferentes cepas ¹⁶³.

En los resultados anteriores se demostró que los lisados de *T. cruzi* en estadio epimastigota de Dm28c son capaces de activar a los TLRs 1/2 y 4 murinos. Por lo tanto, teniendo en cuenta que los ligandos podrían tratarse de proteínas de membrana, es de nuestro interés estudiar si la naturaleza de esta interacción es dependiente de la presencia de carbohidratos sobre las proteínas parasitarias.

Búsqueda de proteínas glicosiladas en los lisados parasitarios

Con el objetivo de comenzar con el estudio de los componentes glicosilados de los extractos parasitarios de *T. cruzi*, se realizaron electroforesis SDS-PAGE seguidas de tinción general de proteínas con Azul de Coomassie y tinción de carbohidratos, tanto para los lisados DOC como para los Nativos. Esto nos permitirá detectar las proteínas glicosiladas dentro de la mezcla total de proteínas presentes en ambos lisados (Figura 17).

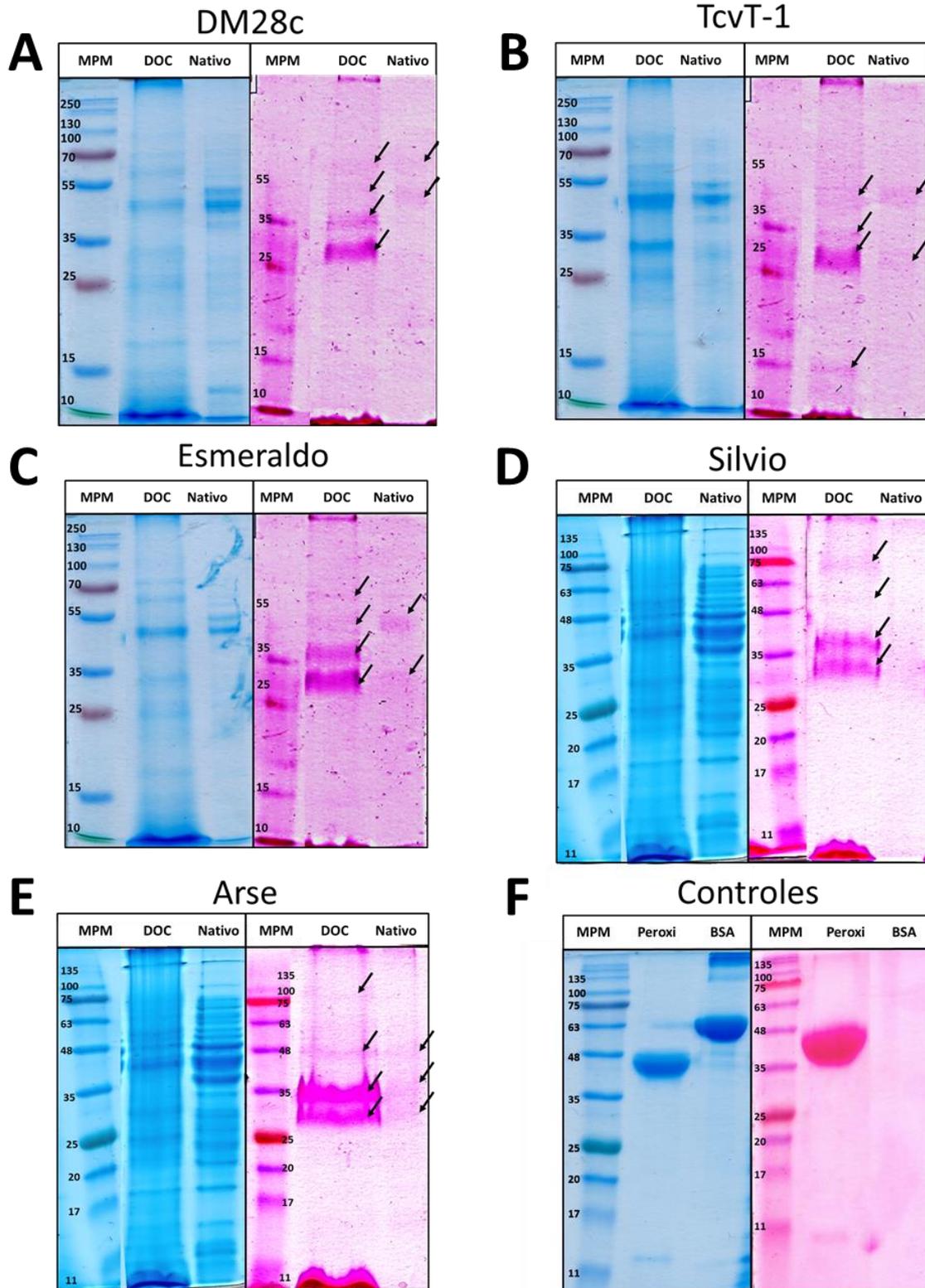


Figura 17. Electroforesis por SDS PAGE de lisados epi-TC-DOC y epi-TC-Nativo de diferentes cepas de *T. cruzi* y posterior tinción de las proteínas totales con azul de coomasie y de las glicoproteínas con tinción específica para carbohidratos. A-E. A la izquierda de cada figura se muestra la tinción de proteínas y a la derecha la tinción de glicoproteínas de los lisados estudiados. Las flechas indican las bandas identificadas luego de la tinción de las glicoproteínas. F. Tinción de las proteínas utilizadas como control. Como control positivo se utilizó a la Peroxidasa de rábano (Peroxi) y como control negativo a la Albúmina sérica bovina (BSA).

Todas las cepas presentaron componentes proteicos de similar peso molecular aparente al comparar todos los lisados epi-TC-DOC y todos los epi-TC-Nativos, aunque volvemos a visualizar que el patrón de bandas de los lisados epi-TC-DOC y epi-TC-Nativos es diferente entre sí, independientemente de la cepa. Probablemente la metodología utilizada para obtener cada muestra nos permitió obtener un enriquecimiento en proteínas de membrana en el caso de epi-TC-DOC y en proteínas solubles en el caso del epi-TC-Nativo. Particularmente, en función de la movilidad electroforética en condiciones desnaturalizantes, los componentes proteicos de los lisados DOC y Nativos de Dm28c (Figura 17A), TcvT-1 (Figura 17B) y Esmeradlo CL3 (Figura 17C) se asemejaron mucho entre sí, mientras que los de Sylvio X10 (Figura 17D) y Arse (Figura 17E) parecieron similares.

Por otro lado, la marcación de carbohidratos resultó en una tinción tenue del lisado, diferenciándose los perfiles de los lisados DOC y Nativos. En los lisados DOC, se pudo observar en todas las cepas un perfil de doble banda definido con una movilidad electroforética de entre 30 y 35 kDa, variando la intensidad en la tinción de las mismas entre las diferentes cepas. Además, se observaron dos bandas muy tenues de peso molecular aproximado de 50 kDa. Por otra parte, en los lisados Nativos se apreció un patrón diferente, con una banda tenue y difusa con un peso molecular en el entorno de los 50 kDa y para algunas cepas también se observa la presencia de la banda 30 kDa observada en el otro tipo de lisado. El tamaño de estas bandas nos hace pensar que podría tratarse de mucinas, ya que se ha reportado que en el estadio epimastigota migran en electroforesis como una doble banda de entre 35 y 50 kDa ³⁹. En este sentido, podemos decir que los lisados DOC probablemente estén enriquecidos en mucinas, mientras que los lisados nativos presentan una composición diferente, con una menor proporción de proteínas glicosiladas.

Cabe destacar que el patrón de bandas luego de la tinción específica para carbohidratos fue muy diferente al que se observó con tinción de las proteínas totales, donde las bandas mayoritarias observadas con Coomassie no se detectaron con la tinción de carbohidratos. Este aspecto refuerza la selectividad de cada tinción y destaca la presencia de algunas proteínas glicosiladas dentro de la gran variedad de proteínas presentes en ambos lisados.

[Reconocimiento del lisado epi-TC-DOC Dm28c por lectinas](#)

Para comenzar con el análisis de los motivos carbohidratos presentes en los lisados de *T. cruzi* utilizamos una técnica basada en el reconocimiento de lectinas. Este método tiene la ventaja de que

puede ser realizado como un ELISA estándar, ya que permite la detección y cuantificación relativa de las unidades de carbohidratos de superficie específicas. Este ensayo tiene como principio el reconocimiento por una lectina de los motivos de carbohidratos específicos presentes en glicoproteínas adsorbidas sobre una placa. Este reconocimiento es luego evidenciado por una reacción enzimática que da como producto un compuesto cromogénico, el cual es cuantificado por su absorbancia a una longitud de onda determinada. Una de las limitaciones de este ensayo es la capacidad que tienen algunas lectinas de reconocer más de un motivo carbohidrato. Por tanto, el reconocimiento del lisado por una lectina debe interpretarse con precaución. Por dicho motivo es necesario realizar este análisis con más de una lectina, o en algunos casos con un método complementario ¹⁶⁴.

En los inicios de este trabajo contamos exclusivamente con lisados de *T. cruzi* realizados con DOC (epi-TC-DOC) de la cepa Dm28c, ya que es la cepa con la cual se contaba en nuestro laboratorio y la que fue utilizada en nuestros antecedentes. Luego de haber realizado la caracterización inicial del lisado y de confirmar su unión a los TLRs murinos 1/2 y 4, nos propusimos explorar los motivos de carbohidratos presentes en este lisado. En la Figura 18 se muestra el reconocimiento por un amplio panel de lectinas del lisado epi-TC-DOC.

En primer lugar, se resalta el fuerte reconocimiento por parte de la lectina **ConA** (Concavalina A)¹⁵⁹, donde aún en la concentración más diluida utilizada se sigue apreciando una unión considerable a componentes de epi-TC-DOC. Esta lectina presenta unión preferencial a manosa, glucosa y derivados. Además, también se detectó reconocimiento por parte de la lectina **NPA** (*Narcissus pseudonarcissus* lectin)¹⁶⁵, que une específicamente residuos de α -Manosa. En conjunto, estos resultados sugieren fuertemente la presencia de motivos que contienen α -Manosas y Glucosas en el lisado epi-TC-DOC.

Por otro lado, la lectina **PNA** (Lectin from *Arachis hypogaea*)¹⁶⁰ reconoció fuertemente al lisado a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esta lectina se une a motivos carbohidratos Gal- β (1-3)-GalNAc. Conjuntamente se aprecia un reconocimiento alto por parte de la lectina **ECA** (Lectin from *Erythrina cristagalli*)¹⁶², que tiene afinidad por D-galactósidos en general, pero más específicamente por Gal- β (1-4)-GlcNAc. Ambos resultados sugieren la presencia de Galactosas terminales unidas por un enlace β .

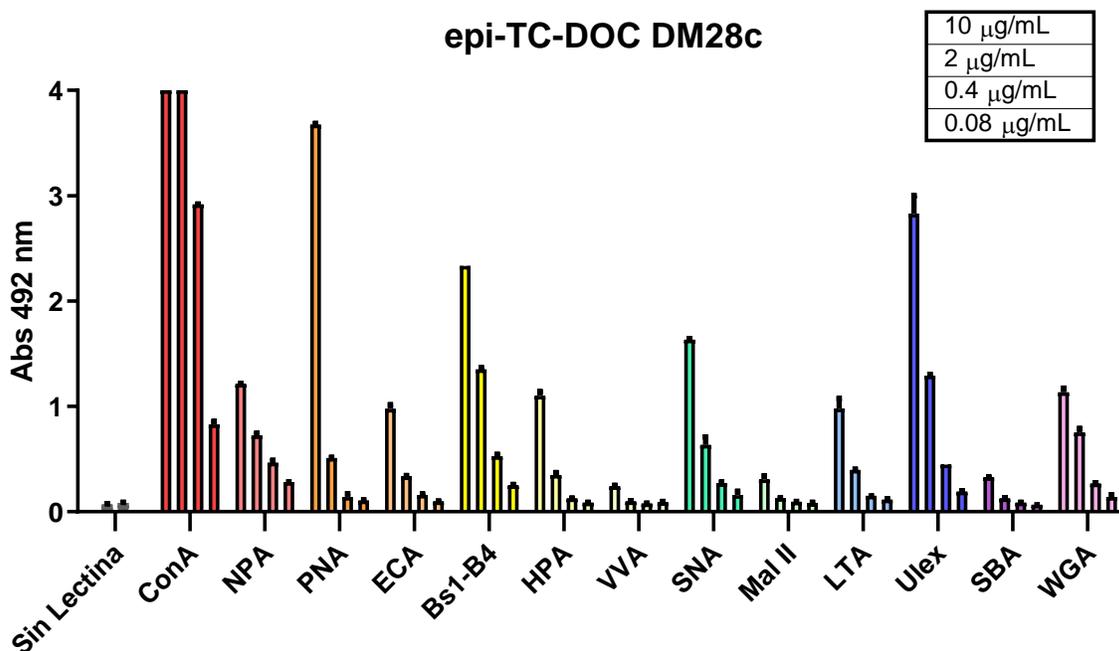


Figura 18. ELLA de epi-TC-DOC Dm28c. Placas sensibilizadas con 1 $\mu\text{g/pocillo}$ de lisado epi-TC fueron incubadas con diferentes lectinas biotiniladas y Posteriormente con estreptavidina-HRP. La reactividad de la lectina se reveló con OPD. Para cada lectina se utilizaron diluciones seriadas de la misma, según el cuadro superior derecho. Cada barra corresponde a una dilución de la lectina, siendo la más concentrada la que está a la izquierda y la más diluida a la derecha.

Por otra parte, la lectina **BS1-B4** (Lectin from *Bandeiraea simplicifolia*)¹⁶⁶ también reconoció al lisado con una afinidad considerable. Esta presenta una afinidad principal por residuos de α -D-galactosa terminales, así como también, en menor medida, por residuos de *N*-acetil- α -D-galactosamina terminales. Además, también se observa que la lectina **HPA** (Lectin from *Helix pomatia*)¹⁶², cuya especificidad principal son residuos de *N*-acetilgalactosamina terminales, también reconoció al lisado epi-TC-DOC a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$. Estos resultados indicarían la presencia de motivos GalNAc en el lisado parasitario. Sin embargo, llama la atención el bajo reconocimiento por la lectina **VVA** (*Vicia Villosa* Lectin)¹⁶², cuya especificidad principal es por la estructura Tn (un único residuo de α -*N*-acetilgalactosamina unido a serina o treonina en la cadena polipeptídica). Se ha asociado al disacárido Gal α -(1-3)-GalNAc con la falta de reconocimiento por esta lectina¹⁶⁷. Esta evidencia junto con el alto reconocimiento por parte de la lectina BS1-B4, podrían estar indicando la presencia de galactosas terminales, posiblemente unidas por enlaces α .

Respecto al reconocimiento por la lectina **SNA** (*Sambucus Nigra* Lectin)¹⁶², que se une preferentemente a ácido siálico unido a galactosas terminales por un enlace α -(2-6), se pudo apreciar

que este fue considerable. Sin embargo, no se observó este comportamiento con la lectina **MAL II** (*Maackia Amurensis* Lectin II)¹⁶⁸ que es capaz de unirse al ácido siálico unido por un enlace α -(2-3). Con estos resultados se concluye que puede haber motivos sialilados, específicamente con enlaces α -(2,6) pero no con enlaces α -(2,3).

Continuando con el análisis de lectinas, **LTA** (*Lotus tetragonolobus* lectin)¹⁶² reconoce específicamente oligosacáridos que contienen α -L-fucosas. Pudimos observar un reconocimiento moderado del lisado por la misma. Las propiedades de unión de esta lectina parecen ser similares a las de la **Ulex** (*Ulex europaeus* lectin I)¹⁵⁹. Sin embargo, el reconocimiento del lisado por Ulex es mayor al de la LTA, ya que sigue reconociendo al lisado incluso a bajas concentraciones. Esta lectina reacciona fuertemente con los residuos de fucosa unidos por enlaces α -(1-2), pero poco o nada con fucosas unidas por enlaces α -(1-3) o α -(1-6). Por otra parte, Ulex es incapaz de unirse a fucosas internas. Por lo tanto, estos resultados sugieren la presencia de fucosas presentes en los glicanos del lisado epi-TC-DOC, preferentemente unidas por enlaces α -(1-2).

La lectina **SBA** (Soybean Agglutinin)¹⁶⁹ no presentó un reconocimiento considerable del lisado. Esta lectina se une preferentemente a estructuras de oligosacáridos con α o β *N*-acetilgalactosamina terminal y, en menor grado, a residuos de galactosa. Se podría pensar entonces que debería presentar un patrón de reconocimiento similar a HPA o BS1-B4. Sin embargo, se ha reportado que la unión de esta lectina se puede bloquear mediante modificaciones en los penúltimos azúcares, como fucosa unida a la penúltima galactosa en la estructura del grupo sanguíneo B¹⁶⁹. Como se ha mencionado anteriormente, el reconocimiento por Ulex y LTA sugieren fuertemente la presencia de fucosas, por lo que en este caso podría estar dándose este fenómeno.

Finalmente, la lectina **WGA** (Wheatgerm Agglutinin)¹⁶² presentó un reconocimiento moderado por el lisado a una concentración de 10 μ g/mL. Esta lectina reconoce motivos carbohidratos de GlcNAc. Por otra parte, se ha reportado que también reconoce motivos de ácido siálico, por lo cual este reconocimiento podría deberse a la presencia de cualquiera de estos dos motivos¹⁷⁰.

Variabilidad de los motivos carbohidratos del lisado epi-TC-DOC de Dm28c

En el transcurso de este trabajo se utilizaron lisados de *T. cruzi* provenientes de la cepa Dm28c preparados en diferentes fechas, ya que es de gran importancia poder trabajar con material fresco. Además, hemos comprobado que la concentración proteica de nuestras muestras va disminuyendo

progresivamente con el transcurso del tiempo, lo cual refuerza nuestra necesidad de utilizarlas en un periodo no mayor a 4 meses. Por estos motivos hemos trabajado con diferentes lotes de lisados, los cuales han sido analizados por reconocimiento de lectinas (ELLA) para confirmar la consistencia en la presencia de los motivos carbohidratos mencionados anteriormente.

En la Figura 19 se ilustra el reconocimiento por parte de un amplio panel de lectinas con el fin de comparar los perfiles de reconocimiento de diferentes lotes sucesivos. En primer lugar, podemos observar que hubo patrones conservados de reconocimiento, mientras que otros son más variables dependiendo del lote. Entre los patrones conservados, se destacan el alto reconocimiento por parte de ConA y PNA, así como también la falta de reconocimiento por VVA, SBA y MAL II. Entre las lectinas que muestran algunas variaciones observamos a Ulex y LTA, las cuales reconocen α -Fucosas. Se puede ver que, aunque se ha reportado que el reconocimiento por parte de estas lectinas es similar, en algunos lotes se presentan patrones inversos de reconocimiento. Por ejemplo, en el lote F, Ulex reconoce muy poco mientras que LTA muestra una gran reactividad. Por el contrario, en el lote G, se aprecia un patrón inverso. Otras lectinas que también reconocen de forma variable en los diferentes lotes de epi-TC-DOC son ECA y BS1-B4, ambas con afinidad hacia Galactosas unidas por enlaces β o α , respectivamente. Observamos una tendencia similar en el reconocimiento de estas dos lectinas, es decir, que en un mismo lote suben ambos o bajan ambos. Por otra parte, la lectina SNA, que reconoce ácido siálico unido por enlaces α -(2,6), presentó una variabilidad considerable en su reconocimiento del lisado. En ese sentido, la presencia de ácidos siálicos en las estructuras externas de *T. cruzi* en estadio epimastigota es un aspecto interesante, ya que se ha reportado en la bibliografía que esta modificación ocurre por variaciones en la expresión de las enzimas trans-sialidasas en cultivos de parásitos, dependiendo de la fase de crecimiento en la que se encuentren ¹⁷¹. En ese sentido, se ha reportado que los epimastigotas en fase logarítmica expresan poca o ninguna actividad trans-sialidasa, por lo que son incapaces de incorporar ácido siálico exógeno. La transialidasa comienza a expresarse en la fase logarítmica tardía, con una actividad específica que aumenta de manera constante a medida que el cultivo alcanza la fase estacionaria. Esto podría explicar el reconocimiento variable de SNA de los diferentes lotes, ya que variaciones en la fase de crecimiento del cultivo al momento de realizar el lisado podría conllevar a cambios en la expresión de las trans-sialidasas, determinando niveles variables de ácido siálico en el lisado.

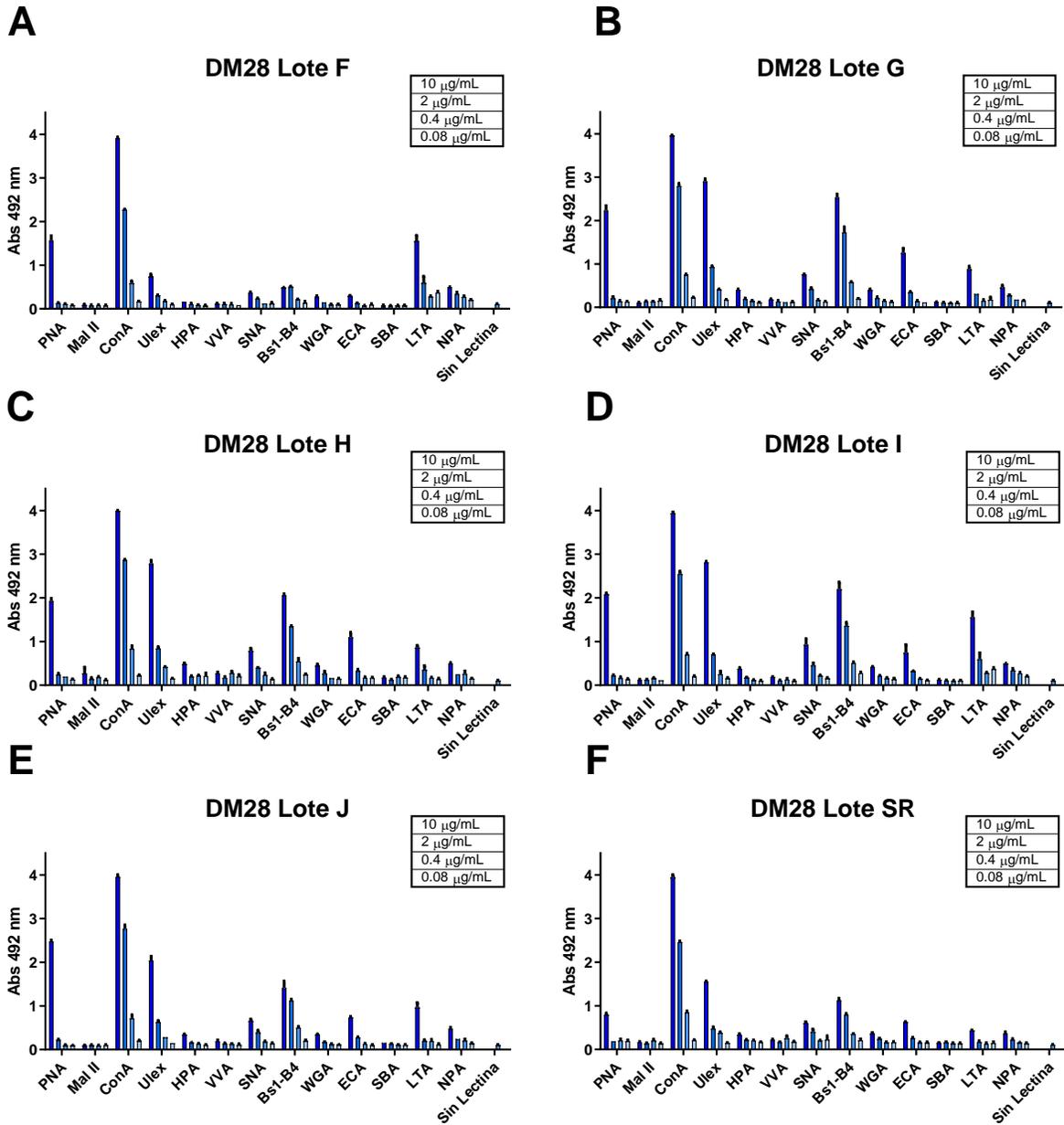


Figura 19. Reconocimiento de motivos carbohidratos por lectinas en diferentes lotes de epi-TC-DOC Dm28c. Placas sensibilizadas con 1 µg/pocillo de lisado epi-TC fueron incubadas con diferentes lectinas biotiniladas y Posteriormente con estreptavidina-HRP. La reactividad de la lectina se reveló con OPD. Para cada lectina se utilizaron diluciones seriadas de la misma, según el cuadro superior derecho. Cada barra corresponde a una dilución de la lectina, siendo la más concentrada la que está a la izquierda y la más diluida a la derecha.

Reconocimiento de los lisados epi-TC-DOC y epi-TC-Nativo de las cepas Sylvio, Esmeraldo, Arse, TcvT-1 y Dm28c por lectinas

Como fue discutido anteriormente, en los inicios de este trabajo se comenzó con el análisis exclusivamente de la cepa Dm28c. Posteriormente se adquirieron las cepas Sylvio X10, Esmeraldo, Arse y TcvT-1, que forman parte de diferentes grupos de cepas de *T. cruzi* y presentan diferentes características en su capacidad infectiva ¹⁵. Por otra parte, cuando se incorporaron las líneas celulares HEK-Blue, se comenzó a trabajar con lisados nativos, que demostraron una buena compatibilidad con el sistema de detección de la activación de TLRs que presentan estas líneas celulares, a diferencia de los lisados preparados con DOC. Por estas razones se realizó un extensivo análisis de las características de estos lisados, para comparar sus similitudes y diferencias a nivel de carbohidratos y de perfiles electroforéticos.

Primeramente, se realizaron análisis de reconocimiento por lectinas con lisados tanto Nativos como DOC provenientes de todas las cepas, de forma de comparar los perfiles con los encontrados en los lisados epi-TC-DOC de Dm28c.

En la Figura 20 se muestran los ensayos de ELLA de reconocimiento de lisados de las cepas Sylvio, Esmeraldo, Arse, TcvT-1 y Dm28c, tanto para los lisados preparados en condiciones desnaturalizantes (DOC) como nativos (Nativos). Es importante destacar que estos lisados fueron realizados en paralelo, por lo cual las condiciones de cultivo fueron las mismas en todos los casos. Este aspecto permite mitigar el fenómeno de la variabilidad entre lotes a lo largo del tiempo, que como fue comentado en el resultado de variabilidad entre diferentes lotes de *T. cruzi*, es un aspecto que influye directamente en la composición de carbohidratos parasitarios.

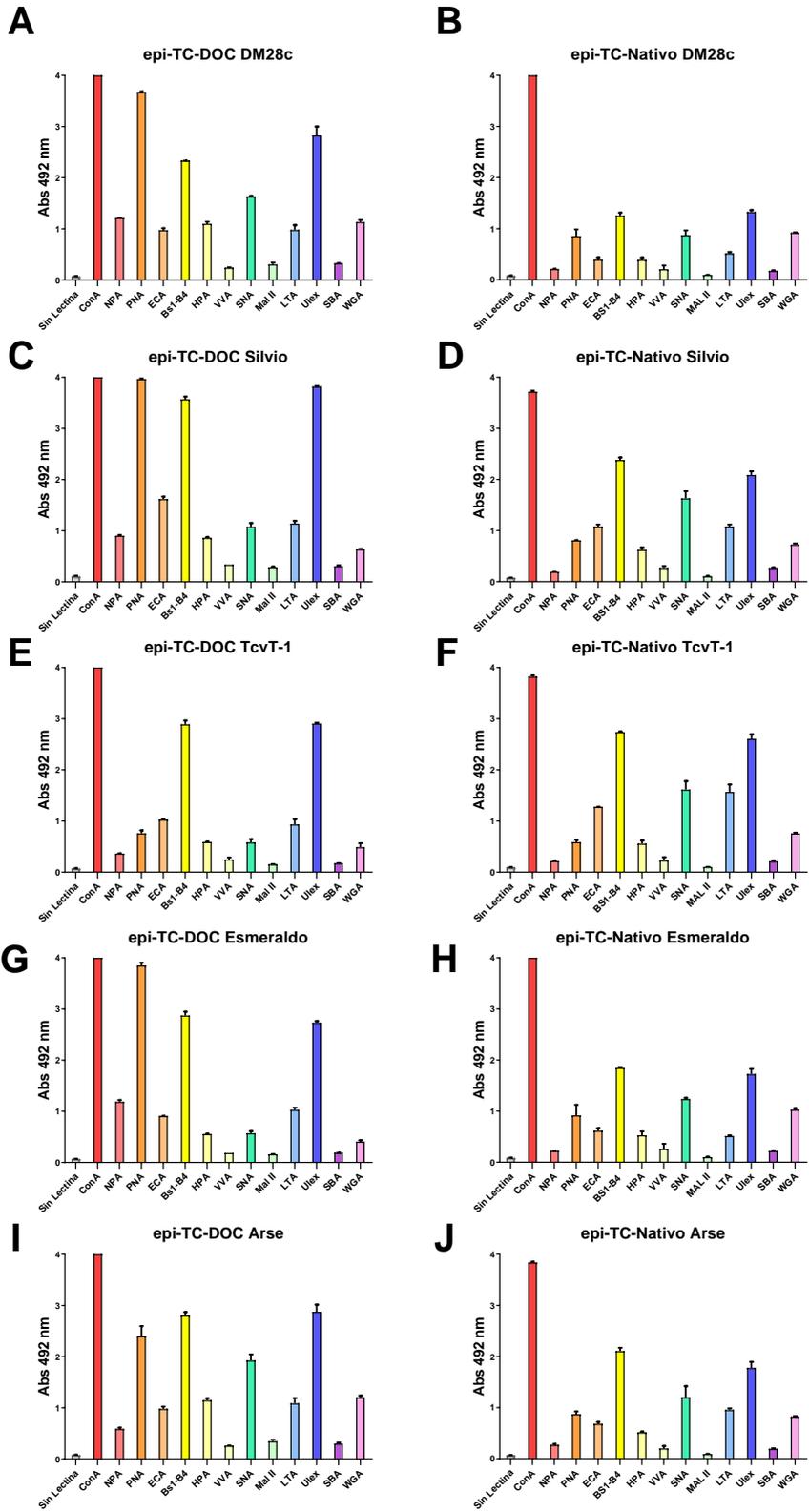


Figura 20. ELLA de lisados epi-TC-DOC y epi-TC-Nativo provenientes de diferentes cepas de *T. cruzi*. Placas sensibilizadas con 1 µg/pocillo de lisado epi-TC fueron incubadas con diferentes lectinas biotiniladas y Posteriormente con estreptavidina-HRP. La reactividad de la lectina se reveló con OPD. Todas las lectinas se utilizaron a una concentración de 10 µg/mL

Reconocimiento de los lisados parasitarios por ConA.

A continuación, se propuso profundizar en la detección de los motivos carbohidratos reconocidos por ConA, ya que se trata de la lectina que presentó un mayor y constante reconocimiento de los componentes presentes en el lisado parasitario. Además, para mejorar la sensibilidad en la tinción de glicoproteínas mostradas en la Figura 17, se realizaron ensayos de *Lectin Blot* utilizando ConA (Figura 21).

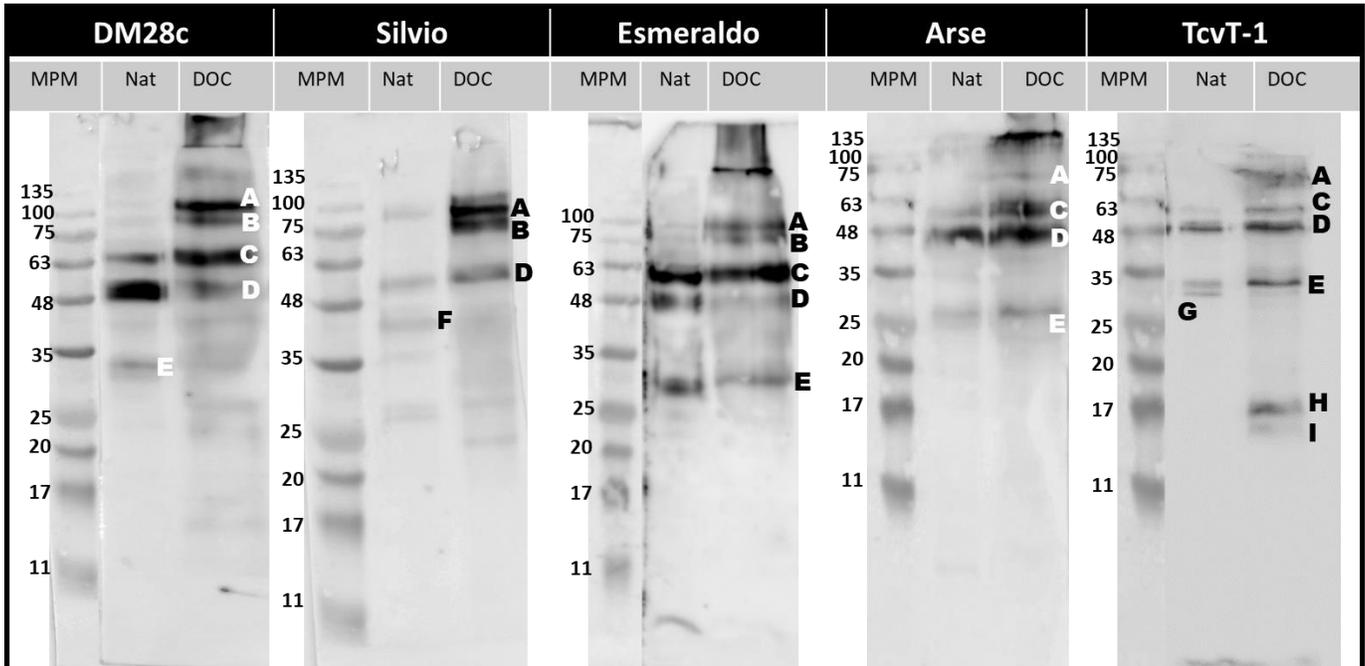


Figura 21. Lectin Blot de lisados epi-TC-DOC (DOC) y epi-TC-Nativos (Nat) con ConA. Las bandas que presentan pesos moleculares similares fueron marcadas con la misma letra. MPM: Marcador de peso molecular.

En estos *Lectin Blot* podemos observar, en primer lugar, que existe una variedad de componentes reconocidos por ConA, es decir que están potencialmente α -manosilados. Además, la sensibilidad fue mayor que con la tinción genérica de carbohidratos, lo que permite profundizar en los posibles componentes glicosilados que podrían ser reconocidos por el sistema inmune innato. En todos los casos, pudimos distinguir que estas bandas reconocidas por ConA tienen un peso molecular aparente comprendido entre 25 y 100 kDa, por lo que se trata de proteínas relativamente pequeñas, o multiméricas compuestas por monómeros de bajo peso molecular. Por otra parte, y al igual que en el análisis de las proteínas y glicoproteínas totales, el patrón de reconocimiento por ConA de los componentes parasitarios presentes en los lisados DOC fue considerablemente diferente al de los lisados

Nativos. Con el objetivo de simplificar el análisis de este resultado, las bandas repetidas se marcaron con la misma letra (A-I, según su peso molecular).

Comenzando con la cepa Dm28c, pudimos ver una mayor cantidad de componentes reconocidos por ConA en el lisado DOC, donde se distinguieron 4 bandas claras y otras más difusas. Dentro de las bandas más prominentes, las bandas A y B (~120 y ~100 kDa) se identificaron exclusivamente en el lisado DOC, mientras que la banda C (~63 kDa), además de estar presente en el lisado epi-TC-DOC, también se identificó, aunque más tenuemente, en el lisado epi-TC-Nativo. Con la banda D (~50 kDa) se dio la situación contraria, una marcación moderada en epi-TC-DOC y bien marcada en epi-TC-Nativo. Además, en el lisado nativo se observó una quinta banda E (~30 kDa) ya que en el epi-TC-DOC los componentes menores a 48 kDa presentaron un patrón menos definido.

Por otra parte, la cepa Sylvio X10 presentó un patrón similar al de Dm28c, con una doble banda A-B bien marcada en DOC y prácticamente ausente en el lisado nativo, aunque se pueden observar indicios de la banda A. Sin embargo, la banda C no se detectó en esta cepa. La banda D presentó un comportamiento inverso que en Dm28c, con más prominencia en DOC que en Nativo. Por otra parte, la banda F (~40 kDa) se encontró exclusivamente en el lisado Nativo. Por último, a pesos moleculares menores de 17 kDa tanto en los lisados DOC como en Nativo se identificaron componentes difusos.

La cepa Esmeraldo CL3, por su parte, presentó un patrón de componentes reactivos con la ConA similares a los presentes en el lisado proveniente de la cepa Dm28c. Comenzando con los componentes de peso molecular mayor, las bandas A y B se detectaron únicamente en el lisado DOC. Por otra parte, la banda C se observó fuertemente marcada en los dos lisados parasitarios, por lo que parece ser un componente común a ambos en esta cepa. La banda D también se pudo detectar en ambos lisados, pero con una marcación más intensa en el Nativo al igual que en Dm28c. Finalmente, observamos una quinta banda E, también presente en ambos lisados, con predominancia en el lisado Nativo.

Por otro lado, la cepa Arse presentó una sola banda definida de alto peso molecular marcada como A, con una marcación bastante tenue. A pesos moleculares menores se observó la banda C, con mayor marcación en el lisado DOC y la banda D, que aparenta ser similar en ambos lisados. Además, se apreció la banda E en el lisado DOC, que estaría menos representada en el lisado Nativo.

Finalmente, para la cepa TcvT-1 se observó un perfil de marcación diferente con respecto a las otras cepas. En primer lugar, el componente A está presente en el lisado DOC pero se visualizó difuso, posiblemente debido a una mala transferencia de las proteínas de alto peso molecular, por lo que no se

pudo definir si corresponde a una sola banda o a dos como en el resto de las cepas. Luego, los componentes C, D y E también se detectaron en ambos lisados, pero más marcados en el lisado DOC. Por otra parte, el componente G estuvo presente exclusivamente en el lisado Nativo. Finalmente, se observaron dos bandas de bajo peso molecular bien marcadas exclusivamente en el lisado DOC, denominadas H e I. Estas bandas parecen estar únicamente presentes en esta cepa parasitaria, ya que, si bien en el resto de las cepas se observaron bandas de bajo peso molecular, ninguna presentó la definición observada en este caso.

En conjunto, estos resultados permiten concluir que se observan ligandos de ConA de movilidad electroforética similar en todas las cepas parasitarias estudiadas. En primer lugar, encontramos uno o dos componentes (dependiendo de la cepa) posiblemente manosiados de aproximadamente 100 kDa, que se encuentran presentes casi con exclusividad en el lisado DOC. Luego en la región de los 63 kDa se observa un componente que está en todas las cepas menos en Sylvio X10, algo más marcado en el lisado DOC que en el Nativo. Luego, observamos marcación en el entorno de los 48 kDa en los lisados Nativos y DOC y en todas las cepas. El predominio de este componente en los lisados DOC o Nativos depende de la cepa analizada. También encontramos un componente de entre 25 y 35 kDa, que predomina en los lisados Nativos o DOC, también dependiendo de la cepa. Finalmente, los componentes denominados F, H e I aparecen en cepas particulares. En todos los casos aparecen como manchas difusas de bajo peso molecular, fundamentalmente en los lisados DOC. No se detectaron componentes manosiados menores a 25 kDa salvo en la cepa TcvT-1.

En conclusión y a modo de resumen, los resultados presentados en esta sección sugieren que:

- 1- Debido a su reactividad con lectinas, los lisados poseen motivos carbohidratos que contienen Manosa, Galactosa, Fucosa, Ácido Siálico y posiblemente *N*-acetilglucosamina.
- 2- Los motivos carbohidratos presentes en los lisados parasitarios varían entre lotes. Esto ya ha sido reportado previamente ^{172,173}. Sin embargo, en todas las cepas y en todos los lotes la reactividad de la lectina ConA es indiscutible, así como la ausencia de reactividad de la lectina MAL II.
- 3- La tinción de carbohidratos permitió la detección de componentes discretos glicosilados mientras que en el *Lectin Blot* con ConA observamos una variedad mayor de componentes reactivos con esta lectina. Esta disparidad posiblemente se deba a diferencias en la sensibilidad de cada método.

- 4- Algunos de los componentes glicosilados detectados podrían corresponder a mucinas, con una mayor representación en los lisados epi-TC-DOC.
- 5- La reactividad de las lectinas ECA, PNA y SNA fue variable, lo que podría sugerir que el contenido en galactosas unidas por enlaces beta y la presencia de ácido siálico varía entre lotes y cepas parasitarias.
- 6- Existen componentes reactivos con ConA que están presentes en las diferentes cepas parasitarias analizadas, pero su presencia depende de las condiciones (desnaturalizantes o nativas) de la preparación del lisado. Estos componentes, especialmente aquellos entre 35 y 50 kDa (C, D, E y F) podrían corresponder a mucinas parasitarias.

3- Deglicosilación específica del lisado parasitario mediante el uso de glicosidasas inmovilizadas

Los glicanos que forman parte de las glicoproteínas y los glicolípidos participan en importantes procesos biológicos tanto a nivel estructural como funcional ¹⁰⁹. Muchos de estos procesos se encuentran mediados por interacciones proteína-carbohidrato que en muchos casos involucra la unión de una glicoproteína a un receptor. En la primera sección de este capítulo se evaluó la unión receptor-ligando para lisados epi-TC-DOC y epi-TC-Nativo de 5 cepas de *T. cruzi*, observando que se generaba la activación de algunos receptores de la inmunidad innata específicos, los TLRs. Nuestra hipótesis sostiene que esta interacción puede estar dada por la presencia de motivos carbohidratos en los lisados parasitarios. Con el objetivo de verificar e identificar los arreglos glucídicos que eventualmente participarían de la interacción ligando-receptor, propusimos una estrategia de remoción selectiva de glicanos mediante procesos de deglicosilación enzimática utilizando glicosidasas inmovilizadas. Las glicosidasas inmovilizadas constituyen una herramienta biotecnológica de gran utilidad para la elucidación del rol biológico de los glicanos ya que permiten la remoción selectiva de carbohidratos de las glicoproteínas sin alterar su estructura proteica ¹¹⁶⁻¹¹⁸. En este caso, se realizó la deglicosilación selectiva de los lisados de *T. cruzi* utilizando una batería de glicosidasas inmovilizadas y posteriormente se evaluó si los lisados deglicosilados perdían la capacidad de activar los receptores de tipo TLR. Esto confirmaría la participación de estructuras de tipo carbohidrato en la interacción con el receptor y daría indicios de la identidad de los carbohidratos involucrados. A su vez, al encontrarse las enzimas inmovilizadas, pueden ser removidas fácilmente del medio de reacción luego del proceso de deglicosilación por un simple paso de filtración, centrifugación o utilizando una gradilla imantada, dependiendo del soporte al que se encuentre unido la enzima. Este aspecto es fundamental ya que evita que la glicosidasa interfiera en ensayos posteriores realizados con el lisado depletado de glicanos. Esto tiene gran relevancia debido a que las glicosidasas también pueden estar glicosiladas. Además, trabajar con enzimas inmovilizadas tiene ventajas adicionales como por ejemplo: una mayor estabilidad de la actividad catalítica y la posibilidad de reutilizarlas conservando alta actividad enzimática.

Dado que algunos de los lisados parasitarios fueron capaces de activar los receptores hTLR4 y mTLRs 4 y el hTLR2, se procedió a su deglicosilación con una batería de glicosidasas inmovilizadas para la remoción selectiva de glicanos. De esta forma se generaron una serie de lisados depletados de glicanos, los que fueron utilizados posteriormente en ensayos *in vitro* para evaluar su capacidad activadora de los

receptores TLRs previamente seleccionados. Se espera evidenciar una disminución en la activación de estos receptores de la inmunidad innata cuando se hayan removido azúcares presentes en los ligandos parasitarios que participen en este reconocimiento.

Estabilidad del lisado de *T. cruzi* a 37°C

Teniendo en cuenta los siguientes factores: i) La actividad óptima de las glicosidasas a utilizar es de 37°C o superior; ii), al trabajar con enzimas inmovilizadas es recomendable trabajar bajo agitación suave de forma de minimizar los efectos difusionales iii) se debe trabajar en condiciones que sean compatibles con la estabilidad del lisado parasitario iv) se busca alcanzar un buen grado de deglicosilación, se propone realizar las deglicosilaciones a 37°C bajo agitación suave durante 24 hs. Por lo tanto, se verificó la estabilidad del lisado parasitario en esas condiciones (Figura 22).

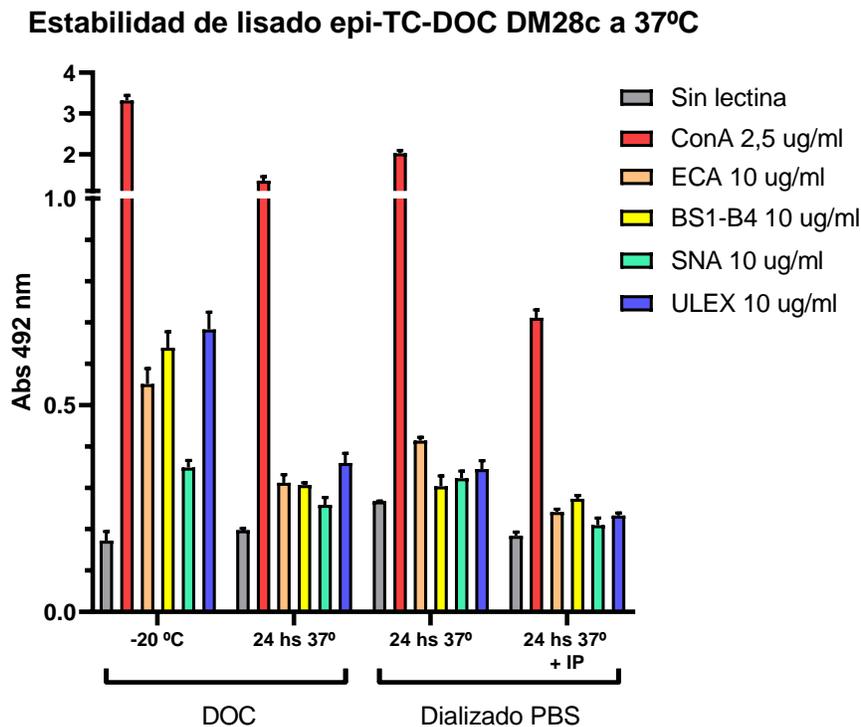


Figura 22. ELLA de lisado epi-TC-DOC incubado a 37°C por 24 horas con agitación. Se muestran las condiciones de temperatura y tiempo a las cuales se incubó el lisado. A la izquierda: lisado sin dializar (DOC). A la derecha: lisado dializado en PBS. IP: Inhibidor de proteasas. Placas sensibilizadas con 1 µg/pocillo de lisado epi-TC fueron incubadas con diferentes lectinas biotiniladas y posteriormente con estreptavidina-HRP. La reactividad de la lectina se reveló con OPD. Para cada lectina se utilizaron diluciones seriadas de la misma, según el cuadro superior derecho. Cada barra corresponde a una dilución de la lectina, siendo la más concentrada la que está a la izquierda y la más diluida a la derecha.

Como se muestra en la Figura 22, el lisado almacenado en freezer a -20°C conservó el reconocimiento por parte de las lectinas. Por otro lado, al incubar los lisados a 37°C se pudo notar que, si bien desciende el reconocimiento por las lectinas, esto no ocurre de forma absoluta, por lo que se concluye que el lisado mantiene el mismo perfil de reconocimiento por las lectinas en las condiciones de deglicosilación propuestas tanto luego de ser dializado como sin dializar.

Inmovilización de Glicosidasas

Nuestro grupo de investigación ya disponía de las siguientes glicosidasas inmovilizadas: PNGasa F de *Elithabethkingia miricola* inmovilizada sobre nanopartículas magnéticas y β -Galactosidasa de *Aspergillus oryzae*, Neuraminidasa de *Clostridium perfringens* y α -manosidasa de *Canavalia Ensiformis* inmovilizadas sobre agarosa. Sin embargo, dado que el pH óptimo de esta última es de 4,5 y que esta condición genera la precipitación del lisado parasitario, en el marco de esta tesis se procedió a la inmovilización de la α -manosidasa de *Bacterioides Thetaiotaomicron* sobre agarosa. Por otra parte, se inmovilizó una α -fucosidasa de *Homo sapiens* sobre agarosa y PNGasa F de *Elithabethkingia miricola* sobre nanopartículas de sílica. Si bien ya se disponía de PNGasa F inmovilizada sobre nanopartículas magnéticas, durante el transcurso de esta maestría se discontinuó la comercialización de las nanopartículas utilizadas para la inmovilización de la PNGasa F y por ello se utilizaron las nanopartículas de sílica como soporte alternativo.

Existen diferentes soportes y estrategias disponibles para la inmovilización de enzimas. En nuestro caso, se utilizaron tres soportes que presentan características diferentes:

- Agarosa, un polímero macroporoso natural con un tamaño de partícula de 45-165 μm , tradicionalmente usado en la inmovilización de proteínas y con el cual nuestro laboratorio posee amplia experiencia.^{116,118,126}
- SIMAG-hidroxil, nanopartículas magnéticas con propiedades superparamagnéticas o ferromagnéticas recubiertas por una superficie de sílica no porosa. Dado que se encuentran funcionalizadas con grupos hidroxilo, las mismas pueden ser activadas utilizando agentes cianilantes como el CDAP. Al estar recubiertas de un material no poroso y tener un pequeño tamaño de partícula (500 nm) presentan una gran área superficial en relación a su volumen,

permitiendo una mayor capacidad de carga y minimizando las limitaciones difusionales, que es clave cuando se trabaja con sustratos macromoleculares como glicoproteínas. A su vez, su tamaño reducido hace pensar que la enzima inmovilizada presentará un comportamiento más similar a la enzima soluble facilitando el acceso al sitio activo de sustratos macromoleculares ^{117,129,130,174}.

- Nanopartículas de sílica hidrofílicas, química y físicamente estables. Las mismas pueden ser sólidas, no porosas o mesoporosas. Su estructura, tamaño de partícula, estabilidad y porosidad dependen de los parámetros de síntesis. Las mismas son fáciles de funcionalizar ya que poseen grupos silanol en su superficie (Si-OH), por lo que pueden ser activadas con agentes cianilantes ^{133,134}.

Se utilizó una estrategia de inmovilización covalente, basada en la formación de enlaces tipo isourea entre grupos cianato-éster presentes en el soporte activado y grupos amino expuestos en las enzimas utilizadas. Los soportes, fueron activados usando el agente cianilante 1-ciano 4-dimetil amino piridinio tetrafluoro borato (CDAP) (Figura 9). Este método de activación es una alternativa menos tóxica a la tradicional activación con bromuro de cianógeno. La activación de soportes de agarosa con CDAP ya ha sido previamente descrita por nuestro grupo de investigación ^{116-118,126}, pero no ha sido utilizada hasta el momento para la activación de nanopartículas de sílica.

A continuación, se muestra en la Tabla 5 los resultados correspondientes a la inmovilización de las enzimas PNGasa F de *E. miricola* sobre nanopartículas de sílica y α -manosidasa de *B. Thetaomicron* y α -fucosidasa de *Homo sapiens* sobre agarosa.

Tabla 5. Inmovilización de glicosidasas

Enzima	Actividad Aplicada (UE/g)	Actividad Inmovilizada (UE/g)	Actividad Expresada ^(a) (%)	Proteína aplicada (mg/g)	Proteína Inmovilizada ^(b) (mg/g)	Rendimiento Inmovilización ^(c) (%)
PNGasa	654.5 ± 1.5	48.6 ± 1.5	7.4 ± 0.2	ND	ND	79.0 ± 2.6
Manosidasa	28,4 ± 0,6	11,8 ± 0,8	41.6 ± 3.8	10,6 ± 0,3	4,2 ± 0,3	39,6 ± 1,6
Fucosidasa	93,8 ± 3.7	36.9 ± 3.7	39.4 ± 5.5	3,8 ± 0,4	3,1 ± 0,2	82.1 ± 2.6

(a) Actividad expresada (%) = (UE/g determinadas en el soporte /UE/g aplicadas) x 100

(b) Proteína inmovilizada (mg/g) = (mg prot aplicada – mg prot recuperada en el sobrenadante) x 100/mg prot aplicada

(c) Rendimiento de inmovilización = (mg prot inmovilizada/mg prot aplicada) x 100 para α -manosidasa y α -fucosidasa y en el caso de la PNGasa Rendimiento de inmovilización = (UE aplicadas - UE recuperadas en el sobrenadante) x 100/UE aplicadas.

ND: No determinado

Como se puede observar en la Tabla 5, para todas las enzimas se evaluaron rendimientos de inmovilización y porcentaje de actividad expresada. El rendimiento de inmovilización para α -manosidasa y α -fucosidasa se evaluó cuantificando los mg de proteína ofrecidos al soporte y los que permanecieron en el sobrenadante, y así por diferencia se pudo determinar el porcentaje de proteína inmovilizada. Por otro lado, la medida de actividad enzimática obtenida directamente en el soporte permite determinar qué porcentaje de la enzima inmovilizada se encuentra activa. En el caso de PNGasa F, la concentración de proteína en la solución de enzima que se incubó con las nanopartículas fue muy baja por lo no se pudo cuantificar la concentración de proteína. Esto se debe a que las nanopartículas deben ser incubadas en un volumen suficiente para mantenerse dispersas y evitar su agregación, por lo cual, se debe diluir la enzima aplicada. Como la PNGasa F tiene una actividad específica muy alta esto lleva a que la concentración final de proteínas en la solución inicial no sea detectable por los métodos disponibles. En este caso el rendimiento de inmovilización se calculó por diferencia entre las unidades de enzimas aplicadas al soporte y las recuperadas en el sobrenadante.

Cuando se inmovilizó la α -manosidasa se obtuvieron rendimientos de inmovilización y porcentajes de actividad expresada del orden de 40%, indicando que toda la enzima que se inmovilizó lo hizo en forma activa. El bajo porcentaje de inmovilización seguramente se podría deber a la saturación de la capacidad del soporte. Por otro lado, los rendimientos de inmovilización de PNGasa F y de α -fucosidasa fueron del orden del 80 %, sin embargo, en ambas se observaron porcentajes de actividad

expresada menores (7,4 y 39,4%, respectivamente). Esto pudo deberse a la inactivación parcial de la enzima durante el proceso de inmovilización debido a distorsiones en el sitio activo o bien a problemas difusionales, ya que el sitio activo puede quedar parcialmente ocluido, dificultando el acceso de la enzima al soporte. Si bien llama la atención el bajo porcentaje de inmovilización en el caso de la PNGasa F, hay que tener en cuenta que el sustrato utilizado para cuantificar la actividad enzimática (RNasa B) es de carácter macromolecular a diferencia de los sustratos utilizados para α -manosidasa y α -fucosidasa, donde se usan sustratos artificiales de baja peso molecular (PNPM y PNPF, respectivamente). En consecuencia, en el caso de PNGasa F, los problemas difusionales son aún mayores, teniendo en cuenta también que puede producirse una inactivación parcial por el proceso de inmovilización.

Igualmente, para todas las enzimas se obtuvieron derivados activos con una carga enzimática que permitió su utilización como herramienta para la deglicosilación selectiva de los lisados parasitarios.

En suma, se sintetizaron derivados inmovilizados con una buena actividad enzimática para todas las glicosidasas y para ambos soportes. Todos los derivados enzimáticos fueron utilizados para realizar ensayos funcionales con lisados de *T. cruzi*, así como también algunos con glicoproteínas modelo.

Deglicosilación de lisados de *T. cruzi*

Se deglicosilaron lisados parasitarios epi-TC-Nativos o epi-TC-DOC con diferentes glicosidasas inmovilizadas. La PNGasa F es específica para la hidrólisis del enlace amida que se forma entre los residuos de asparagina de la proteína y la GlcNAc más interna de los *N*-glicanos^{153,155}. Por lo cual, permite evaluar la participación de los *N*-glicanos en la activación de los receptores de tipo TLR. Por otro lado la β -galactosidasa, neuraminidasa, α -manosidasa y α -fucosidasa son específicas para la remoción de residuos terminales de β -D-galactosa unida por enlace β 1-4, α -Neu5Ac, α -D-manosa y α -L-fucosa respectivamente^{138,151,152,175-177}. Esto nos permite determinar la presencia de estos residuos terminales y su participación en la activación de los TLRs.

Deglicosilación con PNGasa F

Como se detalla en la introducción, nuestros antecedentes muestran un rol de los glicanos de *T. cruzi* en la inducción de una respuesta inmune antitumoral (Figura 7). El tratamiento enzimático con PNGasa F resulta una metodología interesante para corroborar que los *N*-glicanos

intervienen en el reconocimiento del lisado parasitario por los TLRs seleccionados, ya que esta enzima cataliza la hidrólisis del enlace entre el residuo de GlcNAc más interno de los *N*-glicanos y el residuo de asparagina de la glicoproteína. Por lo tanto, se utilizaron nuestros derivados enzimáticos inmovilizados sobre nanopartículas de sílica o sobre nanopartículas magnéticas, con los que ya contábamos en el laboratorio al inicio de este trabajo. Se deglicosilaron lisados de epi-TC-DOC de Dm28c utilizando PNGasa F inmovilizada sobre nanopartículas magnéticas, así como epi-TC-Nativo de Dm28c, TcvT-1 y Arse utilizando PNGasa F inmovilizada sobre nanopartículas de sílica y dicha modificación se corroboró verificando cambios en el reconocimiento por un amplio panel de lectinas (Figura 23). Se puede observar en la Figura 23A que luego del tratamiento del lisado epi-TC-DOC Dm28c con PNGasa F- inmovilizada sobre nanopartículas magnéticas se encontró una disminución del 72% del reconocimiento de ConA, 58% del de ECA, 37% del de BS1-B4 y 46% del de Ulex respecto al control. Esto sugiere una deglicosilación exitosa por parte del derivado enzimático. La deglicosilación de los lisados epi-TC-Nativo fue realizada posteriormente para las cepas Dm28c, TcvT-1 y Arse (Figura 23B-D), por lo cual se optó por evaluar su deglicosilación exclusivamente con la lectina ConA, que fue la que presentó una mayor disminución en el ensayo anterior. En este momento fue que se discontinuó la venta de nanopartículas magnéticas y por ello las deglicosilaciones con PNGasa F inmovilizada se realizaron utilizando las nanopartículas de sílica como soporte. Sorprendentemente, en este caso se observó una notoria disminución (70% en Dm28c, 56% en TcvT-1 y 79% en Arse) del reconocimiento de ConA en los controles incubados con nanopartículas respecto al extracto nativo original para todas las cepas estudiadas, lo que no ocurrió cuando se utilizó la PNGasa F inmovilizada sobre nanopartículas magnéticas. A su vez se observó una disminución en la concentración de proteínas en el lisado luego de la incubación, tanto con las nanopartículas sin activar, como con las que contenían la PNGasa F inmovilizada. Esto podría significar que parte de las proteínas, en particular aquellas con afinidad por ConA, se habrían adsorbido al soporte. Este aspecto podría explicar la pérdida de reconocimiento de ConA en el lisado Control. Por otro lado, no se observan cambios significativos entre el reconocimiento por ConA de los lisados controles y los lisados deglicosilados. Esto estaría indicando que la PNGasa inmovilizada no fue efectiva en la deglicosilación del extracto parasitario en condiciones nativas. Si bien los ensayos de actividad con PNGasa inmovilizada sobre nanopartículas de sílica evidenciaron que la misma se encontraba activa, no se debe perder de vista que estos estudios se realizaron utilizando una glicoproteína pura como sustrato (RNasa B) y bajo condiciones desnaturalizantes, donde el glicano se encuentra más expuesto, y en condiciones de velocidades iniciales (Figura 24). Incluso cuando se utiliza la PNGasa F soluble la velocidad de hidrólisis en condiciones nativas es notoriamente menor que en condiciones

desnaturalizantes, motivo por el cual cuando la PNGasa F se utiliza para la deglicosilación de glicoproteínas para la liberación de *N*-glicanos previo a la caracterización de los mismos por espectrometría de Masa, este procedimiento se realiza bajo condiciones desnaturalizantes ¹¹⁷. Otro aspecto a considerar es que el hecho que cuando la enzima se encuentra inmovilizada, la unión del sustrato al sitio activo puede encontrarse más obstaculizada, ya que el acceso al mismo puede encontrarse parcialmente ocluido dependiendo de la orientación con que la enzima quedó inmovilizada.

Los problemas difusionales se ven incrementados en el caso de los soportes porosos como la agarosa. De hecho, nuestro grupo de investigación demostró previamente que si bien es posible la inmovilización de PNGasa F sobre agarosa la misma no es funcional para procesos de deglicosilación en condiciones nativas ¹¹⁷. Si bien en este caso se está trabajando con un nanosorte, es posible que las mismas tengan un cierto grado de porosidad (el fabricante no brinda especificaciones al respecto) y pueda estar ocurriendo un fenómeno similar al que tiene lugar cuando la inmovilización se da sobre agarosa. A su vez, hay que considerar que el lisado parasitario compone una matriz compleja que también puede influir en la efectividad de la enzima en relación a la glicoproteína modelo. Por lo tanto, para poder esclarecer este fenómeno, habría que evaluar la deglicosilación de glicoproteínas modelo en condiciones nativas utilizando la PNGasa F inmovilizada sobre nanopartículas de sílica. Otra alternativa sería trabajar en la mejora del proceso de activación y/o inmovilización.

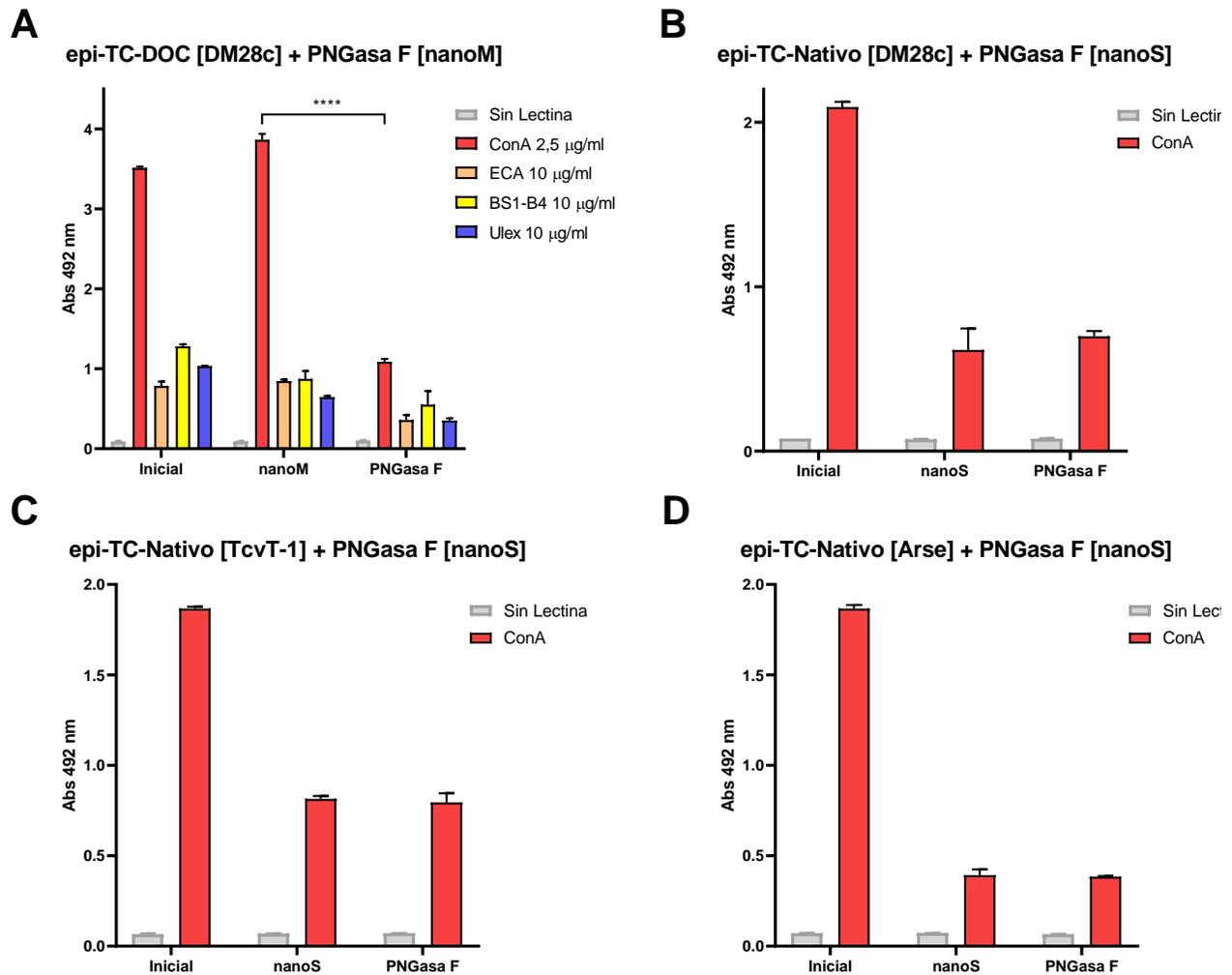


Figura 23. Reconocimiento por parte de lectinas de los lisados parasitarios deglicosilados con PNGasa F. A) epi-TC-DOC de Dm28c deglicosilada con PNGasaF inmobilizada en nanopartículas magnéticas. B-D) epi-TC-Nativo de Dm28c, TcvT-1 y Arse respectivamente. Las placas de Elisa fueron sensibilizadas con lisados parasitarios deglicosilados con PNGasa F y el correspondiente control (1 µg/pocillo) y posteriormente incubada con las lectinas biotiniladas. Luego fueron incubadas con estreptavidina-peroxidasa y revelada con o-phenilendiamina y H₂O₂, midiéndose la A 492 nm. **Inicial:** Lisado sin ningún tratamiento; **PNGasaF:** Lisados deglicosilados con PNGasa F inmobilizada sobre nanopartículas magnéticas (nanoM) o nanopartículas de sílica (nanoS). En estas la concentración de ConA utilizada fue de 0,4 µg/mL. **nanoS** y **nanoM:** Controles realizados incubando el lisado parasitario con las nanopartículas de sílica o magnéticas respectivamente sin activar bajo las mismas condiciones que en la deglicosilación con PNGasa inmobilizada. Las barras indican ± SD y los asteriscos indican las diferencias significativas ****P<0.0001

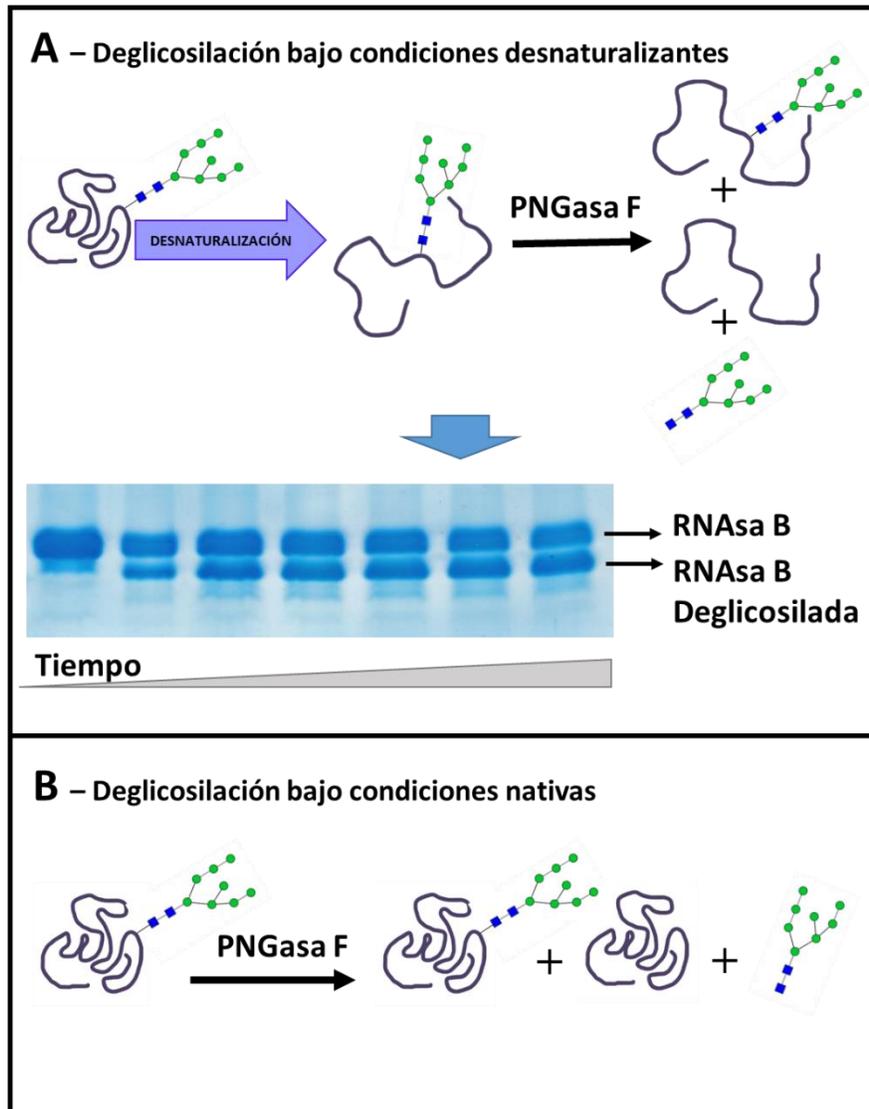


Figura 24. Esquema de la deglicosilación por PNGasa F. A. Deglicosilación de RNAsa B desnaturalizada. Su único glicano queda expuesto, por lo que la enzima inmovilizada tiene un mayor acceso al sitio de corte. **B.** Deglicosilación de RNAsa B nativa. La proteína plegada dificulta al acceso del sitio activo de la enzima.

Demanosilación con α -manosidasa

Considerando que los lisados epi-TC-DOC y epi-TC-Nativos fueron fuertemente reconocidos por la lectina ConA, nos resultó especialmente interesante evaluar el papel biológico de las manosas presentes en los mismos. De hecho, la demanosilación enzimática surge como una alternativa

prometedora para determinar si las manosas presentes en los glicanos parasitarios cumplen un rol en la activación de los TLRs. Por lo cual, se procedió a la remoción de manosas de los lisados parasitarios nativos utilizando nuestros derivados de α -manosidasa inmovilizados sobre agarosa. Este procedimiento se realizó a pH 6,5 dado que los lisados parasitarios precipitan a pH menores, razón por la cual también se eligió utilizar la α -manosidasa de *B. Thetaiotamicron*, que presenta un pH óptimo de 6,5¹⁷⁶. Si bien nuestro grupo de investigación tiene experiencia en el uso de la α -manosidasa de *Canavalia ensiformis*, la misma presenta un pH óptimo de 4,5 el cuál no es compatible con la estabilidad del lisado parasitario¹¹⁶. La α -manosidasa de *B. Thetaiotamicron* (Megazymes) es específica para la remoción de manosas terminales unidas por enlaces α -(1,3), α -(1,4) y α -(1,6).¹⁴⁵

La deglicosilación del lisado parasitario fue evaluada por reconocimiento con la lectina ConA (Figura 25), la cual reconoce, como ya se mencionó, los motivos α -D-manosilo y α -D-glucosilo en posiciones terminales de estructuras ramificadas al igual que por la lectina NPA que reconoce α -manosas¹⁵⁹.

Como se aprecia en la Figura 25, la disminución en el reconocimiento por parte de ConA de los lisados deglicosilados respecto a su control pone de manifiesto que la demanosilación enzimática fue exitosa tanto en el lisado epi-TC-Nativo de las cepas Dm28c como en TcvT-1, pero no de Arse. En el lisado de Dm28c fue clara la disminución del reconocimiento tanto por parte de ConA como de NPA del lisado demanosilado respecto al control. En el caso de la cepa TcvT-1, se pudo evidenciar una diferencia en el reconocimiento por parte de ConA pero no de NPA. El reconocimiento de NPA por los lisados parasitarios es notoriamente menor que para ConA, lo cual estaría evidenciando una menor afinidad por sus glicanos. Posiblemente esto haga que sea menos sensible a los cambios de perfil de manosilación como consecuencia de la demanosilación enzimática no pudiendo observarse una diferencia significativa en el reconocimiento del lisado demanosilado respecto al control. Se puede ver que en estas deglicosilaciones, si bien el control presenta un reconocimiento disminuido por parte de ConA respecto al inicial, este no fue tan abrupto como para PNGasa F, y se puede evaluar la demanosilación.

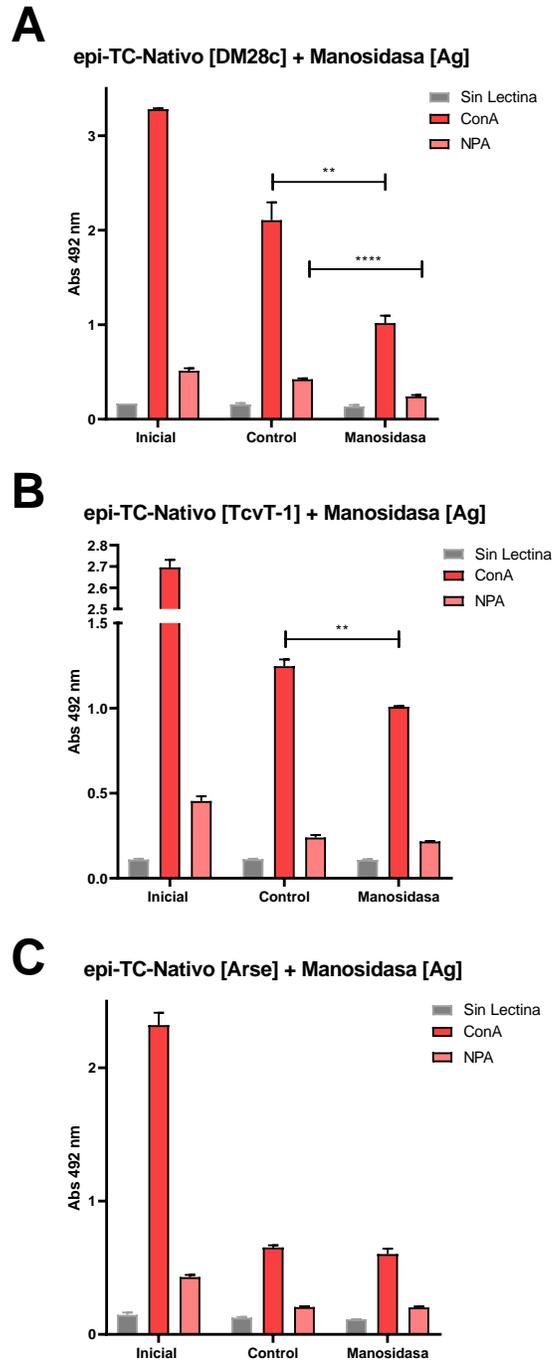


Figura 25. Reconocimiento por parte de lectinas de los lisados parasitarios deglicosilados con α -manosidasa. epi-TC-Nativo de Dm28c, TcvT-1 y Arse respectivamente, deglicosilados con α -manosidasa inmovilizada en agarosa. Las placas de ELISA fueron sensibilizadas con lisados parasitarios deglicosilados y el correspondiente control (1 μg /pocillo) y posteriormente incubada con las lectinas biotiniladas (ConA 0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y NPA 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Luego fueron incubadas con estreptavidina-peroxidasa y revelada con o-phenilendiamina y H_2O_2 , midiéndose la Abs 492 nm. **Inicial:** Lisado sin ningún tratamiento; **α -Manosidasa:** Lisados deglicosilados α -manosidasa inmovilizada en agarosa. **Control:** Lisados incubados con agarosa sin activar bajo las mismas condiciones que en la deglicosilación con α -manosidasa inmovilizada. **Ag:** Agarosa. Las barras indican \pm SD y los asteriscos indican las diferencias significativas: ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

Defucosilación con α -fucosidasa

Respecto a la defucosilación, resulta interesante estudiar la presencia de este carbohidrato en moléculas de *T. cruzi* ya que este azúcar está relacionado con la adhesión celular en general, pero no han sido reportados hasta el momento receptores de la inmunidad innata que necesiten del mismo para su activación.

Se procedió a la defucosilación de los lisados parasitarios nativos utilizando α -fucosidasa inmovilizada sobre agarosa y se evaluó el proceso de defucosilación evaluando la pérdida de reconocimiento con las lectinas Ulex y LTA, que son capaces de unirse a α -L-fucosa terminales especialmente cuando se encuentran unidas por un enlace α (1,2) ¹⁷⁸. En la Figura 26A podemos observar una disminución en el reconocimiento de ambas lectinas respecto al control en la cepa Dm28c, por lo que concluimos que la deglicosilación fue exitosa en este caso. Para la cepa TcvT-1 (Figura 26B), si bien no se observó una diferencia significativa en el reconocimiento de las lectinas, se apreció una tendencia a la disminución de la señal por parte de Ulex en la fracción defucosilada respecto al control, por lo tanto, se utilizó de todas formas en ensayos posteriores. Para la cepa Arse (Figura 26C) no se apreciaron cambios en el reconocimiento de estas lectinas en el lisado defucosilado respecto al control, por lo tanto, no fue utilizado en los ensayos de activación de TLRs.

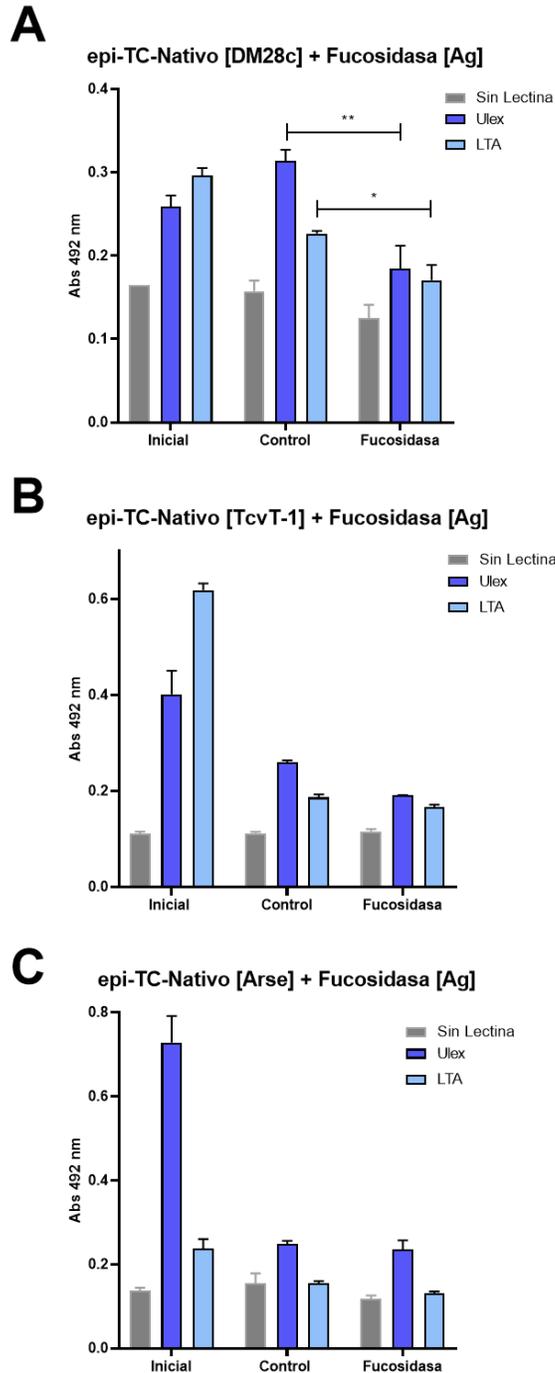


Figura 26. Reconocimiento por parte de lectinas de los lisados parasitarios deglicosilados con α -fucosidasa. epi-TC-Nativo de Dm28c, TcvT-1 y Arse respectivamente, deglicosilados con α -fucosidasa inmovilizada en agarosa. Las placas de ELISA fueron sensibilizadas con lisados parasitarios deglicosilados y el correspondiente control (1 μ g/pocillo) y posteriormente incubada con las lectinas biotiniladas (Ulex y LTA 10 μ g/mL). Luego fueron incubadas con estreptavidina-peroxidasa y revelada con o-phenilendiamina y H₂O₂, midiéndose la Abs 492 nm. **Inicial:** Lisado sin ningún tratamiento; **Fucosidasa:** Lisados deglicosilados α -fucosidasa inmovilizada en agarosa. **Control:** Lisados incubados con agarosa sin activar bajo las mismas condiciones que en la deglicosilación con α -fucosidasa inmovilizada. **Ag:** Agarosa. Las barras indican \pm SD y los asteriscos indican las diferencias significativas *P < 0.05, **P < 0.0001.

Degalactosilaciones con β -galactosidasa

Por otra parte, se procedió a la degalactosilación del lisado epi-TC-DOC Dm28c con el derivado de β -Galactosidasa en agarosa cuya inmovilización ya se había puesto a punto en nuestro grupo de investigación ¹¹⁶. Para evaluar la reacción de degalactosilación se utilizaron ensayos de reconocimiento con lectinas utilizando la lectinas ECA y PNA (Figura 27) con especificidad para los epítopes Gal β -(1-4)-GlcNAc y Gal β -(1-3)-GalNAc, respectivamente ^{160,162}.

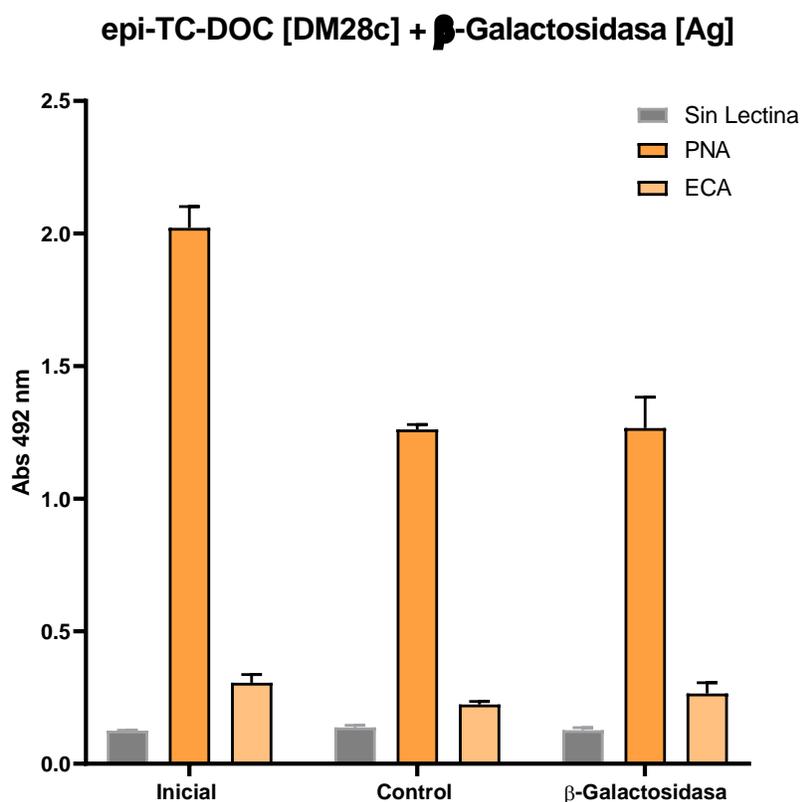


Figura 27. Reconocimiento por parte de lectinas del lisado epi-TC-DOC de Dm28c deglicosilado con β -Galactosidasa. epi-TC-DOC de Dm28c con β -galactosidasa inmovilizada en agarosa. Las placas de ELISA fueron sensibilizadas con lisados parasitarios deglicosilados y el correspondiente control (1 μ g/pocillo) y posteriormente incubada con las lectinas biotiniladas (PNA y ECA 10 μ g/mL). Luego fueron incubadas con estreptavidina-peroxidasa y revelada con o-phenilendiamina y H_2O_2 , midiéndose la Abs 492 nm. **Inicial:** Lisado sin ningún tratamiento; **β -galactosidasa:** Lisados deglicosilados β -galactosidasa inmovilizada en agarosa. **Control:** Lisados incubados con agarosa sin activar bajo las mismas condiciones que en la deglicosilación con β -galactosidasa inmovilizada. **Ag:** Agarosa.

No se pudo evidenciar una disminución significativa en la presencia de galactosas en el reconocimiento de ECA y PNA derivado del proceso de degalactosilación (Figura 27). Dado que PNA reconoce con mayor afinidad el epítipo Gal β 1,3 GalNAc (Kd = 22 nM) que el Gal β 1,4 GlcNAc (Kd = 4 μ M) ^{118,179,180} y que la β -galactosidasa de *A. Oryzae* es específica para la hidrólisis de residuos de galactosa terminales unidos por enlace β 1,4, es probable que si hubiera galactosas unidas por enlace β 1,3 la enzima no las hidrolizara y por tanto no hubiera cambios en el perfil de reconocimiento por PNA. A su vez, de acuerdo a lo reportado por Chacko et al. 2001¹⁸⁰, PNA también tendría afinidad por residuos de galactosa unidos por enlace α , lo que iría en línea con el reconocimiento previamente observado para BS1-B4. La β -galactosidasa de *A. oryzae* tampoco sería específica para la hidrólisis de residuos de α -galactosa lo que también estaría acorde con la ausencia de cambios en el reconocimiento de PNA luego del proceso de degalactosilación. Por otra parte, tanto el menor reconocimiento por el lisado parasitario de la lectina ECA, que si tiene buena especificidad por el epítipo Gal β 1,4 GlcNAc (Kd = 23.7 nM) ^{118,181} como la ausencia de cambios en el reconocimiento de esta lectina luego del proceso de degalactosilación estarían indicando una ausencia de galactosas terminales unidas por enlace β 1-4 en los glicanos parasitarios.

Igualmente, a los efectos de verificar que el derivado enzimático estuviera funcionando correctamente, procedimos a la degalactosilación de glicoproteínas modelo. Se seleccionaron dos glicoproteínas modelo, asialo fetuína y asialo lactoferrina, que presentan galactosas terminales unidas por enlace β -(1-4) a GlcNAc (Figura 28) ^{182,183}. Ambas glicoproteínas se obtuvieron por desialilación química de la fetuína y la lactoferrina, respectivamente, como se describe en el capítulo de Materiales y Métodos.

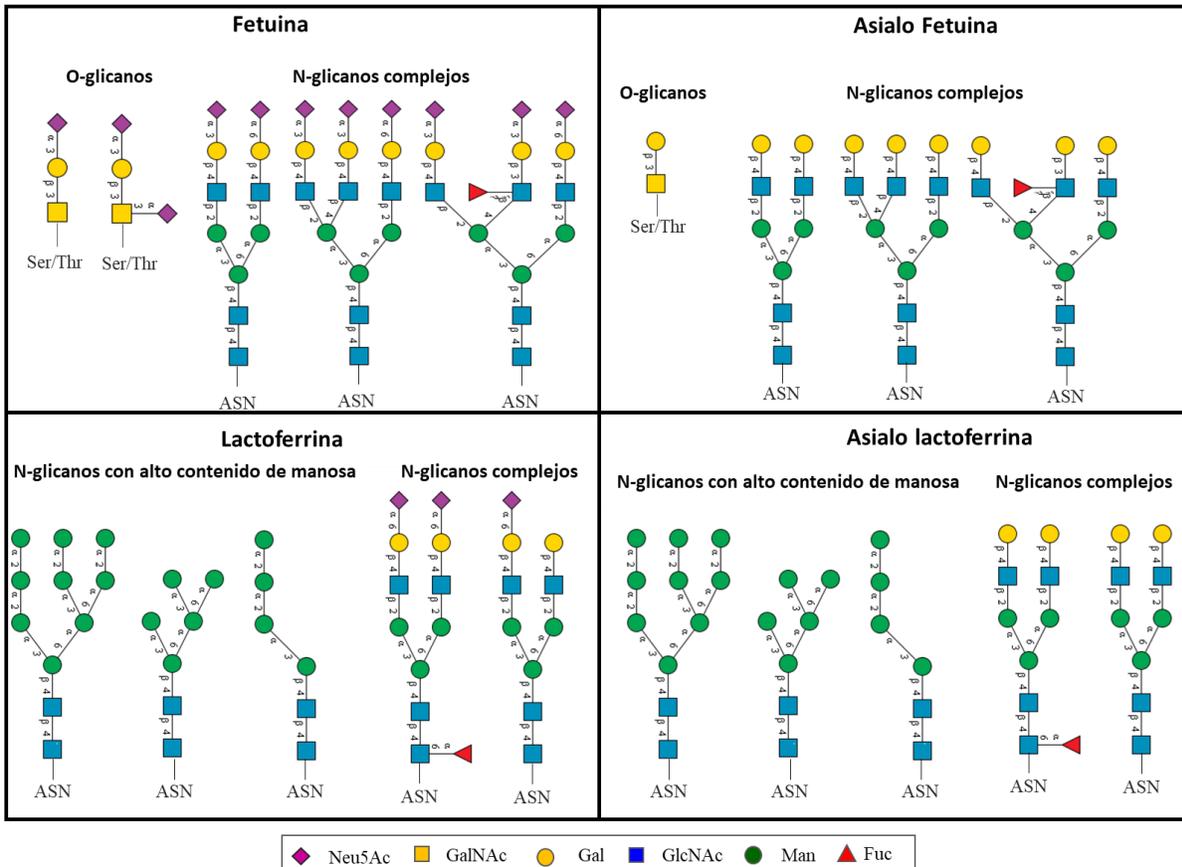


Figura 28. Estructura de los carbohidratos presentes en las glicoproteínas modelo Fetuina, Asialo Fetuina, Lactoferrina y Asialo Lactoferrina.

Como se puede observar en la Figura 29 la desialilación química tanto de la fetuina (Figura 29A) como de la lactoferrina (Figura 29B) funcionó correctamente, lo que se evidencia por una disminución en el reconocimiento por la lectina SNA, que es específica para ácido siálico unido por enlace $\alpha(2-6)$ ^{160,162}. Por otra parte, la degalactosilación enzimática utilizando la β -galactosidasa inmovilizada sobre agarosa fue efectiva tanto cuando se utilizó asialo fetuina como asialo lactoferrina como sustrato, ya que se observó una disminución del reconocimiento de la lectina ECA de un 67% y un 43% para asialo fetuina y asialo lactoferrina, respectivamente (Figura 29C y D). Estos resultados confirman el correcto funcionamiento de la β -galactosidasa inmovilizada para procesos de degalactosilación.

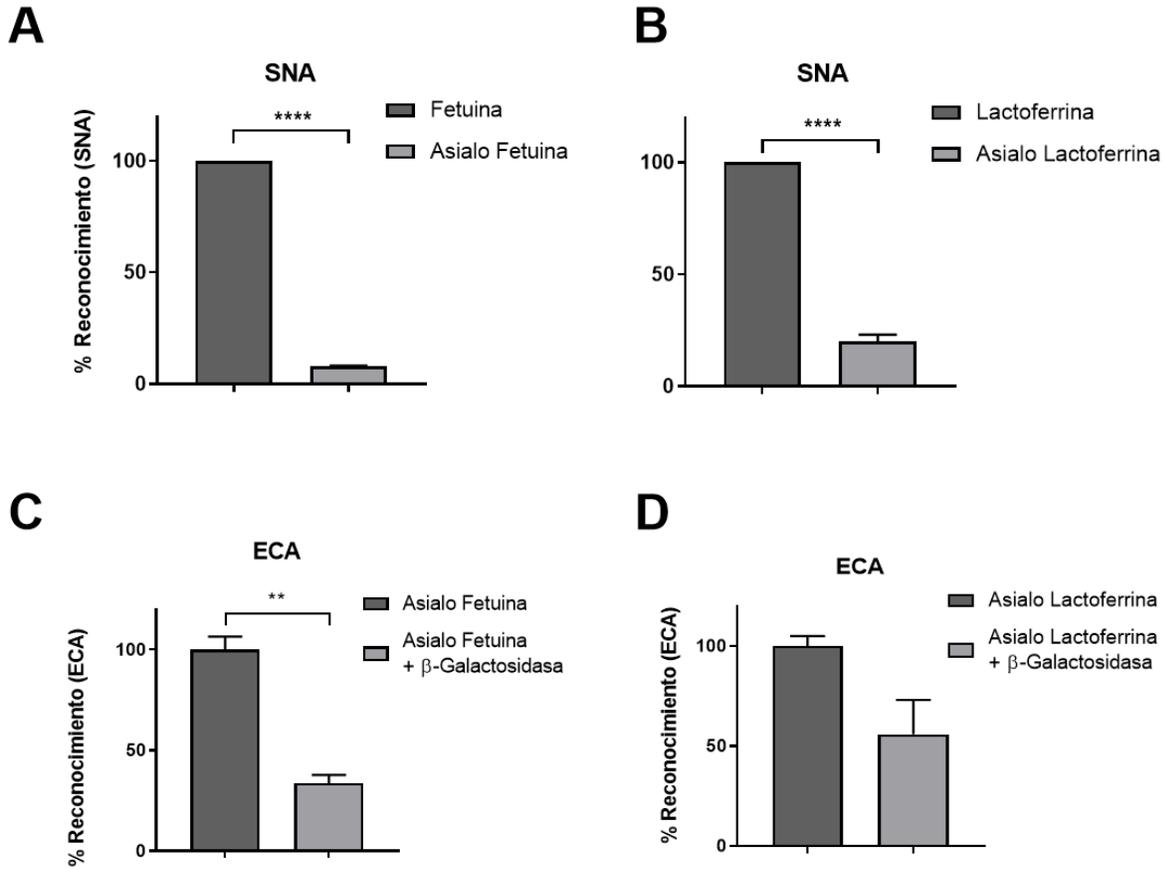


Figura 29. Desialilación Química y posterior degalactosilación de glicoproteínas modelo con β -Galactosidasa inmovilizada en agarosa. Se representan los porcentajes de reconocimiento de lectinas de la fracción desialilada o degalactosilada respecto al control. **A - B.** Desialilación química de Fetuina y Lactoferrina respectivamente. **C - D.** Degalactosilación de Asialo Fetuina y Asialo Lactoferrina respectivamente con β -Galactosidasa inmovilizada en agarosa. Las placas de ELISA fueron sensibilizadas con las glicoproteínas modelo y los controles correspondientes (1 μ g/pocillo) y posteriormente incubada con las lectinas biotiniladas (SNA y ECA 10 μ g/mL). Luego fueron incubadas con estreptavidina-peroxidasa y revelada con o-phenilendiamina y H₂O₂, midiéndose la A 492 nm. Los controles de las deglicosilaciones se realizaron incubando la glicoproteína modelo con agarosa sin activar bajo las mismas condiciones que en la degalactosilación con β -galactosidasa inmovilizada. Las barras indican \pm SD y los asteriscos indican las diferencias significativas ****P<0.0001; **< 0.01.

El hecho de que no se observaran cambios en el reconocimiento del lisado epi-TC-DOC de Dm28c con las lectinas ECA y PNA podría deberse a que los glicanos del lisado no presentan residuos de galactosa terminales unidos por enlace $\beta(1,4)$. Si bien se ha reportado en la bibliografía la presencia de residuos de galactosa terminales unidos por enlaces $\beta(1,4)$, los mismos se encontrarían cerrados como furanosa y no como piranosa, lo que podría ser el motivo por el cual no son reconocidos por la enzima ³⁹.

Dado que no se observaron cambios en los patrones de glicosilación frente al tratamiento con la β -galactosidasa, no se realizó la deglicosilación de los lisado epi-TC-Nativos.

Desialilación con neuraminidasa

Finalmente, también se realizó la desialilación enzimática del lisado epi-TC-DOC utilizando Neuraminidasa inmovilizada sobre agarosa. Este derivado fue previamente optimizado por nuestro grupo de trabajo en colaboración con la Lic. Lucía Bidondo ¹¹⁸. Se utilizó la lectina SNA para evaluar la pérdida de reconocimiento respecto al control, ya que esta reconoce específicamente α -(2-6)-Neu5Ac.

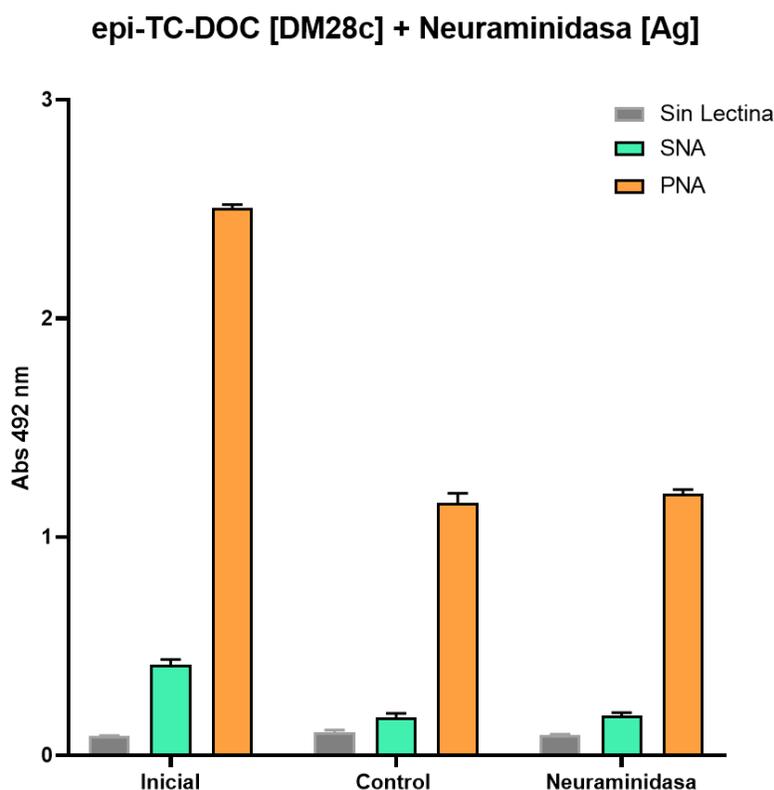


Figura 30. Reconocimiento por parte de lectinas del lisado epi-TC-DOC de Dm28c deglicosilado con Neuraminidasa. epi-TC-DOC de Dm28c con neuraminidasa inmovilizada en agarosa. Las placas de ELISA fueron sensibilizadas con lisados parasitarios deglicosilados y el correspondiente control (1 μ g/pocillo) y posteriormente incubada con las lectinas biotiniladas (SNA y PNA 10 μ g/mL). Luego fueron incubadas con estreptavidina-peroxidasa y revelada con o-phenilendiamina y H₂O₂, midiéndose la Abs 492 nm. **Inicial:** Lisado sin ningún tratamiento; **Neuraminidasa:** Lisados deglicosilados neuraminidasa inmovilizada en agarosa. **Control:** Lisados incubados con agarosa sin activar bajo las mismas condiciones que en la deglicosilación con neuraminidasa inmovilizada. **Ag:** Agarosa.

Como se puede observar en la Figura 30, no se obtuvo una pérdida significativa del reconocimiento por SNA ni un aumento del reconocimiento por PNA (que ocurriría en caso de

desenmascarar galactosas previamente modificadas con ácido siálico) en las muestras deglicosiladas respecto al control. Esto indicaría que no habría presencia de ácido siálico en los lisados parasitarios evaluados capaz de ser removido en estas condiciones. Hay que tener en cuenta que se ha reportado la presencia de residuos de $\alpha(2,3)$ -Neu5Ac en glicoproteínas de parásitos [21] y que si bien la neuraminidasa de *C. perfringens* es específica para la remoción de Neu5Ac unido tanto por enlace $\alpha(2,3)$ como $\alpha(2,6)$, es probable que dado que la lectina SNA no reconoce el Neu5Ac unido por enlace $\alpha(2,3)$ no estuviéramos detectando la desialilación. Por eso también se evaluó la misma utilizando la lectina PNA que reconoce galactosa unida por enlace $\beta(1,3)$, la cual suele encontrarse en los *N*-glicanos complejos por debajo del Neu5Ac unido por enlace $\alpha(2,3)$.

Al igual que cuando se realizó la degalactosilación con β -galactosidasa, se procedió a evaluar que la neuraminidasa inmovilizada estuviera funcionando correctamente. Se verificó su funcionalidad deglicosilando fetuina y lactoferrina, dos glicoproteínas modelo que presentan Neu5Ac unido tanto por enlace $\alpha(2,3)$ como $\alpha(2,6)$ (Figura 28). El proceso de desialilación se evaluó con la lectina SNA específica para el reconocimiento de Neu5Ac unido por enlace $\alpha(2,6)$ y con las lectinas ECA y PNA específicas para el reconocimiento de los epítopes Gal- $\beta(1,4)$ -GlcNAc y Gal- $\beta(1,3)$ -GalNAc, que generalmente se encuentran subyacentes al Neu5Ac $\alpha(2,6)$ y Neu5Ac $\alpha(2,3)$ en los *N*-glicanos complejos y *O*-glicanos, respectivamente ^{182,183}.

Como se observa en la Figura 31 A-C, luego de la desialilación enzimática de la Fetuina con Neuraminidasa inmovilizada sobre agarosa, se evidenció una pérdida de reconocimiento de 83 % con SNA y un incremento en el reconocimiento por PNA (40%) y ECA (600%). El incremento en el reconocimiento de PNA es una medida indirecta de la desialilación de Neu5Ac unido por enlace $\alpha(2,3)$ generalmente a Gal $\beta(1,3)$ -GalNAc en *O*-glicanos, epítipo por el que presenta afinidad la lectina PNA. Por otra parte, el aumento en la afinidad de ECA confirma la liberación de Neu5Ac unido por enlace $\alpha(2,6)$ a lactosamina (Gal $\beta(1,4)$ -GlcNAc) en *N*-glicanos complejos, ya que ECA es específica para lactosamina. También fue efectiva la desialilación de Lactoferrina (Figura 31 D-E), obteniéndose una pérdida de reconocimiento por SNA de un 53%, con un aumento en el reconocimiento de ECA de un 65% y de PNA de un 43%. Estos resultados confirman que nuestra neuraminidasa inmovilizada presentó actividad y fue funcional para la desialilación de glicoproteínas. Por lo tanto, al no poder confirmar la presencia de Neu5Ac en los lisados parasitarios, al igual que con el tratamiento con β -Galactosidasa, no se prosiguió a la desialilación de epi-TC-Nativo.

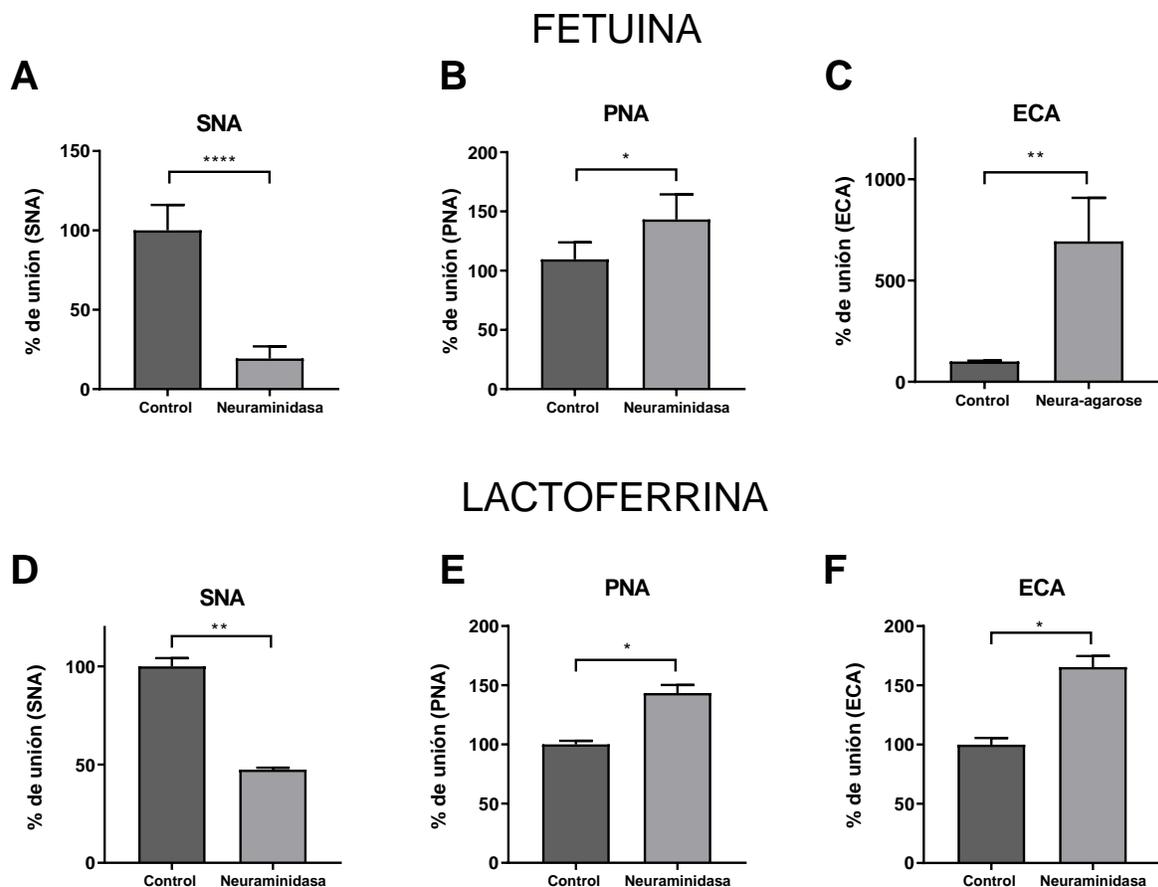


Figura 31. Deglicosilación de glicoproteínas modelo con Neuraminidasa inmovilizada en agarosa. Se representan los porcentajes de reconocimiento de lectinas de la fracción desialilada respecto al control incubado con agarosa. **A - C.** Desialilación enzimática de Fetuina evaluada con SNA, PNA y ECA respectivamente. **D - E.** Desialilación enzimática de Lactoferrina evaluada con SNA, PNA y ECA. Se sensibilizaron las placas de ELISA con las glicoproteínas modelo y sus correspondientes controles (0,25 µg/pocillo) y posteriormente se incubaron con las lectinas biotiniladas (SNA, PNA y ECA 10 µg/mL). A continuación, se incubaron con estreptavidina-peroxidasa, se revelaron con O-fenilendiamina y se midió A 492 nm. Los controles se realizaron incubando la glicoproteína modelo con agarosa sin activar bajo las mismas condiciones que con la neuraminidasa inmovilizada. Se indica \pm SD con las barras de error y los asteriscos indican las diferencias significativas. **** P < 0.0001, **P < 0.01, * P < 0.05.

En suma, y a modo de resumen de estos resultados, se puede concluir que:

- 1- Se generaron tres nuevas enzimas inmovilizadas, una de ellas sobre nanopartículas de sílica, un soporte que aún no se había utilizado en nuestro laboratorio y no había sido reportada su activación con grupos cianato éster utilizando el agente cianilante CDAP.
- 2- Con estos derivados enzimáticos junto con otros previamente disponibles en nuestro laboratorio, se llevaron a cabo deglicosilaciones selectivas de los lisados epi-TC-DOC y epi-TC-Nativos con cinco glicosidasas inmovilizadas, obteniéndose deglicosilaciones exitosas con la PNGasa F inmovilizada sobre nanopartículas magnéticas al igual que con α -manosidasa y α -fucosidasa inmovilizadas sobre agarosa.
- 3- No fue posible la deglicosilación enzimática con derivados de PNGasa F inmovilizados sobre nanopartículas de sílica, los cuales deberán ser evaluados utilizando glicoproteínas modelo.
- 4- Las degalactosilaciones y desialilaciones enzimáticas de los lisados parasitarios no fueron efectivas. Esto indicaría que las glicoproteínas parasitarias, o bien no tienen β -galactosas terminales unidas por enlace β , o, como se encuentran reportado en la literatura, las mismas cierran como furanosa y no pueden ser reconocidas por la enzima ^{34,184}.
- 5- Fue posible obtener lisados epi-TC-Nativos depletados de manosa y fucosa y epi-TC-DOC Dm28c depletado de *N*-glicanos para ser evaluados en ensayos celulares a los efectos de determinar si la remoción de los *N*-glicanos totales, las manosas o las fucosas disminuye la activación de los TLRs observada utilizando los lisados de epi-TC-Nativos de distintas cepas parasitarias.

4- Determinación del papel de los carbohidratos parasitarios en el reconocimiento por TLRs

Los carbohidratos pueden influir en el reconociendo de los receptores de la inmunidad innata. Esto se ha estudiado ampliamente con los receptores de tipo CLR que reconocen motivos carbohidratos específicos. Si bien se sabe que algunos TLRs son capaces de reconocer glicoconjugados, el papel de los carbohidratos en la interacción con estos receptores no se ha estudiado en profundidad.

Evidencia de trabajos donde se estudia el reconocimiento de *T. cruzi* por parte del sistema inmune innato muestra que Mφ y DCs deficientes tanto en el gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide (MyD88) como en el dominio Toll/IL-1R (TIR) que contiene la proteína adaptadora inductora de interferón beta (TRIF), las dos principales proteínas adaptadoras involucradas en la señalización de los TLRs, muestran un nivel dramáticamente incrementado de infección por parásitos en comparación con células de tipo salvaje ¹⁸⁵. Si bien se ha investigado la interacción de ligandos de *T. cruzi* como anclajes GPI con el TLR2, regiones CpG de su ADN con el TLR9 y GPII-ceramida con el TLR4, no se ha profundizado en el rol que juegan los carbohidratos en esta activación ¹⁸⁵.

Hasta el momento se ha reportado que los modelos *in vivo* deficientes de TLRs individuales generalmente tienen efectos modestos en la resistencia a la infección por *T. cruzi*. Actualmente el estudio que muestra un sistema inmunológico con mayor susceptibilidad a la infección por *T. cruzi* consiste en ratones deficientes en MyD88 y/o TRIF ¹⁰³. Los mecanismos específicos de resistencia de los macrófagos y las células dendríticas a la infección por *T. cruzi* aún no se han determinado completamente.

[Papel de los glicanos parasitarios en inducir la activación del hTLR2](#)

Una vez obtenidas las enzimas glicosidasas inmovilizadas y de haber puesto a punto un modelo celular sensible capaz de activar receptores TLRs frente a la presencia de lisado epi-TC-Nativo, nos propusimos estudiar esta activación cuando se remueven específicamente algunos azúcares del lisado. Para detectar el papel de los *N*-glicanos en la interacción con los TLRs candidatos, se utilizó PNGasa F inmovilizada en nanopartículas magnéticas. A continuación, se muestran en la Figura 32 los resultados obtenidos con el lisado epi-TC-DOC tratado con PNGasa F inmovilizada y su capacidad de activar al

hTLR2. Como se puede observar, la activación de este receptor con el lisado deglicosilado con PNGasa F respecto al control disminuyó, por lo cual, se puede concluir que los *N*-glicanos presentes en el lisado de *T. cruzi* son responsables, al menos en parte, de esta interacción.

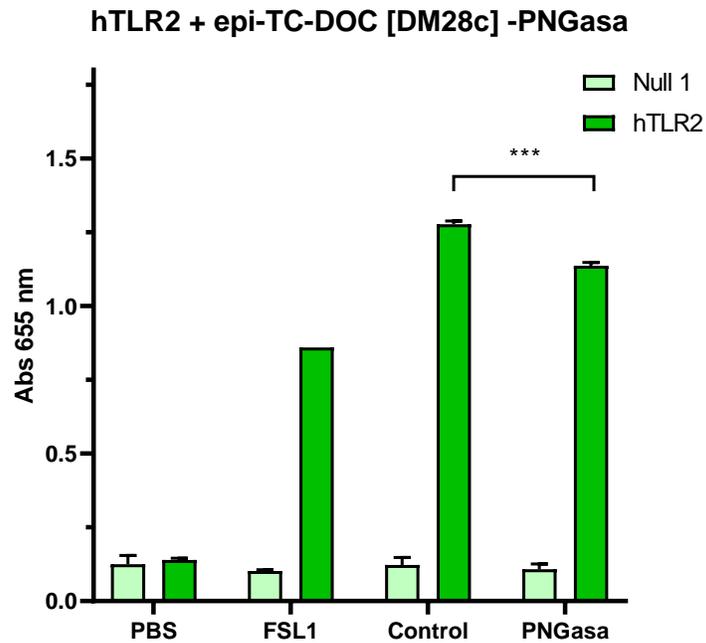


Figura 32. Activación de HEK-293/hTLR2-Blue con ligandos presentes en epi-TC-DOC DM28c depletado de N-glicanos. 20 μ L del lisado de Dm28c tratado y no tratado con PNGasa F así como estímulos de TLR2 (controles positivos) se sembraron por pocillo. Posteriormente, las células se resuspendieron en medio HEK-Blue Detection y se sembraron 50.000 células/pocillo en un volumen de 180 μ L. Se incubaron durante toda la noche a 37°C y 5% CO₂, y se midió la absorbancia a 655 nm. Las diferencias significativas se muestran con asteriscos y corresponden a: ***p<0.001.

Para continuar investigando cuales de los carbohidratos presentes en los glicanos parasitarios de los lisados epi-TC son responsables de esta activación, se profundizó utilizando una metodología similar, pero utilizando exoglicosidasas que remueven monosacáridos terminales. En la Figura 33 se muestran los resultados de la activación de hTLR2 con lisados epi-TC-Nativos de las cepas Dm28c y TcvT-1 demanosilados con la enzima α -manosidasa de *B. thetaioitamicron*, que cliva específicamente manosas terminales unidas por enlaces α -(1,3), α -(1,4) y α -(1,6).

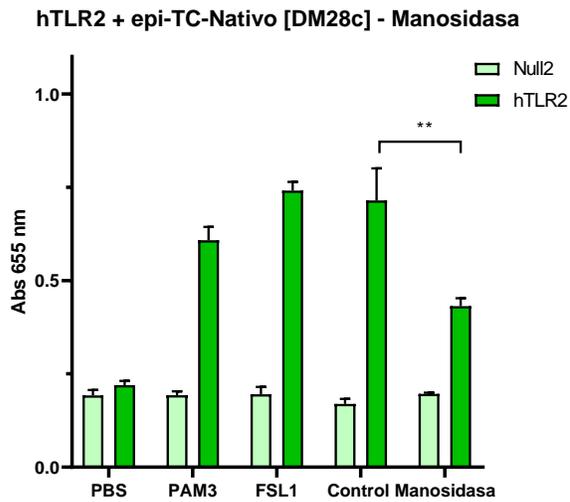
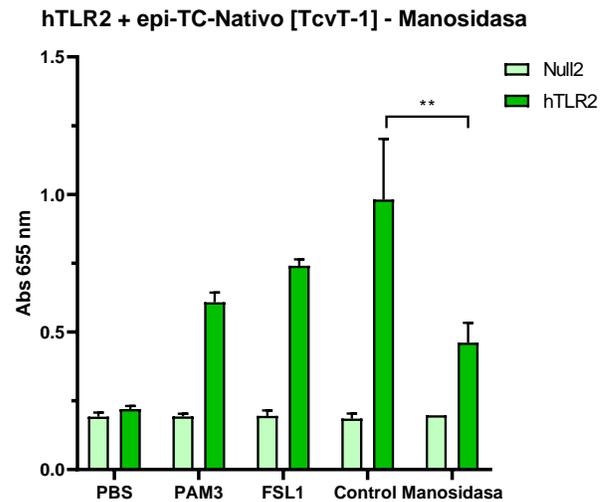
A**B**

Figura 33. Activación de HEK-293/hTLR2-Blue con ligandos presentes en epi-TC-Nativo de Dm28c (A) y TvcT-1 (B) depletados de manosas terminales. 20 μ L del lisado de Dm28c tratado y no tratado con α -manosidasa así como estímulos de TLR2 (controles positivos) se sembraron por pocillo. Posteriormente, las células se resuspendieron en medio HEK-Blue Detection y se sembraron 50.000 células/pocillo en un volumen de 180 μ L. Se incubaron durante toda la noche a 37°C y 5% CO₂, y se midió la absorbancia a 655 nm. Las diferencias significativas se muestran con asteriscos y corresponden a: **p<0.01.

Como se puede observar en la Figura 33, se apreció una disminución de la activación del hTLR2 con los lisados demanosilados frente a su control, tanto para la cepa Dm28c como para TvcT-1. Es decir, que las manosas son en parte responsables de la activación de este receptor por el lisado epi-TC-Nativo en ambas cepas.

Por otra parte, en la Figura 34 se observa el resultado de la activación de hTLR2 frente a los mismos lisados epi-TC-Nativos tratados con derivado inmovilizado de α -fucosidasa de *Homo sapiens*. En este caso no se observó un cambio significativo en la activación de este TLR, por lo que concluimos que este carbohidrato no participa en la activación de este receptor.

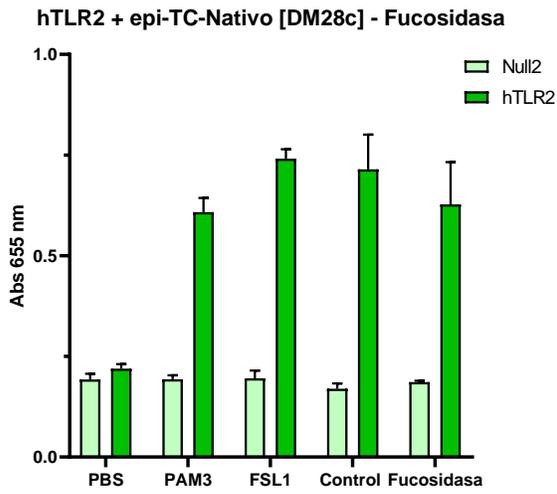
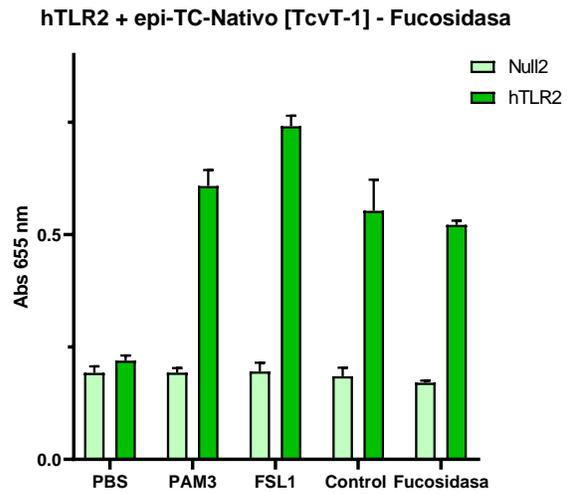
A**B**

Figura 34. Activación de HEK-293/hTLR2-Blue con ligandos presentes en epi-TC-Nativo de Dm28c y TvcT-1 depletados de fucosas terminales. 20 μ L del lisado de Dm28c tratado y no tratado con α -fucosidasa así como estímulos de TLR2 (controles positivos) se sembraron por pocillo. Posteriormente, las células se resuspendieron en medio HEK-Blue Detection y se sembraron 50.000 células/pocillo en un volumen de 180 μ L. Se incubaron durante toda la noche a 37°C y 5% CO₂, y se midió la absorbancia a 655 nm.

Papel de los glicanos parasitarios en inducir la activación del m/hTLR4

A continuación, realizamos los mismos ensayos de activación con los receptores TLR4 de origen humano y murino. En primer lugar, se muestra en la Figura 35 la activación por parte del lisado epi-TC-DOC tratado con derivado inmovilizado de PNGasa F en nanopartículas magnéticas.

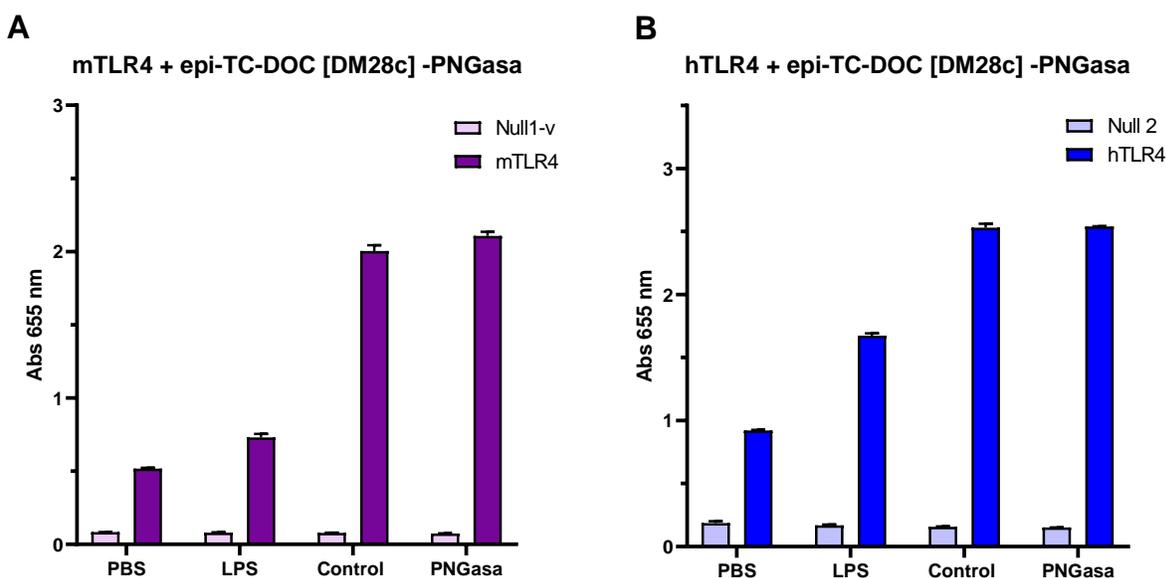


Figura 35. Activación de HEK-293 h/mTLR4-Blue con ligandos presentes en epi-TC-DOC Dm28c depletado de *N*-glicanos. 20 μ L del lisado de Dm28c tratado y no tratado con PNGasa F así como estímulo de TLR4 (control positivo) se sembraron por pocillo. Posteriormente, las células se resuspendieron en medio HEK-Blue Detection y se sembraron 50.000 células/pocillo en un volumen de 180 μ L. Se incubaron durante toda la noche a 37°C y 5% CO₂, y se midió la absorbancia a 655 nm.

En este caso, el tratamiento con la enzima PNGasa no generó diferencias en el reconocimiento del lisado respecto al control, por lo que concluimos que, en principio, los *N*-glicanos no son responsables de la activación de estos receptores por parte del lisado epi-TC-DOC. De todos modos, continuamos investigando esta interacción más en profundidad con los lisados epi-TC-Nativos de las cepas Dm28c y TcvT-1. Como se muestra en la Figura 36, se trató a los lisados nativos con el mismo derivado enzimático de α -manosidasa de la Figura 33 y se evaluó la activación de los receptores en cuestión.

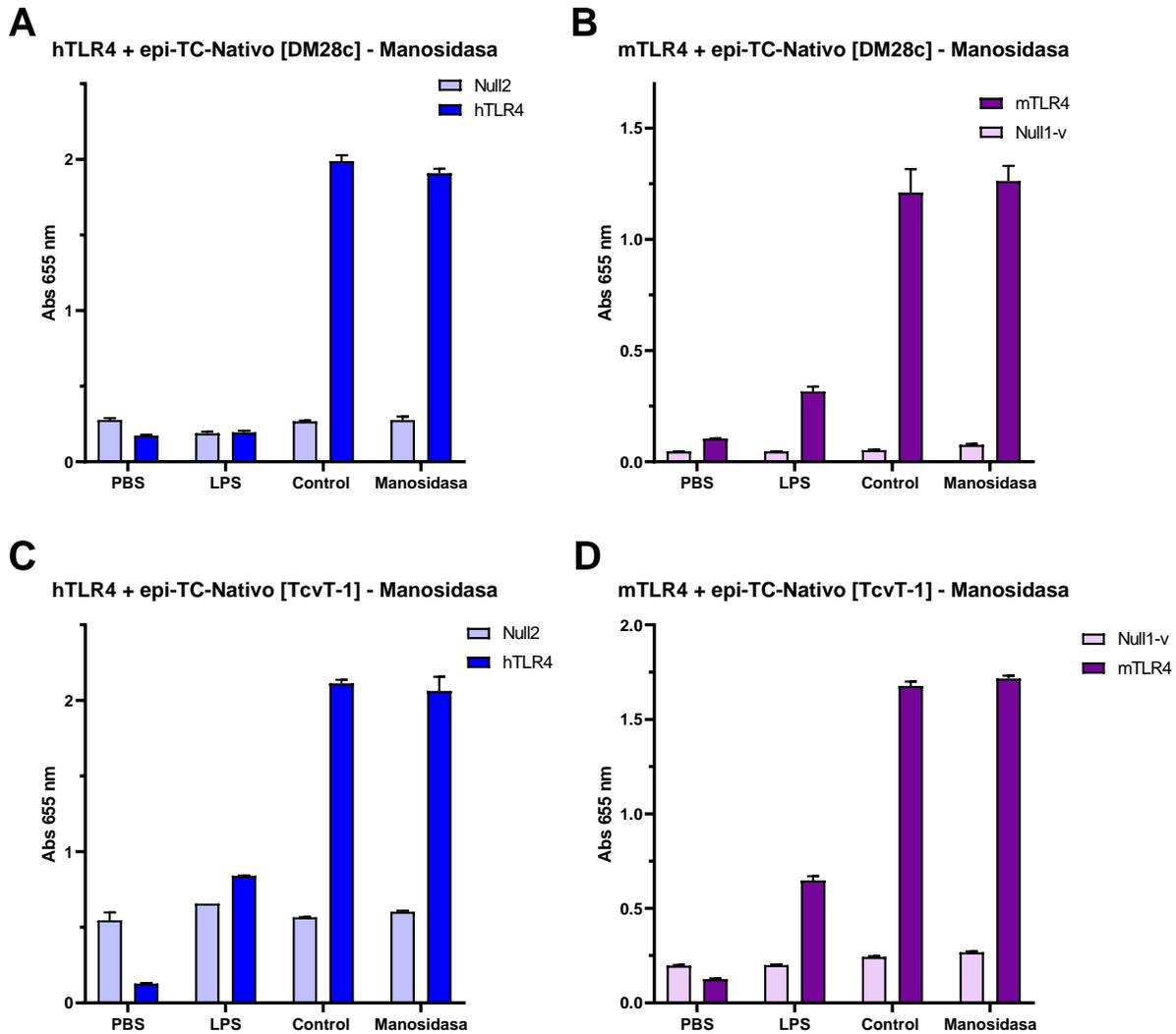


Figura 36. Activación de HEK-293/h/mTLR4-Blue con ligandos presentes en epi-TC-Nativo de Dm28c y TcvT-1 depletados de manosas terminales. 20 μ L del lisado de Dm28c tratado y no tratado con α -manosidasa así como estímulo de TLR4 (control positivo) se sembraron por pocillo. Posteriormente, las células se resuspendieron en medio HEK-Blue Detection y se sembraron 50.000 células/pocillo en un volumen de 180 μ L. Se incubaron durante toda la noche a 37°C y 5% CO₂, y se midió la absorbancia a 655 nm.

Al igual que con la PNGasa F no se detectaron cambios en el reconocimiento del lisado tratado con esta enzima. Es decir, las α -Manosas no son responsables de la activación del TLR4 murino o humano por el lisado de *T. cruzi* de ambas cepas estudiadas. Por otra parte, en la Figura 37 se muestra el análisis de la activación de los receptores con los lisados epi-TC-Nativos de las cepas Dm28c y TvcT-1 tratados α -fucosidasa.

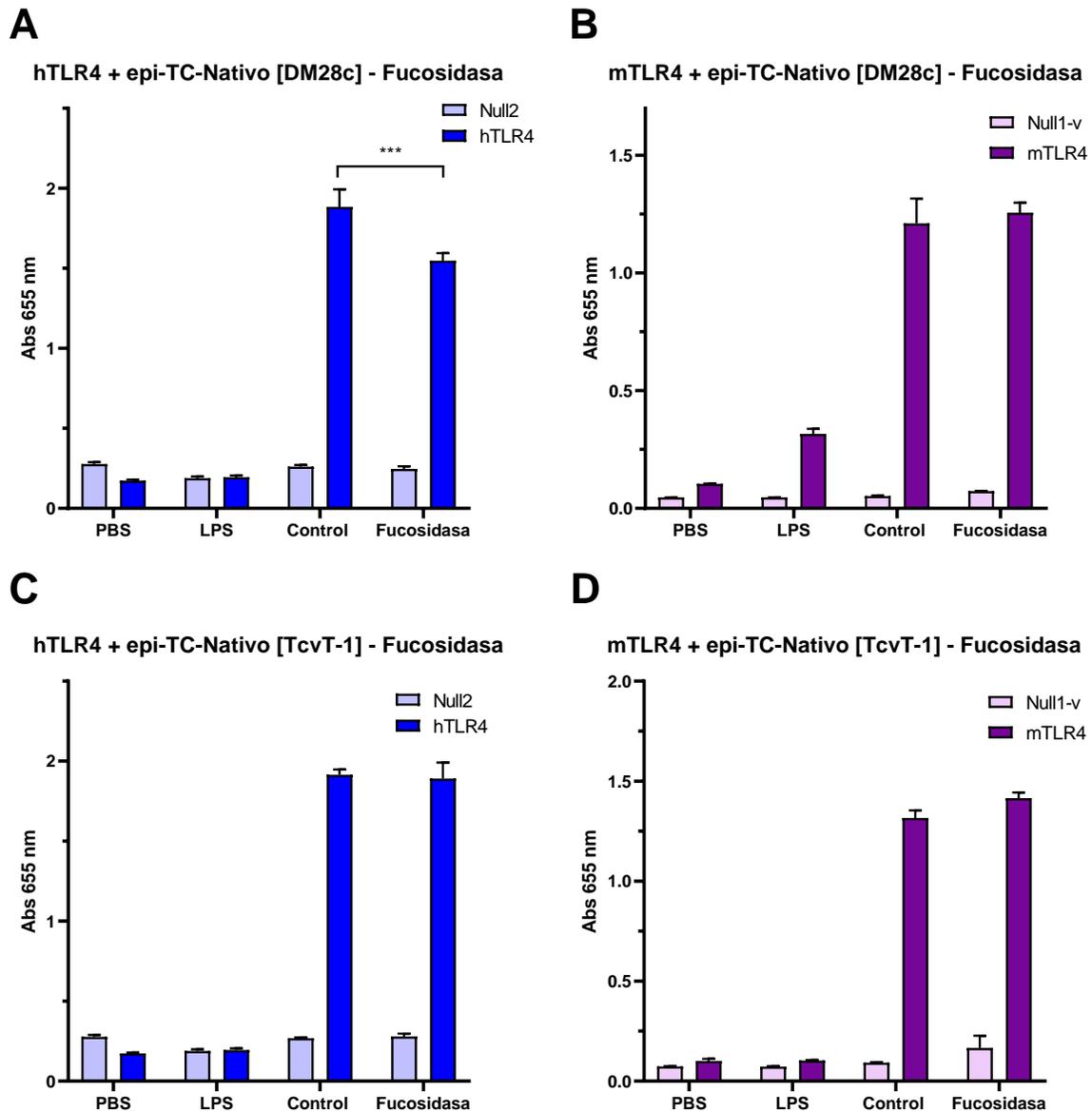


Figura 37. Activación de HEK-293/h/mTLR4-Blue con ligandos presentes en epi-TC-Nativo de Dm28c y TcvT-1 depletados de fucosas terminales. 20 μ L del lisado de Dm28c tratado y no tratado con α -fucosidasa así como estímulo de TLR4 (control positivo) se sembraron por pocillo. Posteriormente, las células se resuspendieron en medio HEK-Blue Detection y se sembraron 50.000 células/pocillo en un volumen de 180 μ L. Se incubaron durante toda la noche a 37°C y 5% CO₂, y se midió la absorbancia a 655 nm. Las diferencias significativas se muestran con asteriscos y corresponden a: ***p<0.001.

En esta oportunidad se apreció una disminución en la señalización del hTLR4 luego del tratamiento con α -fucosidasa en la cepa Dm28c (Figura 37A) pero no en la cepa TcvT-1 (Figura 37C). El receptor mTLR4 por su parte, mantuvo los mismos niveles de activación antes y después del tratamiento con α -fucosidasa (Figura 37 B y D, respectivamente). Por tanto, los resultados sugieren que las fucosas

terminales parecen ser en parte responsables de la activación del TLR4 humano, pero no del murino, y que estas posiblemente no se encuentren formando parte de los *N*-Glicanos, sino de otras estructuras glucídicas como los *O*-Glicanos, por ejemplo.

A modo de resumen, los resultados obtenidos en este parte nos indicarían que:

- 1- Los *N*-glicanos parasitarios participan en la activación del TLR2 humano.
- 2- La presencia de las manosas terminales en el lisado nativo proveniente de las cepas Dm28c y TcvT-1 son importantes para la interacción con el TLR 2 humano, pudiendo estar presentes en los *N*-glicanos de las glicoproteínas.
- 3- Las fucosas, presentes posiblemente en *O*-glicanos proveniente del lisado parasitario nativo de la cepa Dm28c, son importantes para la interacción con el TLR4 humano.
- 4- Las Fucosas o Manosas no participarían en la inducción de la activación del TLR4 murino.

5- Análisis del reconocimiento por TLRs de Mucinas ancladas a GPI purificadas a partir de *T. cruzi*

Los principales componentes de la superficie de los parásitos protozoarios habitualmente están anclados a la capa externa de fosfolípidos de la membrana plasmática por glicosilfosfatidilinositol (GPI). La capa de polisacáridos y glicoproteínas ancladas a GPI suele mostrar variaciones, las cuales también dependen de la etapa del ciclo de vida en la que se encuentra el parásito²⁵. Además, las proteínas mayoritarias de superficie de *T. cruzi* son proteínas de tipo mucina¹⁸⁴, que tienen como función contribuir a la protección del mismo y al establecimiento de una infección persistente³⁰. Su importancia es tal que se han mapeado hasta 850 genes que codifican mucinas, los cuales comprenden aproximadamente el 1% del genoma del parásito y el 6% de todos los genes predichos de *T. cruzi*²⁵. Por último, la expresión de estas glicoproteínas es sumamente relevante en las diferentes etapas del ciclo de vida de *T. cruzi*, ya que contienen regiones variables que sugieren una posible estrategia de evasión de la respuesta inmune del huésped mamífero²⁴. En la Figura 38 se muestra la estructura propuesta para las mucinas ancladas a GPI de epimastigotas de *T. cruzi*³⁹.

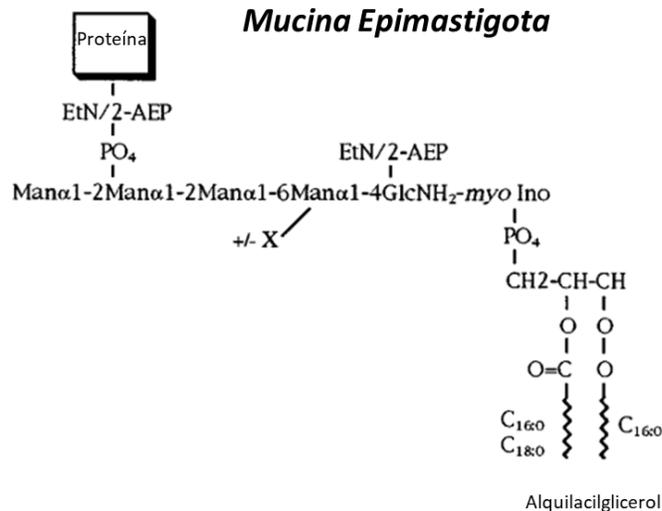


Figura 38. Estructura de Mucina de *T. cruzi* anclada a GPI. Extraído de referencia Acosta Serrano et. al. 1995

La purificación de mucinas de *T. cruzi* en estadio epimastigota de la cepa Dm28c se realizó como se detalla en el capítulo de Materiales y Métodos de acuerdo a lo previamente reportado por Acosta Serrano et al. 1995 con algunas modificaciones³⁹. Brevemente, se realizó una extracción en una mezcla

de CHCl₃:MeOH:H₂O (1:2:0,8) y se rotaevaporó para llevar a sequedad. Luego se retomó en una mezcla de BuOH:H₂O (2:1) realizando una separación de fases. La fracción acuosa se rotaevaporó y liofilizó, y se retomó en un mínimo volumen de solución de 0,5% de 1-propanol en acetato de amonio 0,1 M (Buffer A). A continuación, se realizó una cromatografía hidrofóbica utilizando una matriz de octil-sefarosa, eluyendo con un gradiente de 1-propanol (0,5%-60%) con un volumen de 65,5 mL. De acuerdo a la bibliografía, se espera que las mucinas de *T. cruzi* en estadio epimastigota eluyan en una concentración de propanol 25% y se evidencien como dos bandas de 35 y 50 kDa en una electroforesis desnaturante³⁹. Las fracciones eluidas de la cromatografía hidrofóbica se analizaron por SDS-PAGE, al igual que por ensayos de reconocimientos por lectinas utilizando las lectinas ConA (con especificidad para Man/Glc), BS1-B4 (con especificidad para Gal) y SNA (con especificidad por Neu5Ac unido por enlace $\alpha(2,6)$ ¹⁶⁰¹⁶²¹⁵⁹¹⁶⁶. En la Figura 38 se muestran los resultados de las electroforesis SDS-PAGE teñidas con nitrato de plata de las fracciones obtenidas en la elución por gradiente de 1-propanol.

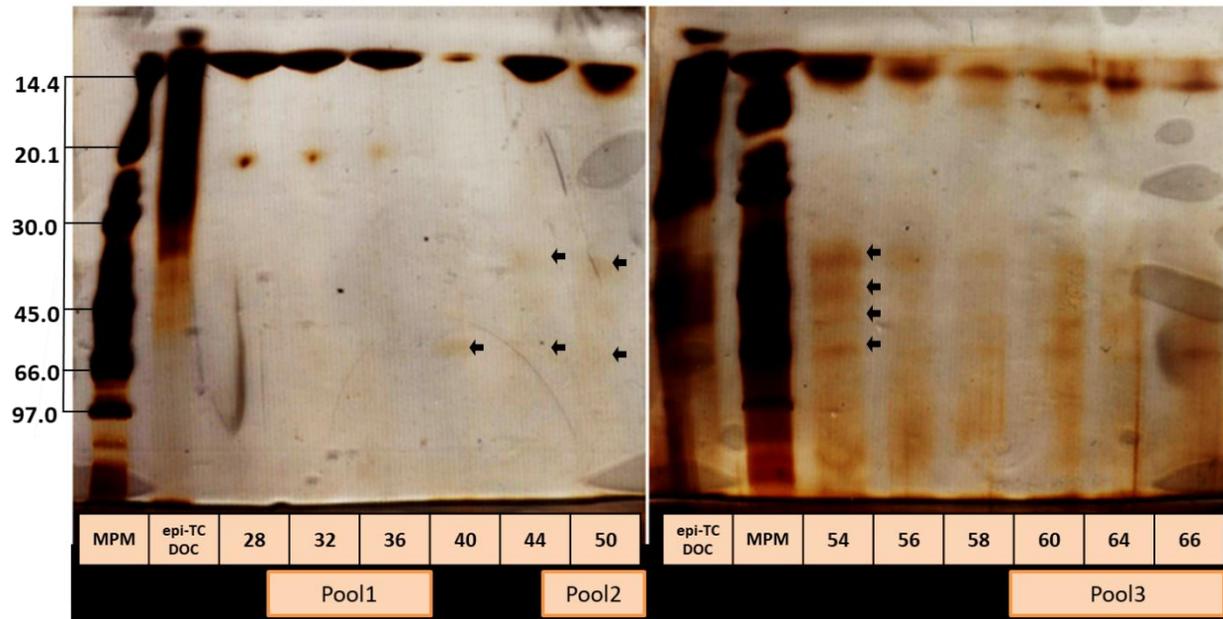


Figura 39. Electroforesis SDS-PAGE de mucinas purificadas a partir de la cepa Dm28c. Los números corresponden a las fracciones de la cromatografía. Los Pooles 1, 2 y 3 se utilizarán posteriormente y por eso los especificamos aquí.

Se puede observar un componente predominante de bajo peso molecular presente desde la fracción 28 hasta la 36. En la fracción 40 comenzó a observarse una banda muy tenue de entre 50 y 60 kDa, que podría corresponder a una de las bandas esperadas para las mucinas. A partir de la fracción 44

y hasta la 54 se pudieron apreciar bandas definidas con un peso molecular de entre 30 y 45 kDa que podrían corresponderse con la otra banda descrita para las mucinas de *T. cruzi* en estadio epimastigota. Finalmente, entre las fracciones 56 y 66 se observaron perfiles de *smears* poco definidos y se dejó de visualizar el componente de bajo peso molecular que se encuentra en el frente de corrida.

Por otro lado, en la Figura 40 se muestra la reactividad de las distintas fracciones eluidas utilizando diferentes lectinas.

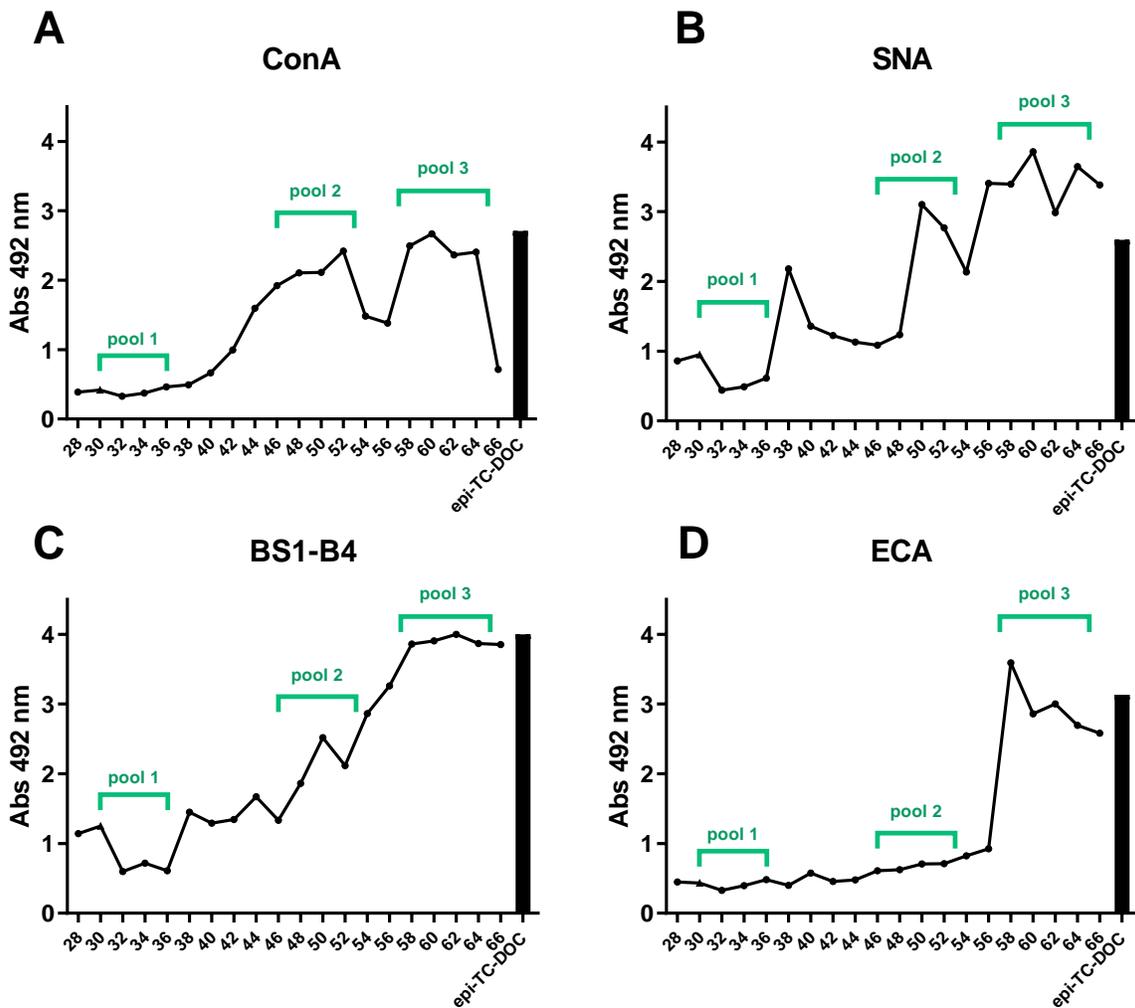


Figura 40. Evaluación de la reactividad por parte de lectinas de las diferentes fracciones obtenidas en la cromatografía realizada para purificar las mucinas de la cepa Dm28c de *T. cruzi*. Se sensibilizaron placas de ELISA con diluciones 1/20 de las fracciones de cromatografía y se incubaron con lectinas biotiniladas (ConA 0,4 µg/mL, SNA, BS1-B4 y ECA 10 µg/mL). A continuación, se incubaron con estreptavidina-peroxidasa, se revelaron con O-fenilendiamina y se midió A 492 nm. En corchetes se agrupan los diferentes pools, formados por las fracciones que presentan reconocimiento similar por ConA.

Las distintas fracciones mostraron una reactividad diferente con las distintas lectinas utilizadas y en función de esto las fracciones se agruparon en tres pooles. El Pool 1 corresponde a las fracciones 30 a 36 que eluyeron entre 17,5% y 20% de 1-propanol y presentaron baja reactividad con todas las lectinas utilizadas. Este pool lo utilizaremos como control negativo en los ensayos celulares posteriores. El Pool 2 incluye las fracciones 46 a 56 que eluyeron entre 24% y 28% de 1-propanol y que presentan una reactividad baja con ECA, moderada con SNA y BS1-B4, y alta con ConA. Finalmente, el Pool 3 se compone de las fracciones 56 a 66 que eluyeron entre 29% y 33% de 1-Propanol y mostraron una reactividad alta con las cuatro lectinas seleccionadas (Figura 40).

Es interesante resaltar que las proteínas correspondientes al Pool 2 presentaron un perfil electroforético similar al descrito para las mucinas de *T. cruzi* en estadio epimastigota y un fuerte reconocimiento por ConA, muy similar al observado con los lisados parasitarios totales, lo que concuerda con el hecho de que las mucinas son las glicoproteínas mayoritarias en los extractos de *T. cruzi*. Estos pooles fueron luego incubados con las células HEK-293 clásicas TLR4 y *Null*. Se evaluó su activación mediante ELISA de IL-8 normalizado por la viabilidad celular (MTT) (Figura 41).

De estos resultados podemos concluir que los Pooles 1 y 2 fueron capaces de activar exitosamente al mTLR4, de forma similar que el control positivo, el LPS. Para el Pool 3 se apreció una activación no significativa. La mayor activación del mTLR4 se obtuvo con el Pool 2, que es donde esperamos que se encuentren las mucinas, ya que estas fracciones eluyeron con un porcentaje de 1-Propanol de entre 24 y 28 %, coincidente con el reportado por Acosta Serrano et al. 1995 y además muestran un perfil de migración electroforético que podría corresponderse con los pesos moleculares reportados para las mucinas del estadio epimastigota ³⁹.

Resumiendo, estos resultados no conducen a concluir que las mucinas purificadas a partir de cultivos de epimastigotas de la cepa Dm28c activan al mTLR4. Estos resultados son prometedores y deberían ser profundizados. En este sentido, se propone evaluar qué parte o partes de las moléculas podrían estar participando de la activación del TLR. Para determinar si la porción glucídica de las mucinas es la responsable de esta activación, se deberían deglicosilar las mismas con diversas glicosidasas, de forma de evaluar si la remoción de glicanos específicos genera una disminución en dicha activación. Hay que tener en cuenta que las exoglicosidasas son eficientes para la liberación específica de monosacáridos terminales. Por lo tanto, en el caso de la α -manosidasa no podría hidrolizar las manosas que forman parte del puente entre la etanolamina y el fosfato en el anclaje a GPI de las mucinas. Este arreglo de glicanos solo tiene una manosa terminal unida por enlace α 1,2 mientras que la especificidad

reportada para la α -manosidasa de *B. thetaioiticron* es para manosas terminales unidas por enlaces α (1,3) (1,4) y (1,6) ¹⁴⁵. Alternativamente, se podría utilizar una α -manosidasa que hidrolizara manosas unidas por enlaces α (1,2).

HEK-293/mTLR4 + Mucinas purificadas DM28c

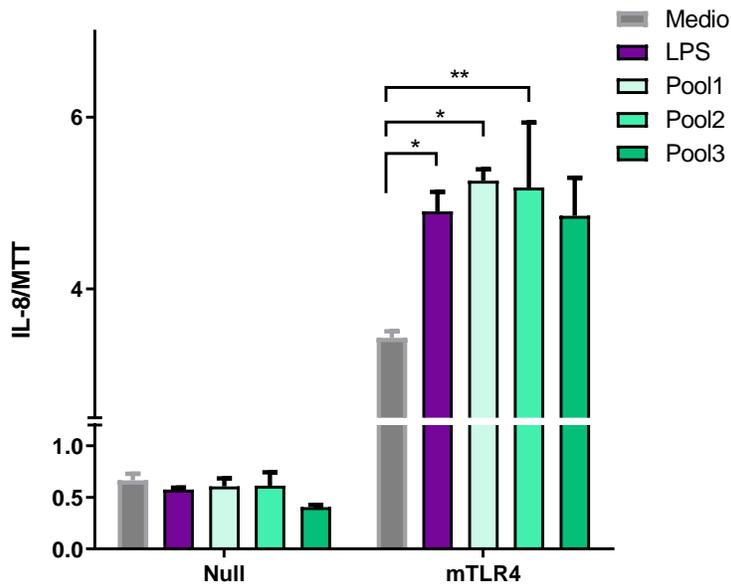


Figura 41. Activación de HEK-293/mTLR4 clásicas con las mucinas purificadas a partir de la cepa Dm28c. La línea *Null* corresponde al control de la línea mTLR4. 50.000 células en un volumen de 100 μ L/pocillo se incubaron durante 24 horas a 37°C y 5% CO₂. Al día siguiente, se agregaron el ligando de TLR4 (LPS) y las fracciones recolectadas correspondientes a los pooles 1, 2 y 3 en un volumen de 100 μ L/pocillo en medio de cultivo y se volvieron a incubar durante 24 horas a 37°C y 5% CO₂. Los resultados se muestran como el cociente de la producción de IL-8/viabilidad celular evaluada por MTT. Las diferencias significativas están indicadas por asteriscos, donde: *p<0.05, **p<0.01.

DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

Dado que los antecedentes de nuestro laboratorio reflejan una fuerte relación entre los mecanismos parasitarios de inmunoevasión y los utilizados por las células cancerosas, es de gran interés para nuestro grupo identificar moléculas inmunogénicas derivadas de estos parásitos que puedan ser utilizadas en un futuro como tratamiento inmunomodulador de tumores malignos. La evidencia otorgada por nuestro laboratorio, así como la bibliografía generada en las últimas décadas respecto a esta correlación del comportamiento cáncer/parásito, ofrecen una expectativa muy prometedora respecto a las nuevas tecnologías para el tratamiento del cáncer. De hecho, se ha reportado tanto para *T. cruzi* como para otros parásitos, como *Plasmodium*, que la infección parasitaria se relaciona con una menor incidencia de tumores malignos ⁷⁶. Por otra parte, la reprogramación del microambiente tumoral para aumentar las respuestas citotóxicas mediadas por el sistema inmune es actualmente un área de continuo estudio. En ese sentido, surge como estrategia interesante el uso de moléculas parasitarias como vacunas para el tratamiento del cáncer. Desde el punto de vista de la bioseguridad, trabajar con parásitos capaces de infectar tanto al paciente como al personal que lo manipula (que es el caso del estadio tripomastigota de *T. cruzi*), genera una limitación para el desarrollo de fármacos basados en este material biológico. Por este motivo, se optó por realizar esta investigación con el parásito *T. cruzi* en el estadio epimastigota, que es el cual se encuentra presente en el intestino del insecto vector y no es infectivo para el humano. Esto representa un escenario favorable para el estudio de moléculas inmunogénicas con capacidad antitumoral presentes en el parásito, pero en una etapa en la cual la bioseguridad presenta riesgos mínimos. Por otro lado, nuestra motivación principal en trabajar con las moléculas derivadas del epimastigota radica en el hecho de que estudios anteriores de nuestro grupo de investigación demostraron que el lisado parasitario de *T. cruzi* en estadio epimastigota mostró actividad anti-tumoral *in vivo*, y que al realizar una oxidación del mismo con metaperiodato, la misma se abole ^{100,186}. Esto llevó a la conclusión de que los carbohidratos participan en la inducción de esta protección antitumoral. Conjuntamente, evidenciamos que las células NK de los animales protegidos tenían una mayor activación. Por lo tanto, nos resultó importante determinar si los carbohidratos participan en el reconocimiento y posterior activación de receptores de la inmunidad innata, y en particular, nos focalizamos en su capacidad de inducir la señalización mediada por TLRs.

En esta Tesis de Maestría se buscó profundizar en la caracterización glicobiológica de componentes parasitarios de epimastigotas, en el desarrollo de herramientas basadas en glicosidasas inmovilizadas, y

en la identificación de carbohidratos importantes en la señalización de TLRs mediada por las moléculas parasitarias. Para ello, partimos de lisados parasitarios de cinco cepas diferentes (Dm28c, TcvT-1, Sylvio X10, Arse y Esmeraldo CL3) obtenidos en dos condiciones diferentes. En primer lugar, un lisado enriquecido en proteínas de membrana solubles en el detergente DOC, al cual llamamos epi-TC-DOC. Además, utilizamos lisados nativos enriquecidos en moléculas solubles, ya que en su procedimiento no se agregaron componentes que ayuden a la solubilidad de la muestra, que llamamos epi-TC-Nativo.

Para ahondar en los compuestos reconocidos por el sistema inmune innato fue muy importante trabajar con varias cepas parasitarias, ya que cada una de ellas presenta características únicas que podrían verse reflejadas en variaciones antigénicas reconocidas por los receptores innatos. Si bien los antecedentes del grupo fueron realizados exclusivamente con la cepa Dm28c, en esta etapa del proyecto fue de gran importancia profundizar en la ampliación del material biológico con potencial rol inmunomodulador. De hecho, en este trabajo se destacan las diferencias glicobiológicas de las cepas parasitarias, así como su diferente capacidad de inducir la señalización de TLRs. Particularmente, nuestros resultados sugieren que las manosas terminales presentes en la cepa Dm28c y TcvT-1 participan en la señalización del hTLR2, mientras que las fucosas participan en la del hTLR4. Actualmente las diferentes cepas de *T. cruzi* se clasifican en seis grupos bajo el sistema de DTU, que ofrece información sobre todo de la ubicación geográfica de la cual proviene cada cepa. Sin embargo, este sistema no refleja aspectos en común respecto a infectividad o virulencia, sino que estas características se estudian aparte. Es importante resaltar que la cepa Dm28c proviene de un aislado derivado de una zarigüeya (marsupial), mientras que la TcvT-1 proviene de un aislado canino, lo que podría explicar las diferencias encontradas entre ellos.

El estudio del rol que tienen los carbohidratos presentes en las diferentes cepas de *T. cruzi* respecto a la activación de TLRs, así como su caracterización básica fue realizada utilizando como herramienta fundamental el reconocimiento por parte de un amplio grupo de lectinas. Estas proteínas son capaces de reconocer con una gran especificidad motivos específicos de carbohidratos¹⁶¹, lo que permite utilizarlas en el laboratorio de forma similar a un anticuerpo, pudiendo adaptar para ello técnicas de biología molecular y celular como *Western Blot* y ELISA. Sin embargo, si bien las lectinas se clasifican de acuerdo al motivo carbohidrato que reconocen (ver Tabla 1), debe tenerse en cuenta que estas no presentan una especificidad única y que pueden reconocer diferentes motivos carbohidratos. Hay lectinas que reconocen un azúcar solamente en posición terminal, mientras que en otros casos también pueden reconocerlo incluso cuando no son terminales. Además, las lectinas también pueden reconocer

otros azúcares, dando reactividad cruzada, aunque en general estas reactividades secundarias se presentan con una menor afinidad. A su vez, la afinidad de una lectina por su ligando puede variar dependiendo del método utilizado para evaluarlo, dependiendo de aspectos como si el ligando se encuentra inmovilizado y la lectina soluble (como en ELLA), o la lectina inmovilizada y el ligando soluble (como en una cromatografía de afinidad). Por otro lado, la reactividad de las lectinas puede variar según su accesibilidad a los motivos carbohidratos que reconoce, como, por ejemplo, cuando la glicoproteína se encuentra desnaturalizada y/o separada en un gel de electroforesis, como es el caso del *Lectin Blot* y ELLA ^{160,168}.

Con esta herramienta pudimos evidenciar no solamente las diferencias que presentaron las cepas de *T. cruzi* respecto a sus carbohidratos, sino las diferencias que se dieron dentro de la misma cepa en diferentes lotes de cultivo. Esta variabilidad puede adjudicarse a factores como la fase de crecimiento en la que se encuentre el cultivo en el momento de la lisis, la morfología del mismo y la disponibilidad de carbohidratos del medio (comunicación personal María Laura Chiribao y Álvaro Pittini). En relación a la variabilidad en la expresión de motivos carbohidratos en la superficie de diferentes cepas, esto podría adjudicarse a la expresión diferencial entre ellas de moléculas relacionadas con el proceso de glicosilación, como glicosiltransferasas o transportadores de glucosa ^{34,187}. Como se puede ver, hay muchos elementos que pueden influir en el contenido de azúcares de la cubierta parasitaria, por lo que homogeneizar las condiciones tanto de cultivo como de almacenamiento, así como de preparación del lisado parasitarios son aspectos claves a profundizar como perspectiva de este trabajo.

De todas formas, si bien los motivos carbohidratos presentes en las glicoproteínas parasitarias mostraron este comportamiento variable, hubo algunas características evidenciadas por el reconocimiento de lectinas que siempre estuvieron presentes, como el fuerte reconocimiento de ConA y la ausencia de señal por Mal II. Principalmente, el reconocimiento de ConA es un aspecto que ha sido reportado en otros trabajos, donde se han purificado las glicoproteínas de *T. cruzi* exclusivamente por cromatografía de afinidad con esta lectina, lo que habla de la abundancia de manosas y/o glucosas en la cubierta de este parásito, independientemente de la cepa. Si bien ConA es capaz de reconocer tanto manosas como glucosas (aunque manosa con mayor afinidad), el reconocimiento de NPA, que es exclusivo de manosas ¹⁶⁵, estuvo presente con intensidad moderada, confirmando la presencia de manosas en el lisado parasitario. Cabe destacar que se ha reportado que el reconocimiento elevado de estas dos lectinas se ve aumentado en hepatocarcinoma celular respecto a tejidos sanos ¹⁸⁸, por lo que la presencia de estas estructuras carbohidratas ricas en manosas ofrecen un aspecto interesante de

estudio que vincula nuevamente los antígenos parasitarios con los de las células malignas. La presencia de estos motivos ricos en manosa toma importancia al evidenciar una pérdida del reconocimiento por parte de TLR2 humano frente a la demanosilación de lisados de *T. cruzi* inmunogénicos. Este aspecto fue sumamente interesante y se propone profundizar en la naturaleza de esta interacción como perspectiva de trabajo, analizando si existen cambios en la protección tumoral con lisados depletados de manosas y el comportamiento del sistema inmune frente a esta modificación, como se discute más adelante.

Cabe destacar que para llegar a estas conclusiones en el transcurso de esta tesis se desarrollaron herramientas específicas que involucran la inmovilización y optimización de glicosidasas en una variedad de soportes diferentes. De hecho, para determinar el efecto generado por la presencia o ausencia de un monosacárido específico dentro de una mezcla compleja de glicoconjugados, resulta fundamental el uso de las glicosidasas inmovilizadas descritas a lo largo de este trabajo. Estas enzimas permiten la remoción selectiva de los glicanos sin alterar la estructura proteica de las glicoproteínas, haciendo posible la evaluación de la muestra deglicosilada en ensayos biológicos ^{117,118}. A su vez, el hecho de que las glicosidasas estén inmovilizadas permiten separarlas por un simple proceso de filtración, centrifugación o aplicación de un imán, evitando así un paso de purificación posterior, ya que de no removerlas estas podrían interferir en los ensayos biológicos subsiguientes ¹¹⁶⁻¹¹⁸.

Sin embargo, el uso de estas herramientas implica un largo camino en el estudio de las condiciones óptimas para realizar estas deglicosilaciones de forma exitosa. En primer lugar, la elección de los soportes y la química de inmovilización son aspectos que deben ser considerados de acuerdo a las características de cada enzima al igual que a la aplicación para la que está destinada la muestra que va a ser deglicosilada. En nuestro caso se seleccionaron soportes inertes, de forma de minimizar la adsorción inespecífica y que pudieran ser funcionalizados con grupos reactivos que permitieran la inmovilización de la enzima en condiciones suaves, de forma de minimizar su posible inactivación durante el proceso de inmovilización. La activación con grupos cianato éster utilizando el agente cianilante CDAP ofrece esa posibilidad, ya que la inmovilización es efectiva a pH 7 y con tiempos de cuatro horas ¹²⁶. Por otro lado, teniendo en cuenta que nuestro objetivo era la deglicosilación de glicoproteínas, dado el carácter macromolecular de las mismas, la porosidad del soporte debía ser tomada en cuenta. Si bien los soportes porosos tienen la ventaja de que pueden proteger a la glicosidasa del medio de reacción cuando la misma se inmoviliza dentro del poro, esto puede dificultar el acceso del sustrato al sitio activo. Este efecto se vio incrementado en el caso de sustratos macromoleculares ^{129,130}. Esto quedó de manifiesto con las diferencias en las deglicosilaciones realizadas por PNGasa F inmovilizada en nanopartículas

magnéticas respecto a las nanopartículas de sílica. Si bien en ambos casos la PNGasa F se inmovilizó sobre un nanosoporte para los cuales está descripto una disminución de las limitaciones difusionales, una posible explicación de los resultados obtenidos es que las nanopartículas de sílica tengan un grado de porosidad ^{133,134}. Esto podría haber dificultado el acceso de los glicanos parasitarios al sitio activo de la enzima de forma de poder ser liberados. En el caso del resto de las enzimas utilizadas, todas ellas fueron exoglicosidasas, por lo que utilizar un soporte como la agarosa no resultó perjudicial para su actividad enzimática. En estos casos el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima no se ve tan restringido, por su ubicación más superficial en comparación con el sitio de corte que tienen las endoglicosidasas.

Otro aspecto importante a tener en cuenta al momento de inmovilizar enzimas en soportes sólidos es el rendimiento de este proceso, donde se busca maximizar la cantidad de enzima activa unida al soporte. Esto va a depender de la capacidad del soporte, la cual viene dada por el grado de activación del mismo y de la carga enzimática ofrecida al mismo al igual que del grado de inactivación parcial que la misma pudiera sufrir durante el proceso de inmovilización. Dado que el objetivo central de este trabajo no era la optimización en sí del proceso de inmovilización, sino la aplicación de la enzima inmovilizada, nos basamos en la experiencia previa de nuestro grupo de investigación ^{116-118,126}. Para asegurarnos de la efectividad de los procesos de deglicosilación los mismos se realizaron a 37°C durante 24 hs y bajo agitación excepto para la β -galactosidasa la cual se realizó a temperatura ambiente. Dado que la enzima se encuentra inmovilizada la agitación favorece el acceso del sustrato al sitio activo y al trabajar a 37°C nos acercamos a la temperatura óptima de la mayoría de las enzimas sin comprometer la estabilidad de las glicoproteínas de los lisados parasitarios.

En este trabajo se realizó la deglicosilación de lisados de *T. cruzi* con cinco glicosidasas inmovilizadas consiguiendo una deglicosilación efectiva con tres de ellas (PNGasa, α -manosidasa y α -fucosidasa). El seguimiento del proceso de deglicosilación se realizó evaluando cambios en el reconocimiento de lectinas por los glicanos de los lisados parasitarios, con especificidad para el reconocimiento del glicano removido por cada glicosidasa. Se pudo identificar la presencia de manosa y fucosa en los mismos, pero no de galactosa unida por enlaces β . En el caso del ácido siálico los resultados no fueron concluyentes ya que, si bien los lisados son reconocidos por lectinas específicas para ácido siálico, el reconocimiento no cambia luego de su tratamiento con neuraminidasa con especificidad para la hidrólisis de Neu5Ac terminal unido tanto por enlaces α 2,6 y α 2,3.

Por otro lado, en esta tesis pudimos concluir que los residuos de manosas y fucosas terminales del lisado de Dm28c y TcvT-1 de *T. cruzi* son esenciales en la activación del hTLR2 y hTLR4, respectivamente. Estudios anteriores han demostrado que la activación de TLRs por parte de moléculas presentes de *T. cruzi* se ve abolido en mayor medida cuando se bloquea la activación de moléculas comunes a la señalización de diferentes TLRs, implicando a más de un solo TLR en este proceso ¹⁸⁹. Por ello, resulta interesante proponer como perspectiva de este trabajo el estudiar del efecto *in vivo* de la protección tumoral de estos lisados demanosilados y defucosilados. Es importante destacar que la fucosa es un carbohidrato que se expresa en patógenos como *Helicobacter pylori* y parásitos helmintos como *Schistosoma mansoni*, y se ha correlacionado este hecho con la capacidad de estos organismos para inhibir las respuestas T_H1 ¹⁹⁰ o incluso conducir la diferenciación TH hacia respuestas T_H2 ^{191,192}. Sin embargo, aún no se ha logrado identificar con certeza las rutas involucradas en la inducción de estas respuestas, aunque se propone que el receptor específico de carbohidratos (CLR) DC-SIGN pueda estar involucrado en dicho efecto ¹⁹⁰. Por ello, estudiar la activación de TLR4 por la presencia de PAMPs fucosilados resulta un horizonte innovador de estudio.

Cabe destacar que los modelos celulares utilizados en este trabajo para estudiar la activación de diferentes TLRs, tanto las células HEK293 como las HEK-*Blue* transfectadas con TLRs permiten analizar estas respuestas de forma aislada. Este aspecto es sumamente relevante ya que permite adjudicar las respuestas observadas en una posible célula innata, como las presentadoras de antígenos, a la interacción con un único receptor. Aunque nuestro modelo detecta la activación (señalización) del TLR en estudio y no la interacción con el ligando, para que exista la primera debe estar presente la segunda, por lo que es una forma indirecta de estudiar este fenómeno. De todas formas, para ahondar en el estudio de la interacción directa de estos PAMPs carbohidratos con los TLRs blanco, proponemos realizar marcaciones del lisado con una sonda fluorescente conjugada a proteínas parasitarias (como sus grupos amino, por ejemplo) y estudiar su interacción con las células que sobrepresan el hTLR2, analizándolo por microscopía de inmunofluorescencia. También se proponen ensayos de bloqueo utilizando anticuerpos neutralizantes de los hTLR2 y 4 y analizar si se abole el efecto de señalización. Por último, un aspecto que nos resulta importante resaltar es que el sistema de estudio de señalización de TLR utilizado en esta tesis resulta una gran ventaja para identificar receptores determinados que inducen la señalización de ligandos. De hecho, los leucocitos, especialmente los pertenecientes a la inmunidad innata como los macrófagos, neutrófilos y células dendríticas mieloides, expresan una gran variedad de TLRs además de los TLR 2 y 4 así como receptores específicos de carbohidratos (CLRs) ⁴¹. Por

otro lado, el TLR4 puede también expresarse por linfocitos B murinos y en células epiteliales intestinales⁴⁸.

Tanto el TLR2 como el TLR4 se encuentran ubicados en la membrana plasmática de la célula, por lo cual pueden censar e interactuar con PAMPs de origen fundamentalmente extracelular secretados o presentados en la superficie de patógenos. El TLR2 responde a PAMPs que contienen lípidos, como el ácido lipoteicoico y lipopéptidos que contienen cisteínas di- y tri-aciladas¹⁹³. Interesantemente, el GPI de *T. cruzi* también ha sido reportado como agonista de TLR2, por lo que nuestros resultados aportarían además a señalar el papel de los residuos de manosa en esta interacción⁶⁰. Por su parte, el TLR4 tiene como agonista fundamental al lipopolisacárido de bacterias gram-negativas, aunque también puede responder a algunas bacterias gram-positivas, al níquel, al ácido palmítico, a proteínas virales y a proteínas propias como la lipoproteína de baja densidad (LDL), por lo que su repertorio de reconocimiento es muy amplio, ya que no posee un patrón molecular restringido de activadores¹⁹⁴. Como se comentó en el capítulo de resultados, los datos sobre la activación de TLR4 por ligandos de *T. cruzi* es más controversial, y no hay evidencia tan robusta como para el TLR2. Sin embargo, el hecho de que la remoción de las fucosas del lisado genere una menor señal de activación del TLR4 indica que ésta es específica, aunque la determinación o remoción de endotoxinas debería realizarse para confirmar estos resultados. De todas formas, la activación de ambos receptores desencadena vías de señalización que concluyen en la activación del factor de transcripción NF- κ B, que tiene un rol fundamental en iniciar procesos inflamatorios en las células del sistema inmune, como la secreción de las citoquinas de fase aguda TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-18.

Actualmente la mayor evidencia del éxito de ligandos agonistas de TLR4 para el tratamiento de cáncer en la clínica, está dada por el uso de la vacuna de Bacillus Calmette – Guérin (BCG)¹⁹⁵ en la terapia del cáncer de vejiga¹⁹⁶, aunque también hay reportes sobre la utilización de ligandos TLR4 / TLR2 para el tratamiento del carcinoma oral de células escamosas¹⁹⁷, cáncer gástrico¹⁹⁸, cáncer de vejiga¹⁹⁹ y cáncer de cuello uterino²⁰⁰ con la preparación estreptocócica liofilizada OK 432²⁰¹. En todos los casos, estos reportes muestran el efecto inmunomodulador de diferentes PAMPs en el contexto del cáncer en un organismo completo con su sistema inmune funcionando de forma integrada. Es de gran interés para nuestro grupo estudiar estos procesos utilizando los extractos de *T. cruzi* como agente inmunoterapéutico en un sistema *in vivo*, ya que en este trabajo se optó por estudiar los procesos de activación de TLRs en un sistema celular *in vitro* que dista de las condiciones *in vivo*. De hecho, aún si estudiáramos leucocitos humanos o murinos, la diversidad de receptores presentes en éstos es enorme

y su expresión relativa cambia con el tipo celular y con las condiciones (inflamatorias o no) en que se encuentren los mismos. En este caso, el sistema de estudio *in vivo* predilecto para este tipo de actividades experimentales se basa en modelos murinos, que cuentan con numerosas ventajas a nivel práctico, aunque la extrapolación de resultados obtenidos en estos modelos y lo que ocurre en el humano debe ser interpretado con precaución. Otra alternativa sería estudiar leucocitos innatos, como M ϕ y DCs diferenciados *in vitro* a partir de precursores de la médula ósea de ratones deficientes en determinados TLRs.

Por último, se resalta el hecho que, en este trabajo, si bien se trata de un sistema de estudio artificial, se tuvieron en cuenta las diferencias que pueden tener los TLRs de diferentes especies, especialmente en este caso en los dominios de reconocimiento ricos en leucina (LRRs). Como se muestra en la Figura 42, los TLRs son moléculas relativamente conservadas en estos dominios, pero presentan regiones variables que impactan en el reconocimiento de patógenos de forma diferencial²⁰². Por este motivo el trabajo con líneas celulares que sean capaces de brindar información en ese sentido es un aspecto que enriquece enormemente los resultados obtenidos, ya que se acerca a lo que ocurre en el sistema inmune de los humanos y por lo tanto da evidencia de las interacciones receptor-ligando que ocurren en nuestra especie.

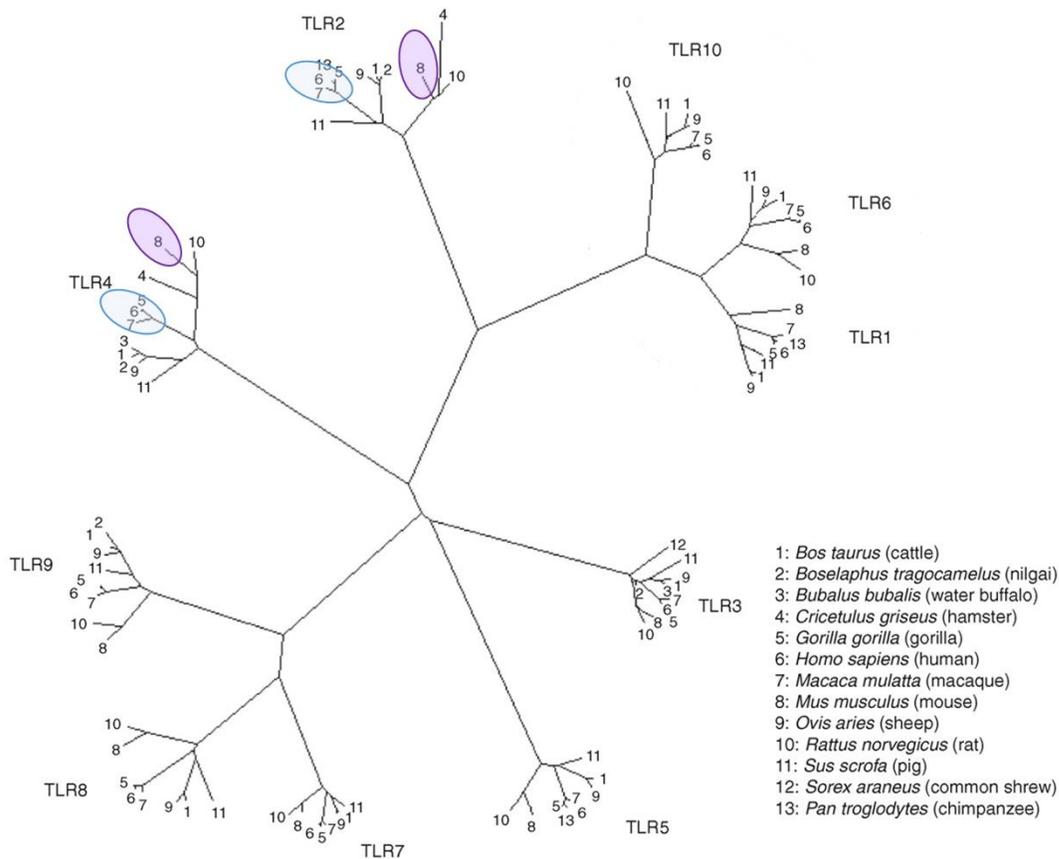


Figura 42. Árbol molecular de asociación de diferentes especies con la especificidad de los dominios extracelulares de los TLR de mamíferos. Las longitudes de las ramas representan el grado de divergencia. En violeta están marcados los TLRs de interés murino y en azul humanos. Modificado de <https://sci-hub.se/10.1016/j.it.2008.12.001>

Estas divergencias en la evolución de los dominios de reconocimiento de los TLRs podrían explicar cómo en nuestro caso se evidenció que las fucosas de *T. cruzi* influyen en la activación del TLR4 humano, mientras que en el modelo murino no hubo cambios ante esta remoción. Hasta el momento no existe bibliografía respecto al reconocimiento de fucosas por TLR4, por lo que estos resultados muestran un perfil de los TLRs aún no explorado y con perspectivas interesantes a desarrollar. De hecho, prácticamente no hay información sobre el rol que cumplen los carbohidratos en el reconocimiento por parte de estos receptores, por lo que la evidencia en este sentido constituye un resultado innovador e importante de seguir profundizando. Paradójicamente, esto llama la atención ya que los TLRs son los receptores de la inmunidad innata mejor caracterizados hasta el momento. En efecto, los receptores por excelencia específicos de motivos carbohidratos provenientes de patógenos son los receptores de lectina tipo C (CLRs), que también son receptores de reconocimiento de patrones moleculares de patógenos de la inmunidad innata ²⁰³. Sin embargo, este aspecto no pudo ser explorado ya que no se

encuentran comercialmente disponibles células que expresen diferencialmente CLRs. Una alternativa para poder abordar esta estrategia, sería utilizar porciones recombinantes que contengan el dominio de reconocimiento de carbohidratos de estos receptores y analizar si reconocen o no al lisado, como ya lo ha realizado nuestro grupo previamente con lisados parasitarios provenientes del parásito helminto *Fasciola hepática*^{204,205}. Sin embargo, este tipo de abordaje no nos daría información sobre el efecto de su posible señalización.

Como una estrategia alternativa en la evaluación del rol de los glicanos parasitarios en la activación de receptores de tipo TLR se purificaron las mucinas de cultivos epimastigotas de Dm28c. Estas demostraron activar el TLR4 murino, por lo que sería interesante evaluar que parte o partes de la molécula podrían estar participando en la activación. Una posible estrategia sería proceder a la deglicosilación selectiva de las mucinas purificadas para evaluar el rol de los glicanos en dicha activación. En ese sentido, sería interesante también evaluar la relevancia de la inmunización de ratones con estos purificados demanosilados y defucosilados *in vivo*, y estudiar la protección antitumoral que puedan ofrecer estas glicoproteínas.

CONCLUSIONES FINALES

En conclusión, en esta tesis de Maestría generamos herramientas basadas en glicosidasas inmovilizadas para la determinación de la actividad biológica de una mezcla compleja de proteínas parasitarias, realizamos una caracterización glicobiológica de lisados de *T. cruzi* provenientes de diferentes cepas parasitarias y determinamos el papel fundamental de las manosas y fucosas presentes en un lisado de *T. cruzi* con propiedades anti-tumorales en la activación del hTLR2 y hTLR4, respectivamente, en ligandos presentes en un lisado de *T. cruzi* con actividad anti-tumoral. Por último, resulta importante destacar la interdisciplinariedad de este trabajo y la gran riqueza en mi formación de posgrado gracias a la diferente especialización de mis orientadoras, así como a la gran variedad de técnicas y metodologías de bioquímica, biología celular e inmunología realizadas durante esta tesis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lidani, K. C. F. *et al.* Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Front. Public Heal.* **7**, 166 (2019).
2. Medone, P., Balsalobre, A., Rabinovich, J. E., Marti, G. A. & Menu, F. Life History Traits and Demographic Parameters of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) Fed on Human Blood. *J. Med. Entomol.* **52**, 1282–1290 (2015).
3. Rassi, A., Rassi, A. & Marcondes de Rezende, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect. Dis. Clin. North Am.* **26**, 275–291 (2012).
4. Roberto Salvatella. *Chagas en Uruguay, 1937-2016: Información básica para su prevención, control y atención.* (2016).
5. Morillo T, Vos Saus R. La enfermedad de Chagas (trypanosomiasis americana). *La Medicina colonial.* **26(2)** 146-161(1955).
6. Rassi, A., Rassi, A. & Little, W. C. Chagas' Heart Disease. *Clin. Cardiol.* **23**, 883–889 (2000).
7. Marin-Neto, J. A., Cunha-Neto, E., Maciel, B. C. & Simões, M. V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* **115**, 1109–1123 (2007).
8. Vianna Martins, A. *et al.* Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. *Infectio* **16**, 45–58 (2012).
9. Tomasini, N. Introgression of the Kinetoplast DNA: An Unusual Evolutionary Journey in *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Genomics* **19**, 133 (2018).
10. Messenger, L. A., Miles, M. A. & Bern, C. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **13**, 995 (2015).
11. Quebrada Palacio, L. P. *et al.* Phenotypic diversity and drug susceptibility of *Trypanosoma cruzi* TcV clinical isolates. *PLoS One* **13**, (2018).
12. Acosta, H. *et al.* Proteomic analysis of glycosomes from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **229**, 62 (2019).
13. Pereira, M. G. *et al.* *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes Are Able to Store and Mobilize High Amounts of Cholesterol in Reservosome Lipid Inclusions. *PLoS One* **6**, (2011).
14. El-Sayed, N. M. *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of chagas disease. *Science (80-)*. **309**, (2005).
15. Zingales, B. *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect. Genet. Evol.* **12**, 240–253 (2012).
16. Zingales, B. *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **104**, 1051–1054 (2009).
17. Goldenberg, S. *et al.* Facts and hypothesis on *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **79**, 39–44 (1984).

18. Grisard, E. C. *et al.* Trypanosoma cruzi Clone Dm28c Draft Genome Sequence. *Genome Announc.* **2**, (2014).
19. Franzén, O. *et al.* Shotgun Sequencing Analysis of Trypanosoma cruzi I Sylvio X10/1 and Comparison with T. cruzi VI CL Brener. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **5**, e984 (2011).
20. Patel, J. M. *et al.* Isolation, mouse pathogenicity, and genotyping of Trypanosoma cruzi from an English Cocker Spaniel from Virginia, USA. *Vet. Parasitol.* **187**, 394–398 (2012).
21. Data Set Trypanosoma cruzi strain Esmeraldo Genome Sequence. <https://veupathdb.org>
22. da Fonseca, L. M. *et al.* Theft and Reception of Host Cell's Sialic Acid: Dynamics of Trypanosoma Cruzi Trans-sialidases and Mucin-Like Molecules on Chagas' Disease Immunomodulation. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
23. Julia, M. *et al.* Comprehensive glycoprofiling of the epimastigote and trypomastigote stages of Trypanosoma cruzi. *J. Proteomicstic Røssel* doi:10.1016/j.jprot.2016.05.034. (2016).
24. De Souza, W., Martinez-Palomo, A. & Gonzalez-Robles, A. The cell surface of Trypanosoma cruzi: cytochemistry and freeze-fracture. *J. Cell Sci.* **33**, 285–299 (1978).
25. Buscaglia, C. A., Campo, V. A., Frasch, A. C. C. & Di Noia, J. M. Trypanosoma cruzi surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 229–236 (2006).
26. Alves, M. J. M. & Colli, W. Glycoproteins from trypanosoma cruzi: partial purification by gel chromatography. *FEBS Lett.* **52**, 188–190 (1975).
27. Nogueira, N. F. S. *et al.* Trypanosoma cruzi: Involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the luminal midgut surface of Rhodnius prolixus. *Exp. Parasitol.* **116**, 120–128 (2007).
28. MacRae, J. I. *et al.* The suppression of galactose metabolism in Trypanosoma cruzi epimastigotes causes changes in cell surface molecular architecture and cell morphology. *Mol. Biochem. Parasitol.* **147**, 126–136 (2006).
29. Ciavaglia, M. do C., De Carvalho, T. U. & De Souza, W. Interaction of Trypanosoma cruzi with Cells with Altered Glycosylation Patterns. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193**, 718–721 (1993).
30. RUIZ, R. D. C., RIGONI, V. L., GONZALEZ, J. & YOSHIDA, N. The 35/50 kDa surface antigen of Trypanosoma cruzi metacyclic trypomastigotes, an adhesion molecule involved in host cell invasion. *Parasite Immunol.* **15**, 121–125 (1993).
31. Risso, M. G. *et al.* Differential expression of a virulence factor, the trans-sialidase, by the main Trypanosoma cruzi phylogenetic lineages. *J. Infect. Dis.* **189**, 2250–2259 (2004).
32. Acosta-Serrano, A., Almeida, I. C., Freitas-Junior, L. H., Yoshida, N. & Schenkman, S. The mucin-like glycoprotein super-family of Trypanosoma cruzi: structure and biological roles. *Mol. Biochem. Parasitol.* **114**, 143–150 (2001).
33. Acosta-Serrano, A., Almeida, I. C. & Carrington, M. Comparison and Evolution of the Surface Architecture of Trypanosomatid Parasites. (2007).
34. Giorgi, M. E. & de Lederkremer, R. M. The Glycan Structure of T. cruzi mucins Depends on the Host. Insights on the Chameleonic Galactose. *Mol.* **2020**, Vol. 25, Page 3913 **25**, 3913 (2020).

35. Almeida, I. C., Milani, S. R., Gorin, P. A. & Travassos, L. R. Complement-mediated lysis of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes by human anti-alpha-galactosyl antibodies. *J. Immunol.* **146**, (1991).
36. Avila, J. L., Rojas, M. & Galili, U. Immunogenic Gal alpha 1----3Gal carbohydrate epitopes are present on pathogenic American *Trypanosoma* and *Leishmania*. *J. Immunol.* **142**, (1989).
37. S R, M. & L R, T. Anti-alpha-galactosyl antibodies in chagasic patients. Possible biological significance - PubMed. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 1275–1286 (1988).
38. GAZZINELU, R. T., PEREIRA, M. E. S., ROMANHA, A., GAZZINELLI, G. & BRENER, Z. Direct lysis of *Trypanosoma cruzi*: a novel effector mechanism of protection mediated by human anti-gal antibodies. *Parasite Immunol.* **13**, 345–356 (1991).
39. Serrano, A. A. *et al.* The lipid structure of the glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like sialic acid acceptors of *Trypanosoma cruzi* changes during parasite differentiation from epimastigotes to infective metacyclic trypomastigote forms. *J. Biol. Chem.* **270**, 27244–27253 (1995).
40. McComb, S., Thiriot, A., Akache, B., Krishnan, L. & Stark, F. Introduction to the Immune System. *Methods Mol. Biol.* **2024**, 1–24 (2019).
41. Hato, T. & Dagher, P. C. How the Innate Immune System Senses Trouble and Causes Trouble. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **10**, 1459–1469 (2015).
42. Yatim, K. M. & Lakkis, F. G. A brief journey through the immune system. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **10**, 1274–1281 (2015).
43. Hillion, S. *et al.* The Innate Part of the Adaptive Immune System. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **58**, 151–154 (2020).
44. El-Zayat, S. R., Sibaii, H. & Mannaa, F. A. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bull. Natl. Res. Cent.* 2019 431 **43**, 1–12 (2019).
45. Satoh, T. & Akira, S. Toll-Like Receptor Signaling and Its Inducible Proteins. *Microbiol. Spectr.* **4**, (2016).
46. Kawai, T. & Akira, S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1143**, 1–20 (2008).
47. Celhar, T., Magalhães, R. & Fairhurst, A. M. TLR7 and TLR9 in SLE: when sensing self goes wrong. *Immunol. Res.* **53**, 58–77 (2012).
48. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **11**, 373–384 (2010).
49. Leifer, C. A. & Medvedev, A. E. Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling. *J. Leukoc. Biol.* **100**, 927–941 (2016).
50. Théry, C. & Amigorena, S. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 45–51 (2001).
51. Murray, P. J. Macrophage Polarization. *Annu. Rev. Physiol.* **79**, 541–566 (2017).
52. Cardillo, F., De Pinho, R. T., Antas, P. R. Z. & Mengel, J. Immunity and immune modulation in

- Trypanosoma cruzi infection. *Pathog. Dis.* **73**, (2015).
53. Kayama, H. & Takeda, K. The innate immune response to Trypanosoma cruzi infection. *Microbes Infect.* **12**, 511–517 (2010).
 54. Vespa, G. N. R., Cunha, F. Q. & Silva, J. S. Nitric oxide is involved in control of Trypanosoma cruzi-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect. Immun.* **62**, 5177–5182 (1994).
 55. Graefe, S. E. B. *et al.* Interleukin-12 but not interleukin-18 is required for immunity to Trypanosoma cruzi in mice. *Microbes Infect.* **5**, 833–839 (2003).
 56. F, T. *et al.* Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute Trypanosoma cruzi infection in mice - PubMed. *J. Immunol.* 3626-3632M (1991).
 57. Hölscher, C. *et al.* Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of Trypanosoma cruzi-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect. Immun.* **66**, 1208–1215 (1998).
 58. M M, C., A C, A., I C, A., L R, T. & R T, G. Glycoconjugates isolated from Trypanosoma cruzi but not from Leishmania species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages - PubMed. *J. Immunol.* 6131–6139 (1977).
 59. M M, C. *et al.* Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from Trypanosoma cruzi trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages - PubMed. *J. Immunol.* 5890–5901 (1977).
 60. Campos, M. A. S. *et al.* Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J. Immunol.* **167**, 416–423 (2001).
 61. Almeida, I. C. & Gazzinelli, R. T. Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from Trypanosoma cruzi: structural and functional analyses. *J. Leukoc. Biol.* **70**, 467–477 (2001).
 62. Ouaisi, A. *et al.* The Trypanosoma cruzi Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection. *J. Immunol.* **168**, 6366–6374 (2002).
 63. Oliveira, A.-C. *et al.* Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to Trypanosoma cruzi glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with T. cruzi. *J. Immunol.* **173**, 5688–5696 (2004).
 64. Trinchieri, G. & Sher, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 179–190 (2007).
 65. Shoda, L. K. M. *et al.* DNA from protozoan parasites Babesia bovis, Trypanosoma cruzi, and T. brucei is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide. *Infect. Immun.* **69**, 2162–2171 (2001).
 66. Drennan, M. B. *et al.* The induction of a type 1 immune response following a Trypanosoma brucei infection is MyD88 dependent. *J. Immunol.* **175**, 2501–2509 (2005).
 67. Silva, G. K. *et al.* Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against Trypanosoma cruzi infection. *J. Immunol.* **184**, 1148–1152 (2010).

68. Ruiz, R. C. *et al.* Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. *Biochem. J.* **330 (Pt 1)**, 505–511 (1998).
69. Vázquez, A. *et al.* Mouse Macrophage Galactose-type Lectin (mMGL) is Critical for Host Resistance against *Trypanosoma cruzi* Infection. *Int. J. Biol. Sci.* **10**, 909 (2014).
70. Akgül, H. *et al.* Echinococcus against cancer: why not? *Cancer* **98**, 1999–2000 (2003).
71. Plumelle, Y. *et al.* Effect of *Strongyloides stercoralis* infection and eosinophilia on age at onset and prognosis of adult T-cell leukemia. *Am. J. Clin. Pathol.* **107**, 81–87 (1997).
72. Garcia, S. B. *et al.* A retrospective study of histopathological findings in 894 cases of megacolon: what is the relationship between megacolon and colonic cancer? *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **45**, 91–93 (2003).
73. da Silveira, A. B. M. *et al.* Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. *Hum. Pathol.* **38**, 1256–1264 (2007).
74. Oliveira, E. C. *et al.* Chronic *Trypanosoma cruzi* infection associated with low incidence of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. *Carcinogenesis* **22**, 737–740 (2001).
75. Hunter, C. A. *et al.* Cutting edge: systemic inhibition of angiogenesis underlies resistance to tumors during acute toxoplasmosis. *J. Immunol.* **166**, 5878–5881 (2001).
76. Chen, L. *et al.* Antitumor Effect of Malaria Parasite Infection in a Murine Lewis Lung Cancer Model through Induction of Innate and Adaptive Immunity. *PLoS One* **6**, e24407 (2011).
77. Baird, J. R. *et al.* Immune-mediated regression of established B16F10 melanoma by intratumoral injection of attenuated *Toxoplasma gondii* protects against rechallenge. *J. Immunol.* **190**, 469–478 (2013).
78. Baird, J. R. *et al.* Avirulent *Toxoplasma gondii* generates therapeutic antitumor immunity by reversing immunosuppression in the ovarian cancer microenvironment. *Cancer Res.* **73**, 3842–3851 (2013).
79. Chen, L. *et al.* Antitumor effect of malaria parasite infection in a murine Lewis lung cancer model through induction of innate and adaptive immunity. *PLoS One* **6**, (2011).
80. G. Roskin. Toxin Therapy of Experimental Cancer. The Influence of Protozoan Infections upon Transplanted. *Cancer Res* **6 (7)**, 363–365. (1946).
81. Ramírez-Toloza, G., Abello, P. & Ferreira, A. Is the antitumor property of *trypanosoma cruzi* infection mediated by its calreticulin? *Front. Immunol.* **7**, 268 (2016).
82. Cabral, H. R. A. The tumoricidal effect of *Trypanosoma cruzi*: its intracellular cycle and the immune response of the host. *Med. Hypotheses* **54**, 1–6 (2000).
83. Mel'nikov, V. G., Fierro Velasco, F. H. & Dobrovinskaya, O. R. Suppression of growth and metastasizing of T-cell lymphoma in mice infected with american trypanosomiasis at different stages of experimental infection. *Bull. Exp. Biol. Med.* **137**, 475–478 (2004).
84. Sheklakova, L. A., Kallinikova, V. D. & Karpenko, L. P. Genetic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* and its direct anticancer effect in cultured human tumor cells. *Bull. Exp. Biol. Med.* **135**, 89–92

- (2003).
85. Mucci, J., Risso, M. G., Leguizamón, M. S., Frasch, A. C. C. & Competella, O. The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* triggers apoptosis by target cell sialylation. *Cell. Microbiol.* **8**, 1086–1095 (2006).
 86. Atayde, V. D., Jasiulionis, M. G., Cortez, M. & Yoshida, N. A recombinant protein based on *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp82 induces apoptotic cell death in melanoma cells. *Melanoma Res.* **18**, 172–183 (2008).
 87. Molina, M. C. *et al.* An in vivo role for *Trypanosoma cruzi* calreticulin in antiangiogenesis. *Mol Biochem Parasitol.* **140(2)**, 133-140 (2005).
 88. López, N. C. *et al.* Antiangiogenic and Antitumor Effects of *Trypanosoma cruzi* Calreticulin. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**, (2010).
 89. Zenina, A. V. *et al.* The study of immunological component in antitumor effect of *Trypanosoma cruzi*. *Bull. Exp. Biol. Med.* **145**, 352–354 (2008).
 90. Damian, R. T. Parasite immune evasion and exploitation: reflections and projections. *Parasitology* **115 Suppl**, 169–175 (1997).
 91. Persat, F., Vincent, C., Schmitt, D. & Mojon, M. Inhibition of human peripheral blood mononuclear cell proliferative response by glycosphingolipids from metacestodes of *Echinococcus multilocularis*. *Infect. Immun.* **64**, 3682–3687 (1996).
 92. Hokke, C. H. & Deelder, A. M. Schistosome glycoconjugates in host-parasite interplay. *Glycoconjugate J.* **2001 188 18**, 573–587 (2001).
 93. Noya, V. *et al.* Mucin-like peptides from *Echinococcus granulosus* induce antitumor activity. *Int. J. Oncol.* **43**, 775–784 (2013).
 94. Berriel, E. *et al.* Antitumor Activity of Human Hydatid Cyst Fluid in a Murine Model of Colon Cancer. *Sci. World J.* **2013**, (2013).
 95. Osinaga, E. Expression of cancer-associated simple mucin-type O-glycosylated antigens in parasites. *IUBMB Life* **59**, 269–273 (2007).
 96. Alvarez Errico, D. *et al.* O-glycosylation in *Echinococcus granulosus*: identification and characterization of the carcinoma-associated Tn antigen. *Exp. Parasitol.* **98**, 100–109 (2001).
 97. Freire, T., Casaravilla, C., Carmona, C. & Osinaga, E. Mucin-type O-glycosylation in *Fasciola hepatica*: characterisation of carcinoma-associated Tn and sialyl-Tn antigens and evaluation of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase activity. *International Journal for Parasitology* **33**, 47–56 (2003).
 98. 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. *The Journal of Parasitology* **89**, 709-714 (2003).
 99. Ubillos, L. *et al.* Characterization of the carcinoma-associated Tk antigen in helminth parasites. *Exp. Parasitol.* **116**, 129–136 (2007).

100. Ubillos, L. *et al.* Trypanosoma cruzi extracts elicit protective immune response against chemically induced colon and mammary cancers. *Int. J. cancer* **138**, 1719–1731 (2016).
101. Ubillos, L. Respuesta inmune protectora contra el desarrollo de cáncer de colon y mama inducidos químicamente en rata utilizando extractos de Trypanosoma. 1–62 (2015).
102. Boscardin, S. B. *et al.* Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. *J. Cell. Mol. Med.* **14**, 1373–1384 (2010).
103. Bafica, A. *et al.* Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in Trypanosoma cruzi infection. *J. Immunol.* **177**, 3515–3519 (2006).
104. Bonmort, M. *et al.* Killer dendritic cells: IKDC and the others. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 558–565 (2008).
105. M Hicks, A. *et al.* Effector mechanisms of the anti-cancer immune responses of macrophages in SR/CR mice - PubMed. *Cancer Immun.* (2006).
106. Tramontin, G. DESARROLLO DE ESTRATEGIAS DE INMUNOTERAPIA ANTI-TUMORAL UTILIZANDO MOLÉCULAS DE TRYPANOSOMA CRUZI.
107. Varki, A., Freeze, H. H. & Manzi, A. E. Overview of Glycoconjugate Analysis. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **57**, 12.1.1-12.1.10 (2009).
108. Gupta, G., Surolia, A. & Sampathkumar, S. G. Lectin microarrays for glycomic analysis. *OMICS* **14**, 419–436 (2010).
109. Varki, A. *et al.* Essentials of Glycobiology. *Cold Spring Harb.* 823 (2017).
110. Nicolardi, S. *et al.* Analysis of synthetic monodisperse polysaccharides by wide mass range ultrahigh-resolution maldi mass spectrometry. *Anal. Chem.* **93**, 4666–4675 (2021).
111. Shajahan, A., Heiss, C., Ishihara, M. & Azadi, P. Glycomic and glycoproteomic analysis of glycoproteins-a tutorial. *Anal. Bioanal. Chem.* **409**, 4483–4505 (2017).
112. Abrahams, J. L., Campbell, M. P. & Packer, N. H. Building a PGC-LC-MS N-glycan retention library and elution mapping resource. *Glycoconj. J.* **35**, 15–29 (2018).
113. Narimatsu, H. *et al.* Current Technologies for Complex Glycoproteomics and Their Applications to Biology/Disease-Driven Glycoproteomics. *J. Proteome Res.* **17**, 4097–4112 (2018).
114. Xiao, H., Sun, F., Suttapitugsakul, S. & Wu, R. Global and site-specific analysis of protein glycosylation in complex biological systems with Mass Spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **38**, 356–379 (2019).
115. Sun, S. *et al.* Comprehensive analysis of protein glycosylation by solid-phase extraction of N-linked glycans and glycosite-containing peptides. *Nat. Biotechnol.* **34**, 84–88 (2016).
116. Rodríguez, E. *et al.* Immobilization of β -galactosidase and α -mannosidase onto magnetic nanoparticles: A strategy for increasing the potentiality of valuable glycomic tools for glycosylation analysis and biological role determination of glycoconjugates. *Enzyme Microb. Technol.* **117**, 45–55 (2018).
117. Bidondo, L., Festari, F., Freire, T. & Giacomini, C. Immobilized peptide-N-glycosidase F onto magnetic nanoparticles: A biotechnological tool for protein deglycosylation under native

- conditions. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **Eary on li**, (2021).
118. Bidondo, L., Landeira, M., Festari, F., Freire, T. & Giacomini, C. A biotechnological tool for glycoprotein desialylation based on immobilized neuraminidase from *Clostridium perfringens*. *Biochem. Biophys. Reports* **26**, (2021).
 119. Sheldon, R. A. & van Pelt, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 6223–6235 (2013).
 120. Brena, B., González-Pombo, P. & Batista-Viera, F. Immobilization of enzymes: a literature survey. *Methods Mol. Biol.* **1051**, 15–31 (2013).
 121. Krenkova, J., Lacher, N. A. & Svec, F. Multidimensional system enabling deglycosylation of proteins using a capillary reactor with peptide-N-glycosidase F immobilized on a porous polymer monolith and hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry of glycans. *J. Chromatogr. A* **1216**, 3252–3259 (2009).
 122. Krenkova, J., Szekrenyes, A., Keresztessy, Z., Foret, F. & Guttman, A. Oriented immobilization of peptide-N-glycosidase F on a monolithic support for glycosylation analysis. *J. Chromatogr. A* **1322**, 54–61 (2013).
 123. Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F. & Stevanato, R. Enzyme immobilization: an update. *J. Chem. Biol.* **6**, 185–205 (2013).
 124. Manta, C. *et al.* Introduction of thiol-reactive structures on to soluble and insoluble proteins. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **31**, 231 (2000).
 125. Ovsejevi, K., Grazú, V. & Batista-Viera, F. beta-Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* immobilized on to thiosulfinate/thiosulfonate supports for lactose hydrolysis in milk and dairy by-products. *Biotechnol. Tech.* **1998 122 12**, 143–148 (1998).
 126. Giacomini, C., Villarino, A., Franco-Fraguas, L. & Batista-Viera, F. Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on silica and agarose: Comparison of different methods. *J. Mol. Catal. - B Enzym.* **4**, 313–327 (1998).
 127. Janson, J.-C. *Protein Purification Principles, High Resolution Methods, and Applications.*
 128. Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F. & Wahab, R. A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **29**, 205 (2015).
 129. Netto, C. G. C. M., Toma, H. E. & Andrade, L. H. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **85–86**, 71–92 (2013).
 130. Cipolatti, E. P. *et al.* Nanomaterials for biocatalyst immobilization-state of the art and future trends. *RSC Adv.* **6**, 104675–104692 (2016).
 131. Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M. & Fernandez-Lafuente, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* **40**, 1451–1463 (2007).
 132. cytiva.com. *Sepharose and Sepharose CL Size exclusion chromatography Instructions for Use.*
 133. Selvarajan, V., Obuobi, S. & Ee, P. L. R. Silica Nanoparticles—A Versatile Tool for the Treatment of

- Bacterial Infections. *Front. Chem.* **8**, 602 (2020).
134. Wilczewska, A. Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K. H. & Car, H. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacol. Rep.* **64**, 1020–1037 (2012).
 135. Mulloy, B., Dell, A., Stanley, P. & Prestegard, J. H. Structural Analysis of Glycans. *Ann. Transl. Med.* **2**, (2017).
 136. Zeleny, R., Altmann, F. & Praznik, W. A capillary electrophoretic study on the specificity of beta-galactosidases from *Aspergillus oryzae*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Canavalia ensiformis* (jack bean). *Anal. Biochem.* **246**, 96–101 (1997).
 137. Dragosits, M. *et al.* Recombinant *Aspergillus* β -galactosidases as a robust glycomic and biotechnological tool. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 3553 (2014).
 138. Maksimainen, M. M., Lampio, A., Mertanen, M., Turunen, O. & Rouvinen, J. The crystal structure of acidic β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *International Journal of Biological Macromolecules.* **60**, 109–115 (2013).
 139. Y, T., A, K., A, K. & T, H. Purification and properties of beta-galactosidase from *Aspergillus oryzae* - PubMed. *J. Biochem.* 241–247 (1975).
 140. Mishra, R. & Chandra, R. Purification and Characterization of α -Mannosidase from Moss *Hyophilla nymaniana* *Proceedings of the National Academy of Sciences, India, Section B: biological sciences.* **89**, 885-891 (2018).
 141. Li, Y. *et al.* *Enterococcus faecalis* α 1-2-mannosidase (EfMan-I): an efficient catalyst for glycoprotein N-glycan modification. *FEBS Lett.* **594**, 439 (2020).
 142. Park, J. K. Purification and characterisation of a novel alkalophilic α -D-mannosidase from *Pseudomonas fluorescens* Purification and characterisation of a novel alkalophilic α -D-mannosidase from *Pseudomonas fluorescens*. *Biocontrol Science and Technology.* **23**, 1324-1335 (2013).
 143. Cobucci-Ponzano, B. *et al.* The molecular characterization of a novel GH38 α -mannosidase from the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* revealed its ability in de-mannosylating glycoproteins. *Biochimie* **92**, 1895–1907 (2010).
 144. Sakharayapatna Ranganatha, K., Sahoo, L., Venugopal, A. & Nadimpalli, S. K. Purification, biochemical and biophysical characterization of a zinc dependent α -mannosidase isoform III from Custard Apple (*Annona squamosa*) seeds. *Int. J. Biol. Macromol.* **138**, 1044–1055 (2019).
 145. Megazyme. α -D-Mannosidase from *Bacteroides thetaiotaomicron*.
 146. Zhu, Y. *et al.* Mechanistic insights into a Ca^{2+} -dependent family of alpha-mannosidases in a human gut symbiont. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 125–132 (2010).
 147. Sakurama, H. *et al.* Differences in the Substrate Specificities and Active-Site Structures of Two α -L-Fucosidases (Glycoside Hydrolase Family 29) from *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**, 1022–1024 (2012).
 148. Wu, H. *et al.* Fucosidases from the human gut symbiont *Ruminococcus gnavus*. *Cell. Mol. Life Sci.* **78**, 675–693 (2020).

149. Yamamoto, K. *et al.* Blood Group Substance-degrading α -L-Fucosidase Produced by *Fusarium oxysporum*. *Agric. Biol. Chem.* **51**, (1987).
150. Megazyme. α -(1-2,3,4,6)-L-FUCOSIDASE from *Homo sapiens*.
151. Bouwstra, J. B., Deyl, C. M. & Vliegthart, J. F. G. Purification and Kinetic Properties of Sialidase from *Clostridium perfringens*. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* **368**, 269–276 (1987).
152. Roggentin, P., Kleinedam, R. G. & Schauer, R. Diversity in the Properties of Two Sialidase Isoenzymes Produced by *Clostridium perfringens* SPP. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* **376**, 569–576 (1995).
153. Maley, F., Trimble, R. B., Tarentino, A. L. & Plummer, T. H. Characterization of Glycoproteins and Their Associated Oligosaccharides through the Use of Endoglycosidases 1. *Anal. Biochem.* **180**, 195–204 (1989).
154. A.L, T. & T.H, P. Enzymatic deglycosylation of asparagine-linked glycans: Purification, properties, and specificity of oligosaccharide-cleaving enzymes from *Flavobacterium meningosepticum*. *Methods Enzym.* 44–57 (1994).
155. O'Neill, R. A. Enzymatic release of oligosaccharides from glycoproteins for chromatographic and electrophoretic analysis. *J. Chromatogr. A* **720**, 201–215 (1996).
156. Sergio González, L., Caso de Armas, D. & González Chávez, A. Lectina: una biomolécula que promete en las ciencias biomédicas. *Ciencias Médicas* **15**, (2011).
157. Hernandez Cruz, P., Pérez Campos, E., Martínez Martínez, L., Ortiz, B. & Martínez, G. LAS LECTINAS VEGETALES COMO MODELO DE ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES PROTEÍNA-CARBOHIDRATO*. *Rev. Educ. Química.* 21–27 (2005).
158. León, S. G., Armas, D. C. de & Chávez, A. G. Lectina: una biomolécula que promete en las ciencias biomédicas. *Rev. Ciencias Médicas* (2011).
159. Rudiger, H. & Gabius, H.-J. Plant lectins : Occurrence , biochemistry , functions and applications. *Glycoconj. J.* **18**, 589–613 (2002).
160. Chandrasekaran, E. V. *et al.* Novel interactions of complex carbohydrates with peanut (PNA), *Ricinus communis* (RCA-I), *Sambucus nigra* (SNA-I) and wheat germ (WGA) agglutinins as revealed by the binding specificities of these lectins towards mucin core-2 O-linked and N-linked glycans a. *Glycoconj. J.* **33**, 819–836 (2016).
161. Goumenou, A., Delaunay, N. & Pichon, V. Recent Advances in Lectin-Based Affinity Sorbents for Protein Glycosylation Studies. *Front. Mol. Biosci.* **8**, (2021).
162. Iskratsch, T., Braun, A., Paschinger, K. & Wilson, I. B. H. Specificity analysis of lectins and antibodies using remodeled glycoproteins. *Anal. Biochem.* **386**, 133–146 (2009).
163. Mello, C. B., Azambuja, P., Garcia, E. S., Ratcliffe, N. A. & Ratcliffe, A. Differential in Vitro and in Vivo Behavior of Three Strains of *Trypanosoma cruzi* in the Gut and Hemolymph of *Rhodnius prolixus*. (1996).
164. Brooks, S. A. Lectin Histochemistry: Historical Perspectives, State of the Art, and the Future. *Methods Mol. Biol.* **1560**, 93–107 (2017).

165. Kaku, H., Van Damme, E. J. M., Peumans, W. J. & Goldstein, I. J. Carbohydrate-binding specificity of the daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*) and amaryllis (*Hippeastrum hybr.*) bulb lectins. *Arch. Biochem. Biophys.* **279**, 298–304 (1990).
166. Vector Laboratories. *Griffonia Simplicifolia Lectin I (GSL I) isolectin B4, Biotinylated* .
167. Vector Laboratories. *Vicia Villosa Lectin (VVL, VVA), Biotinylated* .
168. Els C. M, B.-V. der L., Justin L., S. & Ajit, V. Effects of Sialic Acid Substitutions on Recognition by *Sambucus nigra* Agglutinin and *Maackia amurensis* Hemagglutinin. . *Anal. Biochem.* 98–104 (2002).
169. Vector Laboratories. *Soybean Agglutinin (SBA), Biotinylated* .
170. MONSIGNY, M., ROCHE, A. -C, SENE, C., MAGET-DANA, R. & DELMOTTE, F. Sugar-Lectin Interactions: How Does Wheat-Germ Agglutinin Bind Sialoglycoconjugates? *Eur. J. Biochem.* **104**, 147–153 (1980).
171. Chaves, L. B., Briones, M. R. S. & Schenkman, S. Trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is expressed at the stationary phase and is different from the enzyme expressed in trypomastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **61**, 97–106 (1993).
172. Bronia, D. H., Aguerri, A. M. & Bertetto, S. T. *Trypanosoma cruzi*: Changes in lipid composition during aging in culture. *Exp. Parasitol.* **61**, 151–159 (1986).
173. BRENER, Z., GOLGHER, R., BERTELLI, M. S. & TEIXEIRA, J. A. Strain-Dependent Thermosensitivity Influencing Intracellular Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in Cell Culture*. *J. Protozool.* **23**, 147–150 (1976).
174. Vaghari, H. *et al.* Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme immobilization. *Biotechnol. Lett.* **38**, 223–233 (2016).
175. Dragosits, M. *et al.* Recombinant *Aspergillus* β -galactosidases as a robust.pdf. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 3553–3567 (2014).
176. Zhu, Y. *et al.* NIH Public Access. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 125–132 (2010).
177. Yamamoto, K. *et al.* Microbial Glycosidases. *Carbohydrates Chem. Biol.* 497–511.
178. Keeley, T. S., Yang, S. & Lau, E. The diverse contributions of fucose linkages in cancer. *Cancers (Basel)*. **11**, 1–25 (2019).
179. Foley, K. J., Forzani, E. S., Joshi, L. & Tao, N. Detection of lectin-glycan interaction using high resolution surface plasmon resonance. *Analyst* **133**, 744-746 (2008).
180. Chacko, B. K. & P.S., A. Peanut (*Arachis hypogaea*) lectin recognizes α -linked galactose, but not N-acetyl lactosamine in N-linked oligosaccharide terminals. *Int. J. Biol. Macromol.* 365–371 (2001).
181. Kuno, A. *et al.* Evanescent-field fluorescence-assisted lectin microarray: a new strategy for glycan profiling. *Nat Methods.* **2**, 851-856 (2005).
182. Yen, M., Wu, A. M., Yang, Z., Gong, Y. & Chang, E. Recognition roles of the carbohydrate glycotopes of human and bovine lactoferrins in lectin – N -glycan interactions. *BBA - Gen. Subj.* **1810**, 139–149 (2011).

183. Green, E. D., Adelt, G., Baenziger, J. U., Wilson, S. & Van Halbeek, H. The asparagine-linked oligosaccharides on bovine fetuin. Structural analysis of N-glycanase-released oligosaccharides by 500-megahertz¹H NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **263**, 18253–18268 (1988).
184. Cámara, M. de los M. *et al.* Trypanosoma cruzi surface mucins are involved in the attachment to the Triatoma infestans rectal ampoule. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **13**, (2019).
185. Tarleton, R. L. Immune system recognition of Trypanosoma cruzi. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 430–434 (2007).
186. Berriel, E. *et al.* Human hydatid cyst fluid-induced therapeutic anti-cancer immune responses via NK1.1 + cell activation in mice. *Cancer Immunol. Immunother.* **70**, 3617–3627 (2021).
187. Morotti, A. L. M., Martins-Teixeira, M. B. & Carvalho, I. Protozoan Parasites Glycosylphosphatidylinositol Anchors: Structures, Functions and Trends for Drug Discovery. *Curr. Med. Chem.* **26**, 4301–4322 (2019).
188. Takayama, H. *et al.* Altered glycosylation associated with dedifferentiation of hepatocellular carcinoma: A lectin microarray-based study. *BMC Cancer* **20**, 1–8 (2020).
189. Queiroga, T. B. D. *et al.* Virulence of Trypanosoma cruzi Strains Is Related to the Differential Expression of Innate Immune Receptors in the Heart. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **11**, (2021).
190. Bergman, M. P. *et al.* Helicobacter pylori modulates the T helper cell 1/T helper cell 2 balance through phase-variable interaction between lipopolysaccharide and DC-SIGN. *J. Exp. Med.* **200**, 979–990 (2004).
191. van Die, I. *et al.* The dendritic cell-specific C-type lectin DC-SIGN is a receptor for Schistosoma mansoni egg antigens and recognizes the glycan antigen Lewis x. *Glycobiology* **13**, 471–478 (2003).
192. van Liempt, E. *et al.* Schistosoma mansoni soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation. *Mol. Immunol.* **44**, 2605–2615 (2007).
193. Nouri, Y., Weinkove, R. & Perret, R. T-cell intrinsic Toll-like receptor signaling: implications for cancer immunotherapy and CAR T-cells. *J. Immunother. cancer* **9**, e003065 (2021).
194. Rocha, D. M., Caldas, A. P., Oliveira, L. L., Bressan, J. & Hermsdorff, H. H. Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response. *Atherosclerosis* **244**, 211–215 (2016).
195. Bisiaux, A. *et al.* Deconvolution of the response to bacillus Calmette-Guérin reveals NF-κB-induced cytokines as autocrine mediators of innate immunity. *Front. Immunol.* **8**, 796 (2017).
196. Guallar-Garrido, S. & Julián, E. Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Therapy for Bladder Cancer: An Update. *ImmunoTargets Ther.* **9**, 1 (2020).
197. Yosimura, Y. *et al.* Immunological differences between squamous cell cancer patients treated with and without biological response modifier (OK-432): evaluation at a period of more than one year after the last treatment. *J. Osaka Univ. Dent. Sch.* 117–122 (1989).
198. Gochi, A., Orita, K., Fuchimoto, S., Tanaka, N. & Ogawa, N. The prognostic advantage of preoperative intratumoral injection of OK-432 for gastric cancer patients. *Br. J. Cancer* **2001** **84**, 443–451 (2001).

199. Tian, Y. F. *et al.* OK-432 Suppresses Proliferation and Metastasis by Tumor Associated Macrophages in Bladder Cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **16**, 4537–4542 (2015).
200. Noda, K. *et al.* Immunotherapy using the streptococcal preparation OK-432 for the treatment of uterine cervical cancer. Cervical Cancer Immunotherapy Study Group. *Gynecol. Oncol.* **35**, 367–372 (1989).
201. Olsnes, C., Stavang, H., Brokstad, K., Olofsson, J. & Aarstad, H. J. Chemokines are secreted by monocytes following OK-432 (lyophilized *Streptococcus pyogenes*) stimulation. *BMC Immunol.* **10**, 1–11 (2009).
202. Werling, D., Jann, O. C., Offord, V., Glass, E. J. & Coffey, T. J. Variation matters: TLR structure and species-specific pathogen recognition. *Trends Immunol.* **30**, 124-130 (2009).
203. Mnich, M. E., van Dalen, R. & van Sorge, N. M. C-Type Lectin Receptors in Host Defense Against Bacterial Pathogens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **10**, (2020).
204. Rodríguez, E. *et al.* Fasciola hepatica Immune Regulates CD11c + Cells by Interacting with the Macrophage Gal/GalNAc Lectin. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
205. Rodríguez, E. *et al.* Fasciola hepatica glycoconjugates immunoregulate dendritic cells through the Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin inducing T cell anergy. *Sci. Rep.* **7**, (2017).