



El antígeno B de *Echinococcus granulosus* en el transporte de lípidos y mensajes inmunomoduladores en la interfaz hospedero-parásito

Tesis de Doctorado

PEDECIBA Biología

Licenciada Ana Maite Folle López

Tutora: Ana M. Ferreira

Co-tutor: Carlos Batthyány

Cátedra de Inmunología Facultad de Química/Ciencias Universidad de la República 2022 El trabajo de tesis que se describe a continuación, y que se titula "El antígeno B de *Echinococcus granulosus* en el transporte de lípidos y mensajes inmunoduladores en la interfaz hospederoparásito", se realizó para obtener el título de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de la República (UdelaR).

Dicho trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunología, perteneciente a Facultad de Ciencias y Facultad de Química de la UdelaR. Se realizaron también actividades en el Instituto Pasteur de Montevideo, incluyendo una pasantía en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica y el trabajo en el Laboratorio de Inmunovirología. Asimismo se realizaron dos pasantías cortas internacionales, una en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP-CONICET) y la otra en el Laboratorio Especial de Toxinologia Aplicada, Center of Toxins, Immune-Response and Cell Signaling -CeTICS-, del Instituto Butantan en San Paulo, Brasil.

La dirección de esta tesis estuvo a cargo de la Dra. Ana María Ferreira (Prof. Agregada de la Cátedra de Inmunología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, UdelaR) y la codirección del Dr. Carlos Batthyány (actualmente Director Ejecutivo del Instituto Pasteur de Montevideo).

Para su realización se recibió el apoyo financiero de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, beca de maestría) y de la Comisión Académica de Posgrado (CAP, becas de finalización de maestría, beca de doctorado y beca de finalización de doctorado). El trabajo experimental se llevó a cabo mediante financiación de la Comisión Sectorial de Investigación Científica con los proyectos CSIC I+D (N° 023/348), CSIC Grupos (C646-348), CSIC Iniciación (C082, 2017) y de las alícuotas de maestría y doctorado del PEDECIBA.

INDICE

Abreviaturas	9
Resumen	14
CAPÍTULO 1: Introducción	17
1.1. Los cestodos: una clase de gusanos planos parásitos	17
1.2. Echinococcus granulosus s.l.	
1.2.1. Especies y genotipos comprendidos en <i>E. granulosus</i> s.l	18
1.2.2. Distribución geográfica de <i>E. granulosus</i> s.l.	19
1.2.3. Ciclo de vida	20
1.2.4. La echinococcosis quística	21
1.2.4.1. Morfología de la hidátide	22
1.2.4.2. Características de la respuesta inmune del hospedero en la CE y su r negativa	egulación 24
1.2.4.2.1. Fase de pre-enquistamiento y establecimiento	24
1.2.4.2.2. Fase post-enquistamiento	26
1.2.4.2.3. Actividades inmunomoduladoras en componentes de la hidátide	28
1.2.4.3. Diagnóstico y tratamiento de la CE	30
1.4. El metabolismo de los cestodos con énfasis en E. granulosus s.l.	
1.4.1. Proteínas que unen lípidos en cestodos	34
1.5. El EgAgB de E. granulosus: una HLBP en la interfaz hospedero-parásito	36
1.5.1. Composición del EgAgB	37
1.5.2. Sobre las posibles funciones del EgAgB	42
1.5.2.1. Efectos inmunomoduladores	42
1.5.2.2. Papel en el metabolismo lipídico	43
1.6. Células en la interfaz hospedero-parásito: los macrófagos y monocitos	44
1.6.1. Los macrófagos	44
1.6.1.1. Funciones y fenotipos	44
1.6.1.2. Macrófagos de cavidad peritoneal	48
1.6.2. Los monocitos	49
1.6.3. Respuesta inducida por el LPS en macrófagos y monocitos	51
1.6.3.1. Generalidades sobre el LPS	51
1.6.3.2. Principal sensor celular para el LPS: el TLR4	53
1.6.3.3. Reconocimiento del LPS dependiente e independiente de TLR4	54

1.7. Hipótesis y objetivos de la tesis	58
1.7.1. Hipótesis de estudio	58
1.7.2. Objetivo general	59
1.7.3. Objetivos específicos	59
CAPÍTULO 2: Materiales y Métodos	61
2.1. Materiales	61
2.1.1. Reactivos generales	61
2.1.2. Anticuerpos	62
2.1.3. Animales de experimentación	62
2.2. Líneas celulares y métodos para la obtención y cultivo de células primarias	62
2.2.1. Medios de cultivo	62
2.2.2. Línea premonocítica humana THP-1	62
2.2.3. Línea de macrófagos murinos J774	63
2.2.4. Línea de hepatocitos HepG2	63
2.2.5. Macrófagos derivados de médula ósea de ratón (BMDM)	63
2.2.6. Determinación de la concentración y viabilidad celular	64
2.3. Material parasitario	64
2.4. Obtención de preparaciones de EgAgB	65
2.4.1. Puesta a punto de una nueva metodología para la purificación del mediante cromatografía de intercambio iónico y ultracentrifugación en gradier	EgAgB nativo nte de densidad 65
2.4.2. Obtención de preparaciones de EgAgB para su uso en ensayos funcional	es66
2.4.2.1. Preparación de anticuerpos monodominio de llama (VHHs) anti uso en la purificación del EgAgB nativo por cromatografía de inmunoafinida	-EgAgB8/1 y su d66
2.4.2.1.1. Expresión de los VHHs anti-EgAgB8/1	66
2.4.2.2. Expresión y purificación de rEgAgB8/1 en la línea celular S2 de L). melanogaster 68
2.4.2.2.1. Clonado de EgAgB8/1	69
2.4.2.2.2. Expresión y purificación de rEgAgB8/1 en células de D. melanogo	əster 71
2.4.3. Control de concentración y calidad de las preparaciones de EgAgB	72
2.4.3.1. Determinación de la concentración	72
2.4.3.2. Electroforesis de proteínas por SDS-PAGE y Western Blot	73
2.4.3.3. Electroforesis en geles nativos de poliacrilamida	73
2.4.3.4. Determinación del radio hidrodinámico del EgAgB por análisis dinámica de la luz (DLS)	de dispersión 74

2.4.3.5. Detección de endotoxinas bacterianas mediante el ensayo del lisado de amebocitos de <i>Limulus polyphemus</i> (LAL)
2.5. Identificación de las variantes apolipoproteicas y los ligandos hidrofóbicos del EgAgB nativo presente en diferentes estructuras y especies del metacestodo74
2.5.1. Proteómica de la fracción QS _f 74
2.5.1.1. Identificación de las subunidades proteicas del EgAgB por electroforesis bidimensional y MALDI-TOF/TOF
2.5.1.2. Identificación de las subunidades proteicas del EgAgB por LC-MS/MS75
2.5.1.3. Detección de grupos carbonilo76
2.5.2. Estudio de los ligandos hidrofóbicos del EgAgB77
2.5.2.1. Extracción de lípidos77
2.5.2.2. Análisis de lípidos por cromatografía en capa fina de alta resolución77
2.5.2.3. Lipidómica del EgAgB
2.6. Estudio de la interacción del EgAgB nativo con monocitos, macrófagos y hepatocitos79
2.6.1. Análisis de la capacidad de unión del EgAgB nativo a monocitos y macrófagos THP-1 utilizando Mo-EB7
2.6.2. Análisis de la capacidad de unión del EgAgB nativo conjugado a biotina/FITC a monocitos y macrófagos THP-1 y hepatocitos HepG280
2.6.2.1. Marcado del EgAgB nativo con biotina o FITC80
2.6.2.2. Ensayos de unión de EgAgB-B a monocitos y macrófagos THP-1 y hepatocitos HepG2
2.6.2.3. Ensayos de unión del EgAgB-B a células inflamatorias de ratón
2.6.3. Estudio de la contribución de las subunidades proteicas y de la fosfatidilcolina del EgAgB a la unión a monocitos y macrófagos82
2.6.3.1. Tratamiento de EgAgB nativo con fosfolipasa D (PLD)82
2.6.3.2. Ensayos de unión de las subunidades proteicas del EgAgB y del EgAgBPLD+ a monocitos y macrófagos THP-1
2.6.3.3. Preparación de vesículas unilamelares grandes (LUVs)
2.6.3.4. Ensayos de competencia empleando vesículas de fosfatidilcolina y fosfatidilcolina/fosfatidilserina
2.6.4. Posibles receptores celulares involucrados en el reconocimiento del EgAgB83
2.6.4.1. Purificación de lipoproteínas plasmáticas: HDL y LDL
2.6.4.2. Ensayos de competencia empleando lipoproteínas plasmáticas y otros ligandos de receptores celulares de superficie
2.6.5. Ensayos de competencia por la unión a macrófagos entre el EgAgB nativo y el LPS84
2.7. Análisis de los efectos EgAgB sobre macrófagos: efectos per se y efectos moduladores de las

2.7.1. Efectos del EgAgB nativo y su fracción lipídica sobre macrófagos THP-185	5
2.7.2. Efectos del EgAgB sobre macrófagos murinos derivados de médula ósea (BMDM)86	5
2.7.3. Determinación de la actividad metabólica celular86	5
2.7.4. Determinación de nitritos por el método de Greiss86	5
2.7.5. Determinación del nivel de expresión de moléculas de superficie por citometría de flujo) 5
2.7.6. Cuantificación de citoquinas por enzimoinmunoensayo88	3
2.8. Análisis de la capacidad del EgAgB de promover el eflujo de colesterol en macrófagos89)
2.9. Análisis de datos)
2.10. Análisis <i>in vivo</i> de los efectos del EgAgB sobre las células presentes en el peritoneo de ratón90) j
2.10.1. Estimulación intraperitoneal con EgAgB nativo/rEgAgB8/1 y LPS9	1
2.10.2. Lavado peritoneal	1
2.10.3. Caracterización de las poblaciones celulares recuperadas de cavidad peritoneal po citometría de flujo	r 1
2.10.3.1. Estrategia de gating para caracterizar las células peritoneales92	2
2.10.4. Análisis de datos	5
CAPÍTULO 3: Purificación y caracterización de la composición del EgAgB nativo presente en e	I
líquido hidático	3
3.1. Puesta a punto de una nueva metodología para la purificación del EgAgB nativo a partir de LH98	3 j
3.2. Identificación de las variantes apolipoproteicas y los ligandos hidrofóbicos del EgAgB nativo presente en el LH de origen bovino y porcino103) 3
3.2.1. Purificación del EgAgB a partir de distintos materiales parasitarios	3
3.2.2. Análisis proteómico de las preparaciones conteniendo EgAgB nativo	1
3.2.2.1. Identificación proteica por 2D-electroforesis acoplada a MALDI TOF/TOF	1
3.2.2.1. Identificación proteica por LC-MS/MS106	5
3.2.3. Identificación de los ligandos hidrofóbicos del EgAgB nativo en los distintos materiale: parasitarios	s 1
CAPÍTULO 4: Estudio de la interacción del EgAgB con células del hospedero presentes en la interfaz hospedero-parásito	9 5
4.1. Análisis de la capacidad de unión del EgAgB nativo a macrófagos y monocitos THP-1116	5
4.2. Análisis de la capacidad de unión del EgAgB nativo a células peritoneales de ratón120)
4.3. Estudio de la contribución del componente proteico y lipídico del EgAgB a la unión a monocitos y macrófagos) 2
4.3.1. Contribución de las subunidades proteicas del EgAgB a la unión a monocitos y macrófagos122	/

4.3.2. Contribución de la fosfatidilcolina del EgAgB a la unión a monocitos y macrófagos.	126
4.4. Evaluar la participación de los receptores para lipoproteínas plasmáticas (HDL y LD otros receptores en la unión)L) y 129
4.5. Efecto de la temperatura y participación del citoesqueleto de actina en la unión del Eg a los macrófagos	IAgB 132
4.6. Análisis de la capacidad de unión del EgAgB nativo a hepatocitos HepG2	133
CAPÍTULO 5: Efectos moduladores del EgAgB sobre células del sistema inm aproximaciones <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	une: 136
5.1. Evaluación de los efectos de las preparaciones de EgAgB en macrófagos	136
5.2. Obtención de EgAgB nativo y EgAgB8/1 recombinante para estudios funcionales	140
5.2.1. Producción de anticuerpos monodominio de llama (dominios VHH) anti-EgAgB y su en la purificación del EgAgB nativo por cromatografía de inmunoafinidad	ı uso 140
5.2.2. Producción de rEgAgB8/1 en la línea celular S2 de Drosohpila melanogaster	142
5.2.3. Caracterización del EgAgB _{IP} nativo y de rEgAgB8/1 _{S2}	146
5.3. Modulación por el EgAgB de la activación inflamatoria de macrófagos inducida <i>in vitro</i> agonistas de TLRs) por 151
5.3.1. Efectos sobre la activación de macrófagos THP-1	151
5.3. Efectos sobre la activación de BMDM	158
5.3. Estudio de interferencia del EgAgB en la unión del LPS a los macrófagos	161
5.4. Análisis de la capacidad del EgAgB de remover colesterol de los macrófagos	165
5.4.1. Justificación del estudio y la estrategia experimental	167
5.4.2. Efectos a nivel de las citoquinas	168
5.4.3. Efectos a nivel de la composición celular del peritoneo	170
5.4.4. Integración de los resultados de los ensayos in vivo	. 203
CAPÍTULO 6: Discusión	.208
6.1. Avances y dificultades en la obtención de preparaciones de EgAgB nativo para estu funcionales	ıdios . 208
6.2. Avances en la composición del EgAgB nativo y comparación con el rEgAgB8/1	211
6.2.1. Sobre el componente proteico	211
6.2.2. Sobre el componente lipídico	217
6.3. Capacidad de unión del EgAgB a monocitos y macrófagos	.220
6.3.1. Explorando posibles receptores celulares involucrados en la unión del EgAgB	221
6.4. Avances en las propiedades biológicas del EgAgB	.225
6.4.1. Sobre los efectos pro-inflamatorios observados en las preparaciones del EgAgB	.225
6.4.2. Sobre la interacción del EgAgB con el LPS	.229
6.4.2. Efectos moduladores del EgAgB sobre células innatas	.230

BIBLIOGRAFÍA	279
ANEXO - Capítulo 4	252
ANEXO - Capítulo 3	246
ANEXO - Capítulo 2	.241
6.5. Conclusiones y principales comentarios del trabajo	236
6.4.2.1. Modulación de las respuestas inducidas por LPS	232

Abreviaturas

ABC	transportadores de membrana dependientes de ATP, del inglés ATP binding cassette
ADN	ácido desoxirribonucleico
AIF	Adyuvante Incompleto de Freund
ANS	1-anilino-8-naftaleno sulfonato
Arg1	arginasa 1
APC	célula presentadora de antígeno/aloficocianina
АРС-Су7	conjugado en tándem de APC y la cianina Cy7
ARN	ácido ribonucleico
ВНТ	2, 6 di-tert-butil-4-metilfenol
BMDC	células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón, del inglés Bone Marrow derived Dendritic Cells
BMDM	macrófagos derivados de médula ósea de ratón, del inglés Bone Marrow Derived Macrophages
BSA	seroalbúmina bovina, del inglés bovine serum albumin
CD11b	cluster de diferenciación 11b, marcador fenotípico de células mieloides de la inmunidad innata
CD19	cluster de diferenciación 19, marcador fenotípico de Linfocitos B
CD40	cluster de diferenciación 40, molécula co-estimuladora
CD86	cluster de diferenciación 86, molécula co-estimuladora
CE	echinococcosis quística
CG	capa germinativa
CL	capa laminar/cardiolipina
Col	colesterol
DAG	diacilglicéridos
DAMPs	patrones moleculares asociados a daño, del inglés Damage Associated Molecular Patterns

dNTPs	desoxirribonucleótidos trifosfato
DMEM	medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimetilsulfóxido
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EE	esteres de esteroles
EgAgB	Antígeno B de Echinococcus granulosus
ELISA	enzimoinmunoensayo, del inglés Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
F4/80	marcador fenotípico de macrófagos, del inglés Adhesion G protein- coupled receptor E4
FABPs	proteínas que unen ácidos grasos, del inglés Fatty Acid Binding Proteins
PE	ficoeritrina
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FPLC	cromatografía líquida de separación rápida de proteínas, del inglés Fast Protein Liquid Chromatography
FSC	dispersión frontal
g	gramo
Gr-1	marcador fenotípico de neutrófilos
HDL	lipoproteína de alta densidad, del inglés High Density Lipoprotein
HLBPs	proteínas que unen ligandos hidrofóbicos, del inglés Hydrophobic Ligand Binding Protein
lgG, lgM, lgD	inmunoglobulina G, inmunoglobulina M, inmunoglobulina D
IL	interleuquina
iNOS	óxido nítrico sintasa inducible, del inglés Inducible Nitic Oxide Synthase
i.p.	intra-peritoneal
IPTG	isopropil α-D-tiogalactósido2
Kd	constante de disociación
kDa	kiloDalton
L	litro

LAL	test de determinación del nivel de endotoxinas (<i>Limulus amebocyte</i> lysate test)
LB	medio Luria Bertani
LBPs	proteínas que unen lípidos, del inglés Lipid Binding Proteins
LDL	lipoproteína de baja densidad, del inglés Low Density Lipoprotein
LDL-A	dominio del receptor de LDL de tipo A, del inglés LDL receptor type A
LDLr	receptor de LDL
LH	líquido hidático
LPS	lipopolisacárido
LRP	proteína relacionada al LDLr, del inglés LDLr Related Protein
LUV	vesículas unilamelares grandes
Ly6C	marcador fenotípico de monocitos, del inglés Lymphocyte antigen 6 complex, locus C
Ly6G	marcador fenotípico de neutrófilos, del inglés Lymphocyte antigen 6 complex, locus G
М	molar
MCP1	proteína quimiotáctica de monócitos, del inglés Monocyte Chemotactic Protein 1
M-CSF	factor estimulante de colonia de macrófagos, del inglés Macrophage Colony Stimulating Factor
MHC-II	molécula del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II, del inglés Major Histocompatibility Complex II
μg	microgramo
μĹ	microlitro
μΜ	micromolar
mg	miligramo
mL	mililitro
mM	milimolar
Mo-EB7	anticuerpo monoclonal anti-EgAgB8/1
МРМ	marcador de peso molecular

Ν	normal
NF-kB	factor nuclear, del inglés Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NO	óxido nítrico
NHS-Biotina	N-Hidroxisuccinimida-Biotina
OVA	ovoalbúmina
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
PAMPs	patrones moleculares asociados a patógenos, del inglés Pathogen Associated Molecular Patterns
pb	pares de bases
PBS	tampón fosfato salino, del inglés Phosphate Buffered Saline
РС	fosfatidilcolina
PCR	reacción en cadena de la polimerasa, del inglés Polymerase Chain Reaction
PE	protoescólex/fosfatidiletanolamina/ficoeritrina
PE-Cy7	conjugado en tándem de PE y la cianina Cy7
PerCP	proteínas peridinina clorofila
p.e.	post-estimulación
рІ	punto isoeléctrico
PI	fosfatidilinositol
p.i.	post-inyección
PLD	fosfolipasa D
РМА	forbol-12-miristato-13-acetato
PS	fosfatidilserina
PRR	receptor de reconocimiento de patrones, del inglés Pattern Recognition Receptor
RF	libre de enzimas de restricción, del inglés Restriction Free
rpm	revoluciones por minuto
RPMI	medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute

S	segundo
S2	schneider 2
SiglecF	marcador fenotípico de eosinófilos, del inglés Sialic acid-binding Ig-like lectin 5
SDS	dodecil sulfato de sodio
SEM	error estándar de la media
SFB	suero fetal bovino
SR	receptor barrendero, del inglés Scavenger Receptor
SSC	dispersión lateral
SUV	vesículas unilamelares pequeñas
TAG	triacilglicéridos
Th1/Th2	células T colaboradoras de tipo 1 o 2, del inglés T-helper 1 o T-helper 2
THP-1	línea celular de premonocitos humanos
TLRs	receptores de tipo Toll, del inglés Toll-Like Receptors
ΤΝFα	factor de necrosis tumoral alfa, del inglés Tumor Necrosis Factor alpha
HPTLC	cromatografía de capa fina de alta resolución, del inglés High- Performance Thin Layer Chromatography
ТМВ	3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina
Tris	tri-(hidroximetil)-aminometano
VHH	anticuerpo monodominio de llama
VLDL	lipoproteína de muy baja densidad, del inglés Very Low Density Lipoprotein

Resumen

Echinococcus granulosus sensu lato (s.l.) comprende a un conjunto de especies parásitas pertenecientes a la familia taeniidae de platelmintos cestodos. Sus estadios larvarios (hidátides) se establecen en vísceras de ungulados domésticos, y algunos de ellos accidentalmente en el hombre, causando una infección crónica conocida como echinococcosis quística. La cronicidad de la infección implica un fuerte control de la respuesta inmunológica del hospedero ligado al desarrollo de múltiples mecanismos inmunorregulatorios. Por otro lado, la localización de la hidátide en un medio rico en nutrientes ha moldeado el metabolismo del parásito, el cual ha perdido vías de síntesis *de novo* de ácidos grasos y colesterol que compensaría con mecanismos de captura y transporte de estos lípidos. Entre otros mecanismos, la captura y el transporte estaría mediado por una familia de proteínas específica de cestodos conocida como HLBP (del inglés, *hydrophobic ligand binding protein*), aunque existe muy poca evidencia de esta función.

En el género *Echinococcus* la familia HLBP está representada por una lipoproteína de gran valor para el inmunodiagnóstico, conocida como antígeno B (EgAgB). A nivel proteico se conforma por subunidades de ~8 kDa codificadas por genes polimórficos pertenecientes a 5 subfamilias (EgAgB1 a EgAgB5), mientras que su componente lipídico es altamente heterogéneo y contiene una variedad de ácidos grasos y esteroles, lo cual apoya su papel en la toma y transporte de lípidos esenciales para el parásito. Por otra parte, se ha comprobado el potencial del EgAgB para modular la quimiotaxis y la activación inflamatoria de células innatas, pero estas actividades inmunomoduladoras se observaron en preparaciones de EgAgB que no preservan la estructura nativa de la lipoproteína.

En esta tesis buscamos ahondar en el posible papel metabólico y modulador de la inflamación del EgAgB centrándonos en sus efectos sobre dos tipos de células innatas que contribuyen al desarrollo de la inflamación, los macrófagos y los monocitos. Como su tamaño y composición química la asemejan a la HDL de vertebrados, y contiene lípidos esenciales para el parásito, planteamos como hipótesis que el EgAgB podría unirse a estas células innatas a través de receptores para lipoproteínas cumpliendo un papel dual: transduciendo señales anti-inflamatorias que contribuyen al apagado de la inflamación inducida por la infección y participando en los eventos que permitan la adquisición y/o transporte de colesterol del hospedero, hacia la hidátide. Para abordar el estudio de esta hipótesis, se caracterizó la composición proteica y lipídica del EgAgB en hidátides bovinas y suinas, y se desarrolló una metodología para obtener preparaciones del EgAgB nativo de alta pureza que permitieran realizar estudios funcionales.

La lipoproteína nativa proveniente de hidátides bovinas (*E. granulosus* s.s., principalmente) y suinas (*E. canadensis*, genotipo G7) está compuesta mayoritariamente por la subunidad EgAgB8/1 (71 y 92%, respectivamente) pero también se identificaron las subunidades EgAgB8/3-5. La EgAgB8/2 se encontró sólo en hidátides bovinas, lo que concuerda con que la subunidad EgAgB2 es un pseudogen en G7. Dada la predominancia de la subunidad EgAgB8/1 en dos especies de *E. granulosus* s.l., se expresó esta subunidad en forma recombinante en células de insecto (rEgAgB8/1) como alternativa para los estudios funcionales. El rEgAgB8/1 obtenido se armó como una lipoproteína de tamaño algo mayor que el EgAgB nativo y mostró diferencias en el perfil de lípidos asociados.

En cuanto a la modulación de las propiedades de los monocitos y macrófagos, primero se demostró que el EgAgB nativo se une selectiva y específicamente a estas células con participación directa del componente proteico e indirecta (entorno favorable) de la fosfatidilcolina, principal fosfolípido expuesto en la superficie de la lipoproteína. Ensayos de competencia sugirieron que la unión podría involucrar receptores compartidos con las lipoproteínas plasmáticas. Interesantemente, ensayos preliminares de eflujo de colesterol mostraron que el EgAgB nativo y el rEgAgB8/1 son potencialmente capaces de tomar colesterol de los macrófagos. Se trata de la primera evidencia de esta actividad en el EgAgB, y en una HLBP, y apoya el papel de esta familia en el metabolismo lipídico de cestodos.

En cuanto a las propiedades inmunomoduladoras, el EgAgB -nativo y rEgAgB8/1- inhibió la activación de macrófagos inducida por LPS in vitro, disminuyendo la producción de citoquinas inflamatorias (IL-1 β , IL-6) e inmunorreguladoras (IL-12p40, IFN- β), y la generación de NO·. En contraste, no se observó un efecto inhibitorio sobre la expresión de moléculas co-estimuladoras (CD86 y CD40). En ensayos de competencia, el EgAgB inhibió la unión del LPS a los macrófagos, por lo cual este efecto podría ser, al menos parcialmente, consecuencia de una interferencia con la interacción del LPS con su receptor TLR4. No se observaron efectos moduladores robustos sobre la respuesta inducida por otros agonistas de TLRs. Además, la administración por vía intraperitoneal del EgAgB nativo a ratones alteró la respuesta inducida por el LPS, aunque los efectos fueron moderados. En concordancia con lo observado in vitro, el EgAgB nativo y/o el rEgAgB8/1 inhibieron la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, pero además tendieron a potenciar la secreción de IL-10. Nuevamente los efectos sobre la expresión de moléculas de membrana asociadas a la interacción con linfocitos T (MHC-II, CD40, CD86) fueron leves o nulos; principalmente hubo disminución de la expresión de MHC-II en la población de macrófagos grandes que residen en el peritoneo (LPM, por sus siglas en inglés), de la expresión de CD86 y CD40 en los macrófagos peritoneales pequeños (SPM, por sus siglas en inglés) y de CD86 en células dendríticas. Curiosamente, el EgAgB indujo *per se* una débil activación de LPM y SPM, y reclutamiento de poblaciones compatibles con neutrófilos y eosinófilos, este último efecto fue inhibido por la co-administración de LPS, evidenciando una vez más una interferencia mutua en el reconocimiento y/o señalización inducidas por el EgAgB y el LPS. En suma, estos resultados sugieren que al menos parte de los efectos moduladores del EgAgB podrían estar ligados a su capacidad para neutralizar el LPS, actuando como una molécula barrendera en la fase extracelular similar a lo reportado para la HDL₃.

Globalmente, los resultados de esta tesis aportan al conocimiento de la composición y funciones del EgAgB de *E. granulosus* s.l. y de las HLBPs en general, apoyando la hipótesis de que el EgAgB cumple un rol metabólico e inmunorregulador.

CAPÍTULO 1

Introducción

CAPÍTULO 1: Introducción

1.1. Los cestodos: una clase de gusanos planos parásitos

Los helmintos (del griego helminth, gusano) son animales invertebrados que agrupan gusanos de vida libre y gusanos parásitos. No constituyen un grupo monofilético dado que comprenden distintos phyla; los nematelmintos o gusanos redondos y los platelmintos o gusanos planos (aplanadas dorso-ventralmente). Dentro de los platelmintos la mayoría de las especies descritas pertenecen a un clado monofilético de parásitos obligados, los Neodermata o platelmintos parásitos, cuyo origen marca una de las transiciones más exitosas al parasitismo en el reino animal^{1,2}. Los platelmintos parásitos se encuentran muy bien adaptados a este tipo de vida y presentan grandes diferencias morfológicas y fisiológicas con los organismos de vida libre. Se caracterizan por poseer ciclos de vida complejos que tienen por objetivo maximizar su supervivencia y son considerados endoparásitos, ya que generalmente sus estadios infectantes se alojan en órganos internos de diversos tipos de animales, tanto vertebrados como invertebrados³. Las infecciones que causan provocan daño en el órgano infectado pero también, debido a la competencia por diversos nutrientes con sus hospederos, provocan debilidad y deficiencias en el desarrollo de los animales que parasitan y en algunos casos la muerte. Estas infecciones tienen gran importancia a nivel sanitario, muchas afectan al ganado produciendo graves pérdidas económicas a nivel mundial y algunas son zoonosis con impacto en la salud pública^{4,5}.

Los platelmintos parásitos agrupan las clases taxonómicas Monogenea, Trematoda (trematodos) y Cestoda (tenias). Los cestodos, conocidos generalmente como tenias, son organismos acelomados que desarrollaron impresionantes adaptaciones al parasitismo⁶. Sus ciclos de vida son complejos e incluyen distintos estadios que infectan dos o más hospederos. Cada estadio del parásito se encuentra especializado para infectar aquel hospedero que les permita alcanzar un desarrollo óptimo en relación a su crecimiento y fertilidad, disminuyendo la mortalidad y facilitando la sobrevida⁷. Salvo algunas excepciones, el estadio adulto de los cestodos parasita exclusivamente el tracto digestivo de su hospedero definitivo, usualmente un vertebrado. Por el contrario, los estadios larvarios son capaces de establecerse en diversos órganos del hospedero intermediario. Si bien el ciclo de vida difiere entre especies de cestodos, el esquema general comienza con la embriogénesis que origina un huevo que contiene a la oncósfera. El huevo es ingerido por el hospedero intermediario, eclosiona la oncósfera y migra hasta alcanzar una localización extraintestinal en diversos órganos, donde se establece como forma larvaria. Cuando la larva es ingerida por un hospedero definitivo se desarrolla como adulto en el tracto digestivo del mismo. Los cestodos poseen estructuras anatómicas especializadas para la vida parasitaria. La oncósfera y el estadio larvario cuentan con una capa acelular externa que los protege de las condiciones desfavorables o agresiones del medio y el adulto posee generalmente ganchos y ventosas que le permiten anclarse y mantenerse unido al epitelio intestinal. Su condición de parásitos los ha llevado a carecer de aparato digestivo así como de vías de síntesis y degradación de algunos componentes. El intercambio de nutrientes y la eliminación de desechos ocurren a través del tegumento externo que los recubre, estructura que ha adquirido un alto grado de especialización para cumplir con estas funciones. Como consecuencia de la baja disponibilidad de oxígeno

presente en los sitios anatómicos del hospedero que parasitan, en los cestodos predomina el metabolismo anaerobio.

La necesidad de complejos sistemas para reproducir *in vitro* el ciclo de vida de los cestodos, así como la falta de líneas celulares derivadas de estos parásitos, entre otros obstáculos, han dilatado el conocimiento sobre su desarrollo y capacidades reguladoras extraordinarias. Las descripciones existentes provienen, en su mayoría, del análisis del material aislado de infecciones naturales. Recientemente se ha logrado establecer el ciclo de vida de *Hymenolepis microstoma* en el laboratorio⁸, lo que ha representado un gran avance para el estudio de este y otros cestodos.

Dentro de los cestodos, Taenia solium y Echinococcus spp. son los de mayor importancia en términos de la salud pública, porque sus estadios larvarios causan las zoonosis conocidas como cisticercosis y echinococcosis, enfermedades tropicales desatendidas de gran prevalencia en países (https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/echinococcosis, en vías de desarrollo https://www.who.int/health-topics/taeniasis-andcysticercosis). El género Echinococcus engloba especies que parasitan a los humanos y animales domésticos e incluye a los miembros de E. granulosus sensu lato^{#1} (s.l.), E. multilocularis, E. shiquicus, E. voqeli y E. oligarthrus⁹. Dentro de ellas se destacan E. multilocularis y E. granulosus s.l. por su impacto sanitario. E. multilocularis es el agente causante de la equinococcosis alveolar, asociada al crecimiento de la larva en forma progresiva en el parénquima hepático, formando múltiples quistes¹⁰. La echinococcosis alveolar está prácticamente restringida al hemisferio norte y es endémica en Asia, particularmente en China y la región del Tíbet y, pero con presencia también en Europa y América del Norte^{11–13}. La infección por E. granulosus (s.l.) es conocida como echinococcosis quística (CE, del inglés cystic echinococcosis). Se trata de una infección endémica o hiperendémica de América del Sur, encontrándose especialmente en Argentina, el sur de Brasil, Uruguay, Chile y las zonas montañosas de Perú y Bolivia, donde tiene un alto impacto sobre la salud humana y animal^{12,14}. Este trabajo de tesis se centró en el parásito Echinococcus granulosus s.l., por ser uno de los cestodos de mayor importancia sanitaria en nuestro país y región.

1.2. Echinococcus granulosus s.l.

1.2.1. Especies y genotipos comprendidos en E. granulosus s.l.

E. granulosus s.l. comprende varias especies que fueron inicialmente mal definidas y diferenciadas como cepas o variantes genotípicas de acuerdo a su morfología, grado de desarrollo, virulencia, adaptación a diferentes hospederos y alcance geográfico, entre otros factores. Estudios posteriores, basados en la secuenciación del ADN mitocondrial han dado como resultado el reconocimiento de 10 genotipos dentro de *E. granulosus* s.l., cada una con preferencia por infectar un hospedero diferente: G1 (cepa de oveja); G2 (cepa de oveja de Tasmania); G3 (cepa de búfalo); G4 (cepa de caballo); G5 (cepa bovina); G6 (cepa de camello); G7 (cepa porcina); G8 (cepa de

^{#1} Sensu lato refiere a organismos que muestran una alta divergencia genética aunque diferencias morfológicas no han sido verificadas⁵¹⁷.

cérvido americano); y G10 (cepa de cérvido europea o fenoescandinava). Estos genotipo se agruparon dentro de cinco especies, *E. granulosus* sensu stricto^{#2} (s.s., que incluye los genotipos G1-G3), *E. equinus* (G4), *E. ortleppi* (G5), *E. canadensis* (G6-G10) y *E. felidis*¹⁵⁻¹⁹. *E. granulosus* s.s. si bien utiliza principalmente ovinos como hospederos intermedios, también es capaz de infectar otros animales, como el ganado vacuno, y los humanos. El genotipo G2 o cepa oveja de Tasmania también utiliza a la oveja como hospedero, mientras que el genotipo G3 parece afectar al búfalo, aunque también se ha encontrado en bovinos²⁰.

1.2.2. Distribución geográfica de E. granulosus s.l.



Figura 1.1. Distribución geográfica de *E. granulosus* **s.l.**. Este parásito se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial, con alta prevalencia en la zona Mediterránea de Europa, en Asia (especialmente en Rusia y China), en la zona norte y este de África y en la zona sur de América Latina (adaptado de <u>http://www.who.int/echinococcosis/en/</u>).

El patrón de distribución de *E. granulosus* s.l. se ha mantenido esencialmente sin cambios en las últimas 2 décadas; se encuentra presente en todo el mundo, a excepción Islandia y Groenlandia, y su distribución tiende a ser focal. Los última distribución geográfica publicada por la Organización Mundial de la Salud en el año 2011 así lo ilustra (Figura 1.1). Este parásito es particularmente común en América del Sur, la cuenca Mediterránea, Europa del Este y Asia. Sin embargo, su distribución

^{#2} Sensu stricto refiere a organismos que muestran una significativa divergencia en el análisis molecular, pero no muestran diferencias morfológicas⁵¹⁷.

geográfica varía según la especie de *E. granulosus* s.l.. De los miembros de este complejo, *E. granulosus* s.s., *E. canadensis* y *E. ortleppi* son cosmopolitas y extendidas⁹. El genotipo G1 se encuentra presente en Europa, Medio Oriente, África, Asia, Australia, Nueva Zelanda, América Latina y América del Norte (principalmente en el este de EEUU). El genotipo G2 en un principio se encontró limitado a la región geográfica de Tasmania, en Australia, sin embargo actualmente también ha sido identificado en Asia, América Latina, África y Europa. El genotipo G3 se encuentra en Asia y Europa y el genotipo G4 (*E. equinus*) en Europa, el Medio Oriente y África. El genotipo G5 (*E. ortleppi*) se ha reportado en Europa, África, Asia y América Latina. En relación a *E. canadensis*, el genotipo G6 se ha documentado en Medio Oriente, África, Asia y América Latina y el genotipo G7 en Europa, Rusia y América Latina, mientras que el genotipo G9 (estrechamente relacionado) solamente se ha informado desde Polonia. Los genotipos G8 y G10 se encuentran en América del Norte, principalmente en Canadá y al norte de EEUU, al igual que en Eurasia. Por último, se cree que *E. felidis* existe sólo en África.

1.2.3. Ciclo de vida

E. granulosus s.l. presenta un ciclo de vida complejo que requiere de dos hospederos para completarse^{7,21–24} (Figura 1.2). El hospedero definitivo es un animal carnívoro (generalmente perro, zorro u otros cánidos) que aloja en su intestino delgado a la forma adulta del parásito, mientras que el hospedero intermediario es un animal herbívoro u omnívoro (principalmente ungulados domésticos o el hombre) que aloja en sus vísceras a la forma larvaria. El adulto de E. granulosus s.l. es un organismo hermafrodita segmentado en el que cada segmento presenta órganos sexuales masculinos y femeninos. La madurez sexual del adulto se alcanza en el segmento terminal tras algunas semanas post-infección, produciendo huevos que se liberan al ambiente junto a las heces del hospedero definitivo. El hospedero intermediario se infecta cuando ingiere alimentos o agua contaminada con los huevos del parásito. Una vez en el intestino, el huevo eclosiona y libera el embrión u oncósfera, que atraviesa la lámina propia y es transportado por los vasos sanguíneos hasta alcanzar las vísceras, generalmente hígado o pulmón (aunque no son excluyentes otras localizaciones). Tras establecerse en ellos, la oncósfera da origen al estadio larvario o hidátide (metacestodo) que se desarrolla como una vesícula unilocular de contenido líquido que aumenta de tamaño progresivamente. Cuando la hidátide alcanza la madurez genera protoescólices (PE) por reproducción asexuada que son liberados en su interior, transformándose en fértil. Los PE constituyen el estadio infectivo para el hospedero definitivo. Cuando éste ingiere vísceras de animales infectados, los PE se establecen en el intestino delgado y se diferencian a adulto, cerrando así el ciclo de vida del parásito. Si bien el hombre puede actuar como hospedero intermediario alojando a la hidátide en sus vísceras, se considera un hospedero accidental, porque interrumpe el ciclo de vida natural del parásito. La infección con la hidátide en el ser humano es consecuencia de malas prácticas sanitarias que conducen a la ingesta de huevos de E. granulosus s.l. (en agua y/o verduras contaminadas o por falta de hábitos de aseo luego del contacto con perros).



Figura 1.2. Ciclo de vida del parásito *E. granulosus* **s.l..** La forma adulta (1) se establece en el intestino delgado de su hospedero definitivo y genera huevos embrionados que se liberan con las heces. El hospedero intermediario se infecta con estos huevos (2), la oncósfera eclosiona en el intestino (3) y por circulación llega al órgano donde se transforma en hidátide (hígado y pulmón principalmente), que constituye el estadio asociado con el diagnóstico de la echinococcosis quística (4). La hidátide madura y por reproducción asexuada genera protoescólices, que son el estadio infectivo para el hospedero definitivo (5) y (6). El hombre puede actuar como un hospedero intermediario accidental, interrumpiendo el ciclo de vida del parásito (adaptado de <u>http://www.cdc.gov/parasites/echinococcosis/biology.html</u>).

1.2.4. La echinococcosis quística

La infección provocada por la hidátide es conocida como echinococcosis quística (CE, del inglés *cystic echinococcosis*) o hidatidosis. Es una enfermedad tropical zoonótica desatendida y fuertemente asociada con la ganadería en contextos subdesarrollados²⁵, siendo responsable de la pérdida de alrededor de 1 millón de vidas humanas al año^{26,27}. En los hospederos intermediarios naturales, no presenta una alta mortalidad pero sí constituye un problema de salud pública por los altos índices de morbilidad que genera, sobre todo en países con gran actividad ganadera. A través de estudios epidemiológicos se ha determinado que *E. granulosus* s.s. causa entre el 73% y el 88% de los casos de CE en humanos en todo el mundo^{14,28} mientras que en segundo lugar se ubican los genotipos G6 y G7 de *E. canadensis*, siendo responsables de entre el 11% y el 21% de los casos^{17,27,29,30}. Por otra parte, la CE tiene un fuerte impacto sobre la salud animal, provocando infecciones en el ganado que conllevan a grandes pérdidas económicas para los productores (menor rendimiento y valor de la carne y leche)^{10,31}. Sin embargo, debido a su naturaleza mayoritariamente asintomática, la CE no es visualizada por el productor rural como un grave problema sanitario.

La hidátide se establece en el parénquima de los órganos internos del hospedero intermediario, siendo el sitio más común el hígado seguido de los pulmones (entre 80 y 67%, y 20% de los casos, respectivamente^{14,23,26}). En hospederos a los que está bien adaptada, la hidátide genera una infección crónica pasando desapercibida por tiempos prolongados (muchos años), a pesar de que puede alcanzar un tamaño considerable (decenas de centímetros de diámetro). Esto se debe al lento crecimiento de la larva (de milímetros a decenas de milímetros por año^{7,10}) y a la excelente adaptación del parásito a su hospedero, reflejada en el fuerte control de la respuesta inflamatoria que induce³². Como consecuencia de este control, la hidátide se rodea de una capa fibrosa (adventicia) originada por la resolución de la inflamación del hospedero³³, formando una estructura conocida como quiste hidático (QH, Figura 1.2). La sintomatología de la CE se hace evidente de forma tardía con la aparición de complicaciones como la compresión de los órganos adyacentes o la rotura del quiste, y varía con el órgano afectado y el número y tamaño de los quistes presentes. El derrame del contenido del quiste causa síntomas alérgicos, pudiendo llevar al shock anafiláctico³⁴, y promueve el desarrollo generalmente de múltiples hidátides a partir de los PE liberados, lo cual se asocia con mayor gravedad de la CE²³.

1.2.4.1. Morfología de la hidátide



Figura 1.2. Esquema de la hidátide de *E. granulosus***s.l.**. La hidátide tiene una estructura vesicular, tipo un saco, de contenido líquido. Está delimitada por una pared (recuadro), formada por una capa externa acelular, la capa laminar (CL), y por una interna celular, la capa germinativa (CG). A partir de la CG surgen por gemación las vesículas hijas e hidátides hijas (si presentan CL propia) conteniendo los PE. El líquido en su interior se conoce como líquido hidático (LH) y colecta los productos de secreción y excreción del parásito junto con moléculas del hospedero. Por fuera, la hidátide se encuentra rodeada de una capa de colágeno generada por el hospedero denominada adventicia. El conjunto de la hidátide y la capa adventicia se conoce como quiste hidático (QH). El QH se encuentra inmerso en el parénquima de una víscera, por lo general hígado o pulmón.

La hidátide es una estructura subesférica de contenido líquido (líquido hidático, LH)^{7,35}. Está formada por dos capas: una capa interna, celular, denominada germinativa (CG) y una capa externa, acelular, llamada laminar (CL). Esta última es permeable, rica en carbohidratos y puede alcanzar varios milímetros de grosor. La CG constituye la estructura viva de la larva a partir de la cual se generan los PE por brotamiento (reproducción asexuada). En ocasiones se forman en el interior de la hidátide vesículas derivadas de la CG que poseen PE en su interior, denominadas vesículas hijas. Además, se pueden formar hidátides hijas cuando la vesícula hija adquiere una CL sintetizada por las células de la CG que la delimita. La infección temprana con *E. granulosus* s.l. genera una reacción inflamatoria local con infiltrado de leucocitos. Como ya se mencionó, esta respuesta inflamatoria inicial es controlada en los hospederos intermediarios a los que el parásito está bien adaptado, y una vez resuelta la inflamación, las hidátides quedan rodeadas por la capa fibrosa llamada adventicia formando el QH (Figura 1.2).

La CL brinda resistencia y soporte a la hidátide y mantiene a las células del parásito alejadas del sistema inmune del hospedero. Es sintetizada por las células de la CG y se compone por una red o malla tridimensional de un componente fibrilar rico en mucinas decoradas con O-glicanos, Nacetilgalactosamina y N-acetilglucosamina, y un componente granular formado mayoritariamente por myo-inositol hexakisfosfato cálcico³⁶ (Ins P_6). A través de esta malla ocurre el intercambio de nutrientes y productos de desecho entre el interior y el exterior de la hidátide, permitiendo el pasaje de macromoléculas plasmáticas de gran tamaño, como por ejemplo inmunoglobulinas³⁷. Los mecanismos que regulan este transporte son aún desconocidos. Por otro lado, la CG se conforma por un sincitio celular con una estructura similar al tegumento del parásito adulto. La porción en contacto con la capa laminar está compuesta por extensiones denominadas microtricas que se insertan en la misma, mientras que en la región más distal se encuentran células del tegumento, células musculares, células nerviosas, células de reserva de glucógeno y células indiferenciadas³⁸. A medida que la larva madura las células indiferenciadas proliferan, originando pequeñas vesículas hijas que crecen hacia el interior de la hidátide, aumentan de tamaño y generan los PE por reproducción asexuada. Tanto las células de la CG, como los PE son metabólicamente activos. Cuando la larva contiene PE en su interior, se considera que ha alcanzado la fertilidad, por lo cual se la denomina hidátide fértil. Sin embargo, muchas veces, cuando el parásito no se encuentra bien adaptado a su hospedero intermediario, la hidátide no produce PE, derivando en la formación de una hidátide no fértil. Probablemente, existan múltiples factores vinculados a la pérdida de la fertilidad de la hidátide en un hospedero no adecuado; más allá de los factores nutricionales y metabólicos que podrían afectar el desarrollo de la larva, la capacidad de regular la respuesta inmune temprana generada en su hospedero juega un papel importante. En este sentido, el éxito de los mecanismos de control de la respuesta inflamatoria que lleva a la generación de la capa adventicia se ha asociado con la formación de QH fértiles. Si la adaptación al hospedador no es buena, la inflamación temprana evoluciona generando una estructura del tipo granulomatosa con infiltración de leucocitos, y se forman QH no fértiles, llevando incluso a la muerte de la hidátide. En nuestra experiencia en la Cátedra de Inmunología a lo largo de muchos años de procesamiento de las vísceras de animales infectados, hemos detectado que los QH derivados de ovinos suelen presentar hidátides fértiles mientras que en los bovinos existe una mayor proporción de hidátides no fértiles. Respecto al LH, contiene una mezcla compleja de productos de excreción/secreción del parásito así como también moléculas derivadas del hospedero, principalmente albúmina, inmunoglobulinas y componentes del sistema complemento³⁹⁻⁴³. La presencia de esta variedad de macromoléculas del hospedero está de

acuerdo con la permeabilidad del QH a macromoléculas (por ejemplo peroxidasa e inmunoglobulinas de clase IgG³⁷) observada en cultivo, pero se desconoce cómo esta permeabilidad puede verse afectada a lo largo de la vida del parásito. Además, se ha determinado que el LH cuenta con una amplia gama de lípidos neutros y polares^{39,44,45}.

Una característica que sobresale de los PE es su gran plasticidad ya que pueden desarrollarse en dirección estrobilar, dando lugar al estadio adulto en el hospedero definitivo, o en dirección vesicular, generando nuevas hidátides en el hospedero intermediario (por ejemplo cuando un traumatismo conduce a la pérdida de la integridad de la pared de la hidátide). Los mecanismos moleculares que gobiernan esta diferenciación no han sido esclarecidos aún. La formación de hidátides secundarias, por la liberación de PE de una hidátide fértil se conoce como infección secundaria⁴⁶. Las hidátides secundarias pueden localizarse en una variedad de órganos si los PE alcanzan la circulación sanguínea. Esto ha permitido generar modelos de infección secundaria en animales, herramienta ampliamente utilizada para el estudio de la infección provocada por *E. granulosus* s.l.⁴⁷.

1.2.4.2. Características de la respuesta inmune del hospedero en la CE y su regulación negativa

La literatura que refiere a la respuesta inmune montada por el hospedero no especifica, en la mayoría de los casos, la especie parasitaria de origen utilizada en los estudios. Debido a esto, lo que se describe a continuación refiere a *E. granulosus* s.l. y, por simplicidad, se utilizará el término *E. granulosus*, salvo que se explicite lo contrario.

La respuesta inmune en el hospedero intermediario frente a la infección por *E. granulosus* se ha dividido conceptualmente en la etapa de pre-enquistamiento y la fase posterior al enquistamiento, diferenciada por la formación de la CL alrededor de las oncósferas infectivas en desarrollo⁴⁸.

1.2.4.2.1. Fase de pre-enquistamiento y establecimiento

Como se mencionó, la oncósfera es la forma infectiva del parásito que ingresa al hospedero intermediario. La oncósfera es móvil y tiene ganchos, características que le permiten penetrar activamente en la pared intestinal. Aproximadamente una semana después, al llegar al órgano blanco, la oncósfera pierde sus ganchos, genera una cavidad central, y comienza a sintetizar la CL, convirtiéndose así en una pequeña hidátide.

La descripción de la respuesta inmune frente a las oncósferas ha sido difícil de abordar, principalmente debido a la ausencia de síntomas en las infecciones naturales y a la dificultad para obtener y manipular este estadio del parásito para realizar infecciones experimentales⁴⁹. Sin embargo, es claro que las oncósferas activan una potente respuesta inmune en su hospedero, analizada en términos de la generación de anticuerpos⁵⁰, induciendo altos niveles de protección tras un desafío posterior (inmunidad concomitante⁵¹). Es posible que esta respuesta contribuya a la eliminación de la mayoría de los parásitos en la etapa de pre-enquistamiento. También se observó protección frente a la infección experimental por oncósferas en ovinos luego de la inmunización con oncósferas o sus antígenos^{50,52,53}, lo que demuestra la eficacia del suero de animales inmunizados para interferir con el desarrollo de hidátides a partir de oncósferas *in vitro* y que podría ser relevante para el control de la infección en la etapa de pre-enquistamiento^{50,54,55}. La protección inmunitaria que confieren las preparaciones de oncósfera crudas se imita mediante la

vacunación con un solo antígeno proteico, llamado Eg95, en forma nativa o recombinante⁵⁶. La protección generada depende de la producción de anticuerpos específicos y de la acción del sistema complemento^{50,52,57,58}, reforzado por la presencia de neutrófilos⁵⁹. Tras la infección oral, los niveles más altos de IgG, IgM e IgE específicas de oncósfera se encontraron en ovejas resistentes en comparación con aquellas susceptibles⁶⁰. En animales no vacunados se cree que para el momento en el que se monta la respuesta inmune adaptativa, el parásito ya no expresa o expone antígenos de la oncósfera, encontrándose protegido por la CL. El modelo más utilizado para estudiar la respuesta temprana a la infección es la inyección intraperitoneal de PE en ratones⁴⁹, que refleja la infección secundaria que ocurre en el hospedero intermedio después de la ruptura de una hidátide fértil. Se ha demostrado que menos del 10% de los PE inoculados desarrollan hidátides^{47,61,62} y que diferentes genotipos del parásito pueden diferir en el éxito para establecerse en el hospedero intermediario (en infecciones naturales^{63–66} y en infecciones secundarias utilizando el modelo de ratón⁶⁷), aunque el papel de la respuesta inmune en estas condiciones no ha sido estudiado. Los PE evocan una fuerte respuesta inflamatoria parcialmente dependiente del componente C5 del complemento, con el reclutamiento temprano de neutrófilos, macrófagos y eosinófilos, seguido de linfocitos.^{62,68–73}. Esta respuesta inflamatoria podría resultar dañina para los el parásito, ya que se comprobó que los PE son capaces de activar neutrófilos e inducir la producción de NO· por células mononucleares de sangre periférica (PBMC, del inglés peripheral blood mononuclear cells)^{74,75}. Asimismo, se ha demostrado que los macrófagos, el NO-, la proteína catiónica de los eosinófilos y el complemento son capaces de afectar la viabilidad de los PE in vitro^{58,69,72,75-77}. Además, a nivel local se observó una respuesta de citoquinas en la primera semana post-infección, con niveles elevados IFN-γ durante los primeros 3 días, mientras que IL-4, IL-5 e IL-10 aumentaron a partir del quinto día⁶⁸. Por otro lado, una fracción de carbohidratos presente en los PE (denominada E4⁺) indujo una respuesta de anticuerpos T-independiente con producción de IgM, IgG2a, IgG2b e IgG378-80 que podría comprometer células B1 peritoneales y/o células B de la zona marginal del bazo. También se describió a nivel de bazo, la inducción de una respuesta tipo Th2 a la semana p.i. que evoluciona hacia una respuesta Th0 a partir de la cuarta semana⁸¹. De todos modos, estas respuestas local y sistémica no logran ser totalmente efectivas dado que un cierto porcentaje de los parásitos logra sobrevivir y formar hidátides. Esto podría explicarse si los PE fueran capaces de montar mecanismos de evasión y modulación del sistema inmune para hacer frente a la respuesta del hospedero. Dado que se conoce que las respuestas Th2 son potencialmente dañinas para los cestodos⁸² es posible que la modulación hacia una respuesta ThO con alta producción de IL-10 contribuya a frenar la inflamación favoreciendo la sobrevida del parásito⁸¹. De hecho, cuando se inyectaron PE muertos se indujo una respuesta Th2 que no logró ser modulada⁸¹. Consistentemente, se detectó aumento en los niveles de IL-10, TGF-B y de células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺ y CD4⁺Foxp3⁺) durante los primeros 20 días en el modelo de infección secundaria en ratón^{83,84}. No se conoce exactamente qué componentes del PE están involucrados en modular la respuesta inmune temprana para lograr el control de la respuesta Th2. Se han descrito mecanismos de evasión inmune que podrían actuar durante la fase de establecimiento de los PE pero no se han vinculado con el sesgo de la respuesta. Dentro de éstos se incluye la activación policional de las células B⁸⁵ y la capacidad de carbohidratos derivados de PE de inducir IL-10 y reducir la proliferación de los esplenocitos in vitro^{80,86,87}. Por otra parte, cabe destacar que los PE expresan el antígeno B (EgAgB) y una proteína tegumentaria (EgTeg, AY874524.1 en GenBank⁸⁸), dos moléculas que mostraron actividades inmunorreguladoras en cultivo, tales como inhibición de la quimiotaxis y de la producción de especies reactivas del oxígeno (sólo para el

EgAgB)^{74,88,89}. Estudios con células dendríticas (DCs) en cultivo mixto linfocitario sugieren que el EgAgB sería capaz de favorecer la producción de citoquinas de tipo Th2, como se analiza más adelante⁹⁰. En relación a la capacidad de los PE de interferir con los mecanismos efectores del sistema inmune, se ha reportado que presentan actividad de unión a Fc, lo que podría secuestrar a las IgG1 e IgG3 humanas impidiendo su interacción a través del parátope⁹¹. Además, se ha observado que una tiorredoxina (EgTPx) presente en los PE podría actuar como una defensa antioxidante del parásito buscando evitar el daño ocasionado por radicales del oxígeno⁹². Respecto al sistema complemento, no se conoce de qué manera el parásito podría evitar el daño mediado a través de la vía alternativa o clásica (activada por anticuerpos IgM o IgG2 generados en forma T-independiente). Sí se conoce que los PE se vuelven resistentes a la acción nociva de este sistema una vez que comienzan a formar vesículas para convertirse en hidátides en miniatura^{71,93}.

1.2.4.2.2. Fase post-enquistamiento

La CL permite a E. granulosus protegerse de las defensas del hospedero, dado que oficia de barrera física entre la CG y, al menos, las células efectoras de la inmunidad. Sin embargo, no brinda a la hidátide una protección total ya que en esta fase de la CE se observó una marcada activación de la inmunidad con infiltración celular, presencia de anticuerpos específicos y unión de componentes del complemento a la CL (revisado por^{36,49,94,95}). Esta respuesta afecta la viabilidad y/o fertilidad como consecuencia de mecanismos sostenidos de daño⁹⁶. Las observaciones sobre infecciones en una amplia gama de hospederos intermediarios apuntan en la misma dirección: el mantenimiento de la inflamación local se asocia con una baja viabilidad parasitaria y la resolución inflamatoria se asocia con larvas prósperas⁹⁷. Por lo tanto, la estrategia de supervivencia del parásito en la fase post-enquistamiento no se basa únicamente en el despliegue de un escudo físico, sino también en la regulación negativa de las respuestas inmunes del hospedero. Estudios de infección en el modelo murino mostraron que la viabilidad parasitaria se asoció con la presencia de altos niveles de IL-10, mientras que en las hidátides muertas prevaleció una respuesta con presencia de IL-4 e IFN- $\gamma^{98#3}$. De manera similar, en humanos, la remoción quirúrgica de la larva llevó a la reducción de los niveles de IL-10 y aumento de IFN-y secretados por PBMC⁹⁹. Adicionalmente, en ratones con infección hidática establecida y en pacientes infectados con CE se documentó la presencia de células mieloides supresoras y células T reguladoras¹⁰⁰⁻¹⁰², las últimas también identificadas alrededor de guistes ovinos¹⁰³. La situación más común es que la hidátide quede rodeada por la adventicia, una capa de colágeno no infiltrada, con algunos focos inflamatorios distales al parásito^{97,104–106}. En suma la respuesta inmune es potencialmente dañina para el parásito pero no permite su eliminación, y como consecuencia se establecen infecciones crónicas que suelen transcurrir inadvertidas por años, reflejando la gran adaptación de Echinococcus a sus hospederos intermediarios.

El escenario actual apoya la existencia de un ambiente inmunomodulador entorno a las hidátides establecidas, regulando a la baja la inflamación inducida por la respuesta T, predominantemente

^{#3} El perfil de diferenciación de los linfocitos T depende del mensaje de citoquinas derivadas de la DC al momento de la activación T. En presencia de IL-12/IFNγ los linfocitos T se diferencian hacia un perfil Th1 y secretan IFNγ. La presencia de IL-4 lleva a la adquisición de un perfil Th2 con secreción de IL-4, IL-5 e IL-13 por parte de los linfocitos T.

Th2, y favoreciendo así la supervivencia del parásito⁴⁹. Como ya se mencionó, las respuestas Th2 juegan un papel crucial en la CE, así como en otras infecciones por parásitos helmintos¹⁰⁷, y tienen por fin la eliminación del patógeno, pero, cuando esto no ocurre, favorecen su encapsulación para contenerlo. Estas respuestas involucran las citoquinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, los isotipos de anticuerpos IgG1, IgG4 e IgE y la expansión de poblaciones de eosinófilos, basófilos, mastocitos y macrófagos alternativamente activados^{94,95}. Los eosinófilos, basófilos y mastocitos presentan en su superficie receptores que reconocen la porción Fc del isotipo IgE (Fcɛ), que les permitiría reconocer específicamente componentes del parásito y activarse sobre su superficie, liberando mediadores inflamatorios y gránulos con propiedades citotóxicas (citotoxicidad mediada por anticuerpos, ADCC). En particular los eosinófilos pueden mediar respuestas de ADCC también a través de receptores para la porción Fc de las IgG1, lo que conduce a la liberación de las proteínas citotóxicas almacenadas en sus gránulos, como la proteína básica mayor y la proteína catiónica, esta última con demostrada capacidad tóxica sobre los PE⁷⁷. El reclutamiento de los eosinófilos está favorecido por la producción de IL-5 por los linfocitos Th2 efectores presentes en el sitio de la infección. Respecto a la IgG4, se trata de un isotipo con poca capacidad para inducir la activación del sistema complemento y celular⁸⁶. Otras citoquinas secretadas por los linfocitos Th2, como la IL-4 e IL-13, se encuentran asociadas a las funciones de reparación tisular y contención del parásito a través de su encapsulamiento. Esto es porque, entre otras acciones, estas citoquinas inducen la diferenciación de los macrófagos al fenotipo de activación denominado alternativo o M2^{108,109}.

En paralelo a la respuesta Th2, en la CE existe también un componente Th1^{34,110,111}. Esta respuesta no es sorprendente ya que podría derivar de la activación inflamatoria generada por el daño tisular que ocasiona el crecimiento de la hidátide en el órgano infectado. Siendo este el caso, podría explicarse que el lento crecimiento de la hidátide contribuya a controlar el daño tisular, ya que la respuesta Th1 desencadenada podría comprometer la viabilidad del parásito a través de la producción de óxido nítrico^{36,112}. En este sentido, la idea de que la muerte del parásito interrumpe los mecanismos de regulación es compatible con el hecho de que pacientes que no responden bien a la quimioterapia mantienen respuestas sesgadas hacia Th2 mientras que en aquellos curados mediante este tratamiento prevalecieron respuestas con un perfil de tipo Th1³⁴.

El componente inmunomodulador presente en la respuesta contra helmintos emplearía células reguladoras (linfocitos T reguladores Foxp3⁺ y células mieloides supresoras o MDSCs, entre otros) y citoquinas supresoras como IL-10 y TGF-β para restringir las respuestas efectoras, mediadas principalmente por la rama Th2. Ese escenario ha llevado a la descripción de la respuesta de tipo 2 modificada¹¹³⁻¹¹⁶. Si bien los conocimientos actuales respecto al fuerte control de la respuesta inmune desplegado por E. granulosus s.l. todavía son limitados a nivel celular y molecular, encuentran sustento en la exacerbación de mecanismos anti-inflamatorios/reguladores observados en otros helmintos parásitos^{115–117}. Respecto a la CE, la histopatología de las lesiones que ocasiona es más compatible con una potente respuesta reguladora que con una respuesta Th2 completa 32 . De hecho, los pacientes con CE exhiben porcentajes elevados de células T reguladoras Foxp3⁺ en sangre y niveles séricos de TGF- β e IL-10 aumentados^{34,111}. Además se ha evidenciado una correlación entre los niveles aumentados de TGF-β y la fibrosis hepática¹¹⁸. El uso de mecanismos moduladores por E. granulosus también se hizo evidente utilizando un modelo murino de asma donde se observó que la infección disminuyó la inflamación pulmonar (principalmente mediada por eosinófilos), el número de eosinófilos en el fluido broncoalveolar y el número de células de Globet inducidas por el asma¹⁰². En concordancia con esto, se observaron niveles más bajos de la

proteína básica mayor de los eosinófilos y de IL-5 en el tejido pulmonar de los ratones asmáticos infectados en comparación con los ratones asmáticos control. Además, la infección se asoció con un aumento de IL-10 secretada por esplenocitos activados in vitro. Finalmente, se encontró un porcentaje levemente mayor de linfocitos T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ en el bazo de los ratones asmáticos infectados en comparación con sus controles (asmáticos no infectados). Por otra parte los componentes de la CL participarían de los mecanismos moduladores ya que su administración en un modelo murino de colitis disminuyó la producción de NO·, la activación de NFkB y el daño en la mucosa intestinal, así como también los niveles de IFN-y y TNF- $\alpha^{119,120}$. Existen también evidencias de inmunorregulación en la infección con E. multilocularis. A pesar de sus diferencias con la CE, se determinó la relevancia de las células T reguladoras Foxp3⁺ para la regulación llevada a cabo por este parásito en un modelo murino, encontrando que la infección indujo un aumento de esta población que se asoció con mayor proliferación parasitaria y disminución de moléculas coestimuladoras en las células presentadoras de antígeno (APC^{#4})¹²¹. En base a estos reportes, las células T reguladoras Foxp3⁺ parecen ser claves en la regulación del sistema inmune a favor de la sobrevida del parásito y podrían considerarse para desarrollar una inmunoterapia contra la echinococcosis alveolar¹²¹. Respecto a la presencia de las MDSCs, la infección por *E. granulosus* provocó un incremento en las células CD11b⁺Gr-1⁺, compatible con esta población, a nivel de las PBMCs y del bazo. Dichas células podrían cumplir un rol en la inducción de células T reguladoras^{122,123}. Actualmente se postula que las MDSC constituyen una población heterogénea que podría derivar de precursores mieloides de células dendríticas (DCs), macrófagos y granulocitos, o de células mieloides ya diferenciadas, cuya plasticidad permitiría adoptar un fenotipo con propiedades supresoras en respuesta a la infección¹²⁴.

1.2.4.2.3. Actividades inmunomoduladoras en componentes de la hidátide

Múltiples circuitos de regulación y/o anti-inflamatorios hacen posible la persistencia parasitaria. Dentro de ellos se ha generado conocimiento en torno al control de la activación del sistema complemento y de las APC.

Respecto a la activación del sistema complemento del hospedero, éste podría dañar al parásito ya que se observó que ratones C5 deficientes promovieron mayor reclutamiento de eosinófilos y fueron más propensos al desarrollo de hidátides de mayor tamaño⁶⁹. Sin embargo, las observaciones apuntan a que la CL induce una pobre activación de este sistema^{71,125}. El secuestro por la CL del factor H, un inhibidor de la activación de la vía alternativa, y la activación abortiva de la vía clásica, mediada por la interacción de C1q con Ins*P*₆, parecen ser los mecanismos involucrados en la evasión de esta respuesta del hospedero^{126,127}.

Además de interferir con la cascada de activación del sistema complemento, se demostró que la CL modula la activación de células mieloides. En infecciones experimentales en ratones se ha observado que los macrófagos presentes en la interfaz hospedero-parásito internalizan partículas derivadas de la CL, probablemente liberadas a medida que crece la hidátide¹²⁸. Por tanto, es

^{#4} Las APC, principalmente células dendríticas (DCs), macrófagos y linfocitos B, son las únicas capaces de procesar antígenos proteicos provenientes de la vía endocítica, expresarlos en moléculas de MHC-II e inmunoestimular linfocitos T CD4⁺ vírgenes conduciendo a su activación, proliferación y diferenciación.

altamente probable que interacciones similares ocurran en las DCs. Interesantemente, se encontró que la CL es potencialmente capaz de inhibir la activación de DCs por agonistas de TLRs^{#5}, induciendo un fenotipo "semimaduro" tanto *in vitro* como *in vivo*. Este fenotipo está caracterizado por la regulación al alza de CD86 pero no de CD40, y por la inducción de altos niveles de IL-10 pero no de IL-12 tras la estimulación con ligandos de TLR2 y TLR4¹²⁹. Efectos similares se han observado *in vitro* tras la interacción de la CL con los macrófagos (BMDM, por sus siglas en inglés, *bone marrow-derived macrophages*). Este efecto sobre las DCs y macrófagos no dependería de interacciones entre componentes discretos de la CL y receptores celulares, sino del contacto directo con componentes microscópicos de la CL¹³⁰. Se ha propuesto que este contacto resulta en un mecanismo similar al desencadenado por partículas, conocido como MATS (por sus siglas en inglés, *membrane affinity triggered signaling*). A través de este mecanismo se daría la inhibición de la vía PI3K de clase I/Akt asociada al fenotipo "semimaduro" de las DCs y sería posible la activación de IL-18 en presencia de un agonista de TLR¹³⁰⁻¹³².

Con respecto al condicionamiento de macrófagos, estudios realizados por nuestro grupo mostraron que durante las primeras semanas de la infección secundaria en ratón, se detectan en el peritoneo células adherentes con alta expresión de arginasa-1, compatibles con la presencia de macrófagos diferenciados al fenotipo alternativo o M2 (Ana Lía Ramos y Cecilia Casaravilla, Cátedra de Inmunología, datos no publicados). Es posible que los componentes de la CL estén involucrados en esta diferenciación; se observó que la interacción de la CL con macrófagos induce la expresión de arginasa e inhibe la generación de NO·. Las señales que llevan a la inducción de este fenotipo no serían producto de la interacción con las mucinas que forman la malla de la CL, sino con componentes adsorbidos en la misma (incluyendo componentes ricos en mananos)^{119,130}. La generación de macrófagos M2 se ha documentado en otros cestodos como E. multilocularis¹³³, Taenia crassiceps, Mesocestoides vogae¹³⁴ e Hymenolepis diminuta^{135,136}. En particular se observó que la tiorredoxina peroxidasa de la larva de E. multilocularis, EmTPx-1, es capaz de inducir el fenotipo M2¹³⁷potenciando la expresión de *arg1, ym1* e *il-10* y suprimiendo la de genes inducidos por LPS (*inos*, *tnf*- α , *il*-1 β). Como EmTPx-1 se expresa en la CG y en vesículas similares a exosomas, existiría la posibilidad que interactuara con las células innatas en la interfaz con el hospedero. Además, la actividad peroxidasa de EmTPx-1 permitiría descomponer el peróxido de hidrógeno generando mayor resistencia al estrés oxidativo. Corresponde mencionar que, en los macrófagos alternativamente activados promueven la remodelación y reparación tisular que resulta relevante para mitigar el daño ocasionado por el crecimiento del parásito en el órgano donde se establece (sección 1.6.1). La infección con Taenia crassiceps demostró que la vía de STAT1 participa en el reclutamiento de monocitos inflamatorios y el desarrollo de macrófagos M2. Estos macrófagos suprimieron in vitro la proliferación de linfocitos T vírgenes a través de un mecanismo dependiente de PD-L1 y PD-L2 (por sus siglas en inglés, *Programmed Death-Ligands* 1 y 2)¹³⁸. Además productos de secreción/excreción de esta tenia bloquearon la vía de señalización IFN-y/STAT1 en macrófagos

^{#5} Los receptores TLRs (del inglés *Toll-like receptors*, nombrada en base a su homología con el receptor de la proteína Toll de *Drosophila. melanogaster*⁵¹⁸) son una de las principales familias de receptores de la inmunidad innata.

*in vitro*¹³⁹. Por otra parte, antígenos de *H. diminuta* también redujeron la capacidad de macrófagos de activar las células T¹³⁶.

Finalmente, se han identificado componentes del LH con propiedades antigénicas (el EgAgB y el antígeno 5), lo cual demuestra que son transportados a los ganglios linfáticos, si bien aún no se conoce el mecanismo por el cual alcanzan la interfaz con el hospedero. De estos componentes el EgAgB ha sido el mejor caracterizado por su valor para el diagnóstico y por presentar propiedades inmunomoduladoras, que ampliaremos más adelante (sección 1.5) por ser foco de esta tesis.

1.2.4.3. Diagnóstico y tratamiento de la CE

El diagnóstico y seguimiento de la CE se realiza mediante técnicas de imagen, principalmente por ultrasonido o radiografía (para los QH pulmonares) pero también a través de tomografía computarizada o por emisión de positrones con fluorodesoxiglucosa (FDG-PET) y resonancia magnética nuclear^{13,140}. Para confirmar el diagnóstico y/o monitorear la recurrencia de la CE se han aplicado una variedad de técnicas serológicas, dentro de las que se encuentran: enzimoinmunoensayos (ELISA), inmunocromatografía (ICT), inmunofluorescencia indirecta, hemaglutinación indirecta y Western-Blot^{10,141,142}. La IgG específica es el parámetro que se mide con mayor frecuencia. Muchos factores, dentro de los que se incluyen factores técnicos (calidad de la preparación de los antígenos), factores del hospedero (órgano infectado y estado inmunitario), y factores parasitarios (genotipo/especie, tamaño, integridad y viabilidad de la hidátide) pueden influir en la sensibilidad de los ensayos²⁶. Si bien el diagnóstico serológico de la CE tiene sensibilidad adecuada para la detección de las infecciones hepáticas, la misma resulta menor para las infecciones de pulmón y muy baja para infecciones que ocurren en sitios inmunoprivilegiados, como el cerebro o los ojos¹⁴²⁻¹⁴⁴. La sensibilidad también tiende a ser insuficiente en las etapas iniciales de la infección y para hidátides inactivas. De hecho, si bien la mayoría de los inmunoensayos mostraron alta sensibilidad para el diagnóstico de guistes activos o transicionales (CE1-CE3), las técnicas ELISA e ICT fueron las más sensibles para la detección de estadios inactivos (CE4-CE5)¹⁴⁰. Por lo tanto, en la práctica, la serología negativa no excluye la presencia de la CE^{143,144}. Además, la serología utilizada para el seguimiento del paciente no es perfecta, ya que los títulos de anticuerpos pueden persistir durante un tiempo prolongado, independientemente del resultado del tratamiento que reciba el paciente¹⁴².

Para el serodiagnóstico de la CE, inicialmente se utilizaron antígenos crudos o semi-purificados derivados del LH¹⁴². Las principales proteínas antigénicas en el LH son los antígenos 5 (EgAg5) y B (EgAgB), ambos caracterizados en términos moleculares^{113,145}. Se ha reportado que la antigenicidad del EgAg5 se concentra en su subunidad de 38 kDa^{146,147}, de función desconocida. En relación al EgAgB, se trata de la molécula de *E. granulosus* s.l. con mayor valor para el diagnóstico por la fuerte respuesta de anticuerpos que promueve y por ser específica de los cestodos¹⁴⁸. Posteriormente, el uso de antígenos definidos mejoró la serología de la CE; en particular las proteínas recombinantes del EgAgB han funcionado de manera similar al LH crudo en el inmunodiagnóstico. Emplear antígenos puros representa una gran ventaja porque permite evadir problemas asociados a la estandarización de las técnicas serológicas, que resulta muy difícil utilizando el LH. De todas formas, pese a estos avances en el diagnóstico, aproximadamente una quinta parte del total de los pacientes con CE resulta negativo mediante una o más técnicas de detección¹⁴².

Las pruebas serológicas utilizadas para diagnosticar la CE podrían presentar limitaciones asociadas al origen de los antígenos. El genotipo/especie del parásito no ha podido ser considerado al evaluar la sensibilidad de los distintos ensayos serológicos, ya que en la mayoría de los estudios no existe una discriminación según el origen parasitario¹⁴⁰. Esto podría ser particularmente relevante en la infección por *E. canadensis*, ya que, como se mencionó anteriormente, es la segunda especie en importancia a nivel de la salud pública. Durante mucho tiempo se pensó que las consecuencias clínicas de la infección por *E. canadensis* en humanos eran insignificantes en comparación con la infección por *E. granulosus* s.s.. Adicionalmente a las limitaciones de las pruebas serológicas, el subdiagnóstico de la CE por esta especie puede deberse a diversos factores: la larga progresión de la enfermedad en los seres humanos que a menudo transcurre sin síntomas, la falta de especificidad de los síntomas cuando ocurren, la vigilancia inadecuada, y el hecho de que las poblaciones indígenas sean desproporcionadamente afectadas y tengan mayor riesgo de infección¹⁴⁹.

Adicionalmente, la reactividad cruzada con otras infecciones por platelmintos, es otro factor problemático^{142,143}. Por otra parte, cuando la serología no es concluyente el diagnóstico puede confirmarse mediante técnicas de detección de ADN parasitario en muestras obtenidas por remoción quirúrgica. De todas formas, este tipo de herramienta tendría mayor aplicación para la identificación de la especie de *E. granulosus* responsable de la infección¹³.

En relación al tratamiento de la CE, varía según la ubicación, el tamaño y la fertilidad de la hidátide. Existen opciones únicas y combinadas que incluyen cirugía, terapia percutánea, quimioterapia y/o observación (para las hidátides inactivas)^{10,150}. La cirugía busca eliminar completamente al parásito y difiere en su proceder dependiendo del estado de la hidátide. La quimioterapia emplea derivados de benzimidazoles, por lo general albendazol o mebendazol, y se recomienda en casos de quistes inoperables y múltiples, así como también para el tratamiento complementario a la cirugía, ayudando a reducir el riesgo de CE secundaria. En los últimos años se han puesto en práctica tratamientos menos invasivos, basados en la punción y aspiración del contenido de la hidátide, con posterior introducción de una solución antihelmíntica y re-aspiración (PAIR) o con evacuación percutánea, que finalmente admiten una cirugía laparoscópica^{13,151}. Además, suele combinarse con quimioterapia para evitar que la eventual liberación de PE al medio interno conduzca al desarrollo de hidátides secundarias. De hecho, las recomendaciones actuales para el manejo de la CE toman en cuenta la recurrencia de la enfermedad por la posible formación de hidátides secundarias y apuntan a aplicar un enfoque multidisciplinario, con consultas de equipos interdisciplinarios para decisiones terapéuticas, la combinación de tratamientos quirúrgicos y farmacológicos, y un largo plazo de seguimiento del paciente^{10,13,26,144}.

1.4. El metabolismo de los cestodos con énfasis en E. granulosus s.l.

Los cestodos han adaptado su metabolismo, principalmente en lo que respecta a la disponibilidad de oxígeno y de nutrientes, según su estadio de desarrollo, ya que éste determina el ambiente en el cual habitan. Los estadios de vida libre, huevos u oncósfera, habitan en un medio rico en oxígeno por lo cual su metabolismo es principalmente aerobio, obteniendo energía a partir de sus reservas de glucógeno mediante ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa¹⁵². A través de esta vía, el parásito cubre sus requerimientos energéticos consumiendo un mínimo de sus reservas, con el

objetivo final de sobrevivir un tiempo suficiente como para interactuar con un hospedero y continuar su ciclo de vida. Una vez en el hospedero, los cestodos se establecen en sitios donde la disponibilidad de oxígeno disminuye y la de nutrientes aumenta respecto al ambiente externo, induciendo un cambio hacia el metabolismo anaerobio¹⁵². Por ejemplo, utilizan la glucosa del hospedero como fuente de energía, realizando fermentación láctica mediante glucólisis anaerobia. En el caso de *E. granulosus*, se conoce que cuenta en su genoma con todas las enzimas pertenecientes a la vía glicolítica, la fermentación láctica y el ciclo de Krebs^{16,153}. Si bien el metabolismo anaerobio tiene un menor rendimiento energético que el metabolismo aerobio, resulta más eficiente para el parásito dado que los nutrientes en este caso provienen del hospedero y no de sus propias reservas. Además, los cestodos suelen emplear otra vía fermentativa para obtener energía, conocida como dismutación del malato, que no es compartida con el hospedero¹⁵². Recientemente, el análisis mediante NMR de los metabolitos consumidos y producidos por la hidátide de E. multilocularis in vitro comprobó que la glucosa es el principal metabolito utilizado y fuente de energía a través de vías fermentativas, generando como principal producto succinato, seguido de acetato, lactato y alanina¹⁵⁴. El succinato sería formado en la mitocondria por vías que involucran la dismutación del malato junto con la utilización del fumarato, en vez del oxígeno, como aceptor final de electrones en una cadena alternativa de transporte de electrones donde la rodoquinona funciona como transportador y el complejo II como una fumarato reductasa^{154,155}. Por otra parte, la baja tensión de oxígeno en los sitios de instalación no permite la obtención de energía a partir de los lípidos (no pueden realizar la βoxidación de los ácidos grasos⁴⁶), y se sabe que la oxidación de los aminoácidos contribuye muy poco al metabolismo energético global de los cestodos¹⁵². En suma, estos organismos dependen casi exclusivamente de los carbohidratos para generar energía, una vez establecidos en su hospedero.

Respecto a la capacidad biosintética, estudios metabólicos, así como el reciente ensamblaje del genoma de varios cestodos, sugiere que han reducido al mínimo muchas de sus rutas biosintéticas, tomando ventaja de la posibilidad de obtener diversos sustratos simples del hospedero para utilizarlos como bloques, a partir de los cuales construir moléculas más complejas^{16,152,156}. En este sentido, los carbohidratos y la glucosa no pueden ser sintetizados por estos organismos y deben ser adquiridos de su hospedero para formar derivados más complejos como el glicocálix, las glicoproteínas y el glucógeno, utilizado como fuente de almacenamiento de carbohidratos. Respecto a los aminoácidos, la mayoría de ellos son esenciales para estos parásitos debiendo adquirirlos desde el hospedero; en particular, la treonina resultó ser uno de los principales metabolitos consumidos en el caso del cultivo del metacestodo de *E. multilocularis*¹⁵⁴. Sin embargo, se ha descripto que tienen capacidad de generar algunos aminoácidos a partir de esqueletos carbonados producidos mediante las vías glucolíticas; en particular, estudios metabolómicos sugieren que la alanina y en menor grado la glicina, aspartato y glutamato podrían ser sintetizados por el metacestodo *E. multilocularis*¹⁵⁴. En relación a la síntesis de los intermediarios para la formación de los ácidos nucleicos, se ha determinado que si bien no son capaces de sintetizar purinas de novo, tienen vías de salvataje elaboradas para maximizar su uso, mientras que sí son capaces de sintetizar las pirimidinas.

En cuanto a los lípidos, se conoce que la composición lipídica de los cestodos es, en principio, similar a la de otros organismos⁴⁶. Si bien su metabolismo lipídico ha sido relativamente poco explorado, ensayos metabólicos han mostrado que no son capaces de sintetizar la mayoría de sus

lípidos de novo^{46,152}. La obtención del genoma de varios cestodos, incluyendo E. granulosus^{16,156}, mostró que carecen de las enzimas necesarias para la síntesis, por las vías actualmente conocidas, de varias clases lipídicas, como los ácidos grasos y el colesterol¹⁵⁷ (Figura 1.3). En relación a los ácidos grasos, no pueden sintetizarlos de novo a partir de Acetil Coenzima A (acetil-CoA) y deben tomarlos del hospedero. De hecho, se ha descripto que presentan predominio de ácidos grasos de 16 y 18 carbonos, como el ácido palmítico (16:0), el ácido oleico (18:1), el ácido esteárico (18:0) y el ácido linoleico (18:2), como sucede en sus hospederos. Sí son capaces de elongar los ácidos grasos adquiridos (el acetil-CoA funcionaría como dador de dos carbonos) para para sintetizar lípidos más complejos como fosfolípidos, triacilglicéridos y ésteres de colesterol¹⁵². No se han encontrado evidencias de actividad desaturasa, por lo cual se piensa que los ácidos grasos insaturados que utiliza derivan del hospedero. Sin embrago, estudios genómicos recientes en algunos cestodos sugieren que podrían introducir insaturaciones generando ácidos grasos insaturados y eicosanoides¹³⁷. En cuanto al metabolismo de los esteroles, la hidátide de *E. granulosus* no puede sintetizar colesterol a partir de acetato o mevalonato, ya que no se detectó colesterol marcado radiactivamente cuando se cultivaron hidátides con estos precursores conteniendo ¹⁴C. Además, utilizando el modelo de infección secundaria se comprobó que la hidátide incorpora el colesterol del hospedero, ya que se detectó radioactividad en hidátides de ratones alimentados con colesterol marcado radiactivamente. Más aún, se determinó que en *E. granulosus* y *Taenia* hydatigena, la síntesis de los esteroles a partir de precursores marcados radiactivamente culmina en el farnesil pirofosfato, uno de los primeros intermediarios de la vía del mevalonato por la cual se sintetizan el escualeno y el colesterol^{158,159}.



Figura 1.3. Esquema del metabolismo lipídico en los cestodos. Los cestodos no son capaces de sintetizar algunos lípidos simples *de novo*, como ácidos grasos y colesterol, y deben adquirirlos de su hospedero. Para sintetizar otros lípidos complejos, como triacilglicéridos y fosfolípidos, también deben partir de bloques más simples tomados del hospedero. En este esquema, se señalan en rojo los compuestos que el parásito necesita adquirir de su hospedero. Las flechas claras indican las vías metabólicas que no están presentes en estos organismos, mientras que las flechas oscuras indican aquellas vías que si pueden llevar a cabo. PP: pirofosfato, PC: fosfatidilcolina, PS: fosfatidilserina, PI: fosfatidilinositol, PE: fosfatidiletanolamina, DAG: diacilglicéridos, TAG: triacilglicéridos, CDP-DAG: Citidina-difosfatodiacilglicérido y HMG-CoA: hidroximetilglutaril CoA, CoA: Coenzima A. Adaptado de¹⁵².

De las características del metabolismo lipídico en cestodos descriptas anteriormente se desprende que la adquisición de diferentes clases de lípidos del hospedero por estos organismos, incluyendo ácidos grasos y colesterol, tiene que ser un mecanismo esencial para su vida. Los fosfolípidos y el colesterol son componentes primordiales de las membranas biológicas, estructura celular que funciona como un soporte donde ocurren gran parte de los procesos vitales de la célula, a través de eventos de transporte de electrones y moléculas, reconocimiento molecular y transducción de señales, entre otros¹⁶⁰. Como existen diferencias en las propiedades fisicoquímicas entre el colesterol y la variedad de ácidos grasos que el parásito necesita incorporar, su adquisición y transporte entre distintos tejidos es probable que requiera distintas proteínas transportadoras (carriers), tal como sucede en otros organismos. En los vertebrados los lípidos extracelulares son transportados principalmente por las lipoproteínas plasmáticas¹⁶¹. Se trata de partículas complejas con un núcleo central que contiene ésteres de colesterol y triglicéridos rodeados de colesterol libre, fosfolípidos y apolipoproteínas, que facilitan la formación y función de las lipoproteínas. Las lipoproteínas plasmáticas de vertebrados se pueden dividir en siete clases según el tamaño, la composición lipídica y el componente proteico (apolipoproteina) que presentan: quilomicrones, remanentes de quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), de densidad intermedia (IDL), de baja densidad (LDL) y de alta densidad (HDL). Las apolipoproteínas tienen cuatro funciones principales que incluyen i) desempeñar un papel estructural, ii) actuar como ligandos para los receptores de lipoproteínas, iii) guiar la formación de lipoproteínas y iv) actuar como activadores o inhibidores de enzimas involucradas en el metabolismo de las lipoproteínas.

1.4.1. Proteínas que unen lípidos en cestodos

Se han descripto dos familias de proteínas que unen lípidos (LBP, del inglés lipid binding protein) en los organismos cestodos, las proteínas que unen ácidos grasos (FABP, del inglés fatty acid binding protein) y las proteínas que unen ligandos hidrofóbicos (HLBP, del inglés hydrophobic ligand binding protein). La familia de las FABP se encuentra ampliamente distribuida en el reino animal, mientras que la familia de las HLBP parece ser exclusiva de los cestodos, desde que no se han identificado homólogos en otros taxones¹⁶². Aunque, todas ellas están involucradas en el transporte de lípidos, difieren ampliamente en su estructura primaria y secundaria, la especificidad del ligando y posiblemente en su función específica. Los estudios filogenéticos muestran que las FABP y las HLBP poseen orígenes distintos y que han evolucionado a través de diferentes vías¹⁶². Se encontró que el gen de las FABP fue duplicado para producir las FABP de los distintos organismos cestodos¹⁶³. Al igual que las FABP de mamíferos, las FABP de los cestodos son proteínas intracelulares, o al menos no poseen ninguna secuencia o péptido señal de secreción extracelular por las vías convencionales actualmente conocidas. Sin embargo, corresponde mencionar que algunas FABP de vertebrados podrían ser liberadas al medio extracelular para continuar con el transporte de lípidos y cumplir con funciones parácrinas/endócrinas relacionadas a la regulación de la homeostasis metabólica y la función celular^{164,165}. Por otro lado, las HLBP incluyen miembros intracelulares y extracelulares, estas últimas poseen secuencias específicas para su secreción¹⁶². Si bien las funciones de estas familias de proteínas no han sido elucidadas, debido a su capacidad de unir lípidos y a sus distintas localizaciones es posible que las FABP cumplan un papel más importante en el transporte de los lípidos dentro de la célula; mientras que las HLBP participen en la captación de lípidos desde el hospedero y/o en su posterior distribución entre los diferentes tejidos del parásito.

En relación a las HLBP, muchas de las proteínas que agrupa se identificaron inicialmente como antígenos específicos de las distintas enfermedades producidas por estos parásitos, mostrando potencial valor diagnóstico¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. Miembros de esta familia se han identificado en *T. solium*, *T.* crassiceps, T. hidatigena, T. multiceps, Moniezia expansa, H. diminuta, E. multilocularis y E. granulosus (revisado por¹⁶²). Se trata de proteínas oligoméricas, compuestas por subunidades pequeñas (entre 7 y 11 kDa), cuya estructura secundaria posee un alto porcentaje de α -hélices anfipáticas con alta capacidad para unir ligandos hidrofóbicos. La mayoría de los estudios realizados para caracterizar los ligandos de estas proteínas involucran ensayos in vitro basados en el uso de sondas fluorescentes. De este modo, se logró establecer que algunas proteínas son capaces de unir ácidos grasos saturados e insaturados de cadena larga, esteroles, retinoides y algunas drogas antihelmínticas^{169–173}. Dentro de las HLBP intracelulares, se encuentran descriptas la proteína Me-HLBP de M. expansa^{171,174} y la proteína Hd-HLBP de H. diminuta^{169,175}. La proteína Me-HLBP constituye un oligómero de aproximadamente 250 kDa formado por subunidades de 8 kDa¹⁷¹ con capacidad para unir ácidos grasos de cadena larga, pero no la mayoría de los acil-CoA derivados de ácidos grasos analizados^{169,174}. Además, mostró *in vitro* afinidad por esteroles, ácido retinoico y lípidos anfipáticos como la sonda 1-anilino-8-naftaleno sulfonato (ANS) y algunas drogas antihelmínticas. La caracterización de la proteína Hd-HLBP sugiere que es un oligómero de 115 kDa formado por unidades de 11 kDa, según su comportamiento en cromatografía de exclusión molecular y el análisis en SDS-PAGE en condiciones reductoras. Asimismo, se determinó que esta proteína es capaz de unir ácidos grasos de cadena larga, particularmente el ácido oleico y sus acil-CoA derivados, aunque con menor afinidad¹⁷⁵, así como lípidos anfipáticos como el ANS y algunos antihelmínticos¹⁶⁹. Con respecto a las HLBPs extracelulares, las más caracterizadas en cuanto a su capacidad de unir lípidos han sido las HLBPs de T. solium y de E. granulosus. En el caso de T. solium, se han obtenido y caracterizado parcialmente las HLBPs pertenecientes a la larva y al estadio adulto del parásito. En la larva se expresa una HLBP denominada TsM150, por su tamaño de 150 kDa^{172,176}. Esta proteína es un hetero-oligómero formado por subunidades de 7 kDa y de 10 kDa, codificadas por dos familias multigénicas¹⁷⁷, que unen los lípidos de forma diferencial. Funcionalmente, se ha propuesto que la proteína TsM150 podría participar en la translocación de lípidos hacia el interior de la larva, por una vía que resultó inhibida por anticuerpos específicos anti-TsM150¹⁷⁶. Esta es la única evidencia de la participación de una HLBP en la adquisición de lípidos desde el hospedero. Además, en la larva de T. solium se ha descripto otra proteína oligomérica de 120 kDa, constituida por subunidades de 14 y 18 kDa¹⁷⁸. También se caracterizaron tres moléculas, llamadas Ts8B1, Ts8B2 y Ts8B3¹⁷⁹, que comparten identidad con las subfamilias de 7 y 10 kDa que conforman TsM150 y TsM120, con variantes de la subunidad de 8 kDa del EgAgB de Echinococcus spp.¹⁸⁰⁻¹⁸³ y con las HLBP de H. diminuta y M. expansa^{175,184}. Tanto para estas tres TsM120 como para Ts8B1-3 no se han reportado evidencias en cuanto a la capacidad de unión/transporte de lípidos. A nivel del adulto se reportó la presencia de una proteína excretadasecretada, denominada TsHLBP, de ~100 kDa y compuesta por subunidades de ~10 kDa (TsHLBP1 y TsHLBP2). Dichas subunidades también mostraron homología con las HLBP de M. expansa y H. diminuta. Asimismo, se determinó que estas subunidades son capaces de unir las sondas ANS, 16-AP y el ácido cis-parinárico mientras que, en ensayos de desplazamiento de ANS, ambas subunidades unieron ácido mirístico (14:0), palmítico (16:0), oleico (18:1) y linoleico (18:2)¹⁷³. El análisis filogenético de las TsHLBP y otras HLBP reveló que podrían haberse originado a partir de un ancestro común^{177,185}. El gen ancestral pudo haberse expandido por duplicación génica dando lugar a dos grandes linajes de subunidades de 7 y 10 kDa, cada uno de las cuales se ha

diversificado aún más, en múltiples sublinajes¹⁷⁷. De hecho, los genes parálogos de *T. solium* exhiben estructuras génicas conservadas entre los miembros de cada familia¹⁷². Después de la diversificación los genes parálogos podrían haberse diferenciando adquiriendo patrones de expresión y propiedades biológicas dependientes del estadio y localización del parásito. Finalmente, en *E. granulosus* se encontró que el EgAgB es una lipoproteína perteneciente a la familia HLBP^{170,175,186,187}. Al igual que las HLBP de *T. solium*, el componente proteico del EgAgB está codificado por una familia multigénica y polimórfica y varios de sus miembros mostraron capacidad de unir análogos fluorescentes de ácidos grasos *in vitro*¹⁷⁰ (profundizaremos en esta HLBP en la sección 1.5). En conjunto, los datos sugieren que la divergencia genómica y la consecuente diversidad de las propiedades bioquímicas de las HLBP reflejan la participación de esta familia en diferentes estadios, tejidos y/o tiempos de desarrollo para la adaptación a su hospedero específico.

La identificación de los ligandos que unen las distintas HLBP se basó principalmente en ensayos *in vitro*, en su mayoría empleando sondas fluorescentes y en algunos casos realizando desplazamiento de estas sondas con ligandos naturales como los ácidos grasos. Por mucho tiempo no se contó con información acerca de cuáles podían ser los ligandos fisiológicos de las HLBP, es decir unidos en la lipoproteína nativa. Nuestro grupo logró caracterizar por primera vez estos ligandos naturales del EgAgB purificado del LH. El componente lipídico del EgAgB nativo representa aproximadamente la mitad de la masa total de la partícula y es muy heterogéneo, conteniendo una amplia variedad de lípidos polares y neutros⁴⁵. A continuación profundizamos sobre la composición y propiedades del EgAgB.

1.5. El EgAgB de E. granulosus: una HLBP en la interfaz hospedero-parásito

La información que estaba disponible y que se publicó a lo largo de este trabajo sobre la composición y propiedades bioquímicas del EgAgB corresponde a estudios en los que generalmente no se analizó el genotipo de *E. granulosus*. Considerando esta carencia de información sobre la especie de origen, lo que se describe a continuación corresponde a *E. granulosus* s.l. (*E. granulosus* por simplicidad), salvo que se explicite lo contrario. No se puede descartar que existan diferencias en las propiedades del EgAgB según el genotipo/especie.

El EgAgB es el principal componente parasitario presente en el LH⁴⁰, identificado e informado como una lipoproteína antigénica en 1971, y nombrado de esa forma para diferenciarlo de otra fracción denominada antígeno A^{186,188}. Desde entonces se realizaron múltiples esfuerzos para caracterizar este antígeno, tanto su componente proteico y genes asociados como los lípidos que lo conforman. Su naturaleza lipoproteica se evidenció al detectar la presencia de lípidos por tinción con el colorante *Sudán Black*. Asimismo, se reportó una asociación fuerte, pero no covalente, entre los lípidos y la proteína, dado que la fracción lipídica se pudo extraer únicamente empleando solventes orgánicos. La caracterización primaria de esta fracción antigénica mediante ensayos de sedimentación y gel filtración sugirió que el EgAgB presentaba un tamaño de entre 120 kDa y 160 kDa^{186,187}. Inicialmente, el interés en esta lipoproteína radicó en su importancia para el inmunodiagnóstico de la CE¹⁸⁸, dirigiendo los esfuerzos al estudio del componente proteico (diversos grupos evaluaron los epítopes inmunodominantes del EgAgB así como su valor diagnóstico^{146,166,189–191}) dejando de lado su componente lipídico, por ser éste probablemente de
escaso valor antigénico. El análisis del componente proteico del EgAgB mediante geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes mostró un patrón de bandas regularmente espaciadas de 8, 16, 24, 32 kDa¹⁹², siendo las de mayor tamaño las menos abundantes. Luego se determinó que estas bandas de mayor peso molecular correspondían a oligómeros formados a partir de por lo menos dos subunidades de 8 kDa distintas¹⁹³, denominadas EgAgB8/1 y EgAgB8/2^{182,194}. Estas observaciones llevaron a determinar que el componente proteico del EgAgB está codificado por una familia multigénica^{181,185,195} que comprende 5 subfamilias (*EqAqB1-EqAqB5*) v con alto grado de polimorfismo¹⁹⁵⁻¹⁹⁷. Posteriormente, el alineamiento de las secuencias proteicas utilizando varias proteínas de cestodos parásitos en paralelo con el EgAgB mostró que sus subunidades se agrupan con la familia de las HLBP específica de cestodos^{168,171}. A partir de ese momento, tomó relevancia la caracterización de las propiedades de unión del EgAgB. En un comienzo, se mostró que las subunidades EgAgB8/1 y EgAgB8/2 obtenidas de forma recombinante eran capaces de unir ácidos grasos in vitro, en base a ensayos de unión con el análogo fluorescente 16-AP, el cual no logró ser desplazado por ácidos grasos ni drogas antihelmínticas¹⁷⁰. Más recientemente, se tuvo éxito en delipidar las subunidades recombinantes EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 y determinar que son capaces de interactuar entre ellas, aún en ausencia de lípidos, formando oligómeros de entre 40 y 60 kDa¹⁹⁸. Además, estas subunidades mostraron capacidad de unión a distintos ligandos lipídicos in vitro, con constantes de disociación en el orden submicromolar para antroiloxi-derivados de ácidos grasos. Además, las subunidades EqAgB8/2 y EqAgB8/3 delipidadas fueron capaces de transferir estos derivados hacia membranas fosfolipídicas modelo, sugiriendo que ambas subunidades pueden transferir los ácidos grasos que unen a membranas biológicas. En el caso de las subunidad EgAgB8/2, la transferencia ocurriría por un mecanismo que involucra un contacto directo con la membrana, mientras que en el caso de EgAgB8/3 la cinética de la transferencia estaría determinada por la disociación del complejo proteína-ligando. Asimismo, para ambas proteínas se pudo determinar que las interacciones electroestáticas tienen importancia en el mecanismo, dado que la transferencia se ve favorecida en el caso de vesículas con mayor carga neta negativa, como ocurre en el caso de vesículas ricas en cardiolipina¹⁹⁸. Tiempo después, nuestro grupo de investigación identificó los lípidos que componen la partícula nativa del EgAgB, observando que se trata de una mezcla heterogénea y constituye el 40-50% de la masa total de la partícula⁴⁵. Adicionalmente, mediante gel filtración acoplada a dispersión de luz (SEC-MALLS, del inglés, Size Exclusion Chromatography - Multi-Angle Laser Light Scattering) se demostró que las partículas lipoproteicas de EgAgB presentan un tamaño heterogéneo, con un promedio de 230 kDa⁴⁵, superior a lo reportado inicialmente (Figura 1.4 A). En suma, esta breve reseña histórica muestra que el EgAgB es una molécula compleja, de tamaño y composición (distintas subunidades proteicas que unen una amplia variedad de lípidos) que la asemejan a las lipoproteínas plasmáticas de mayor densidad de vertebrados (HDL, del inglés high density lipoprotein), tal como se modela en la Figura 1.4 B. A continuación se describe detalladamente la composición que se conocía al comienzo de este trabajo.

1.5.1. Composición del EgAgB

El componente proteico del EgAgB (apolipoproteínas) está codificado por una familia multigénica y polimórfica, que agrupa a los genes *EgAgB1 a EgAgB5*¹⁹⁹. Como ya se mencionó, los productos proteicos codificados por estos genes, son polipéptidos de 8 kDa, a los cuales nos referiremos como subunidades del EgAgB (llamaremos EgAgB8/1 a EgAgB8/5). La secuenciación del genoma de *E. granulosus* s.s., ha permitido detectar la presencia de un cluster con 7 genes del EgAgB que

incluyen tres copias similares del EqAqB3 y una de cada uno de los restantes¹⁵⁶. La estructura de estos genes es similar; están compuestos por un exón 5' pequeño (entre 47-59 pb), un intrón (entre 67-164 pb) y un exón 3' (entre 199 y 214 pb). El primer exón codifica para un pequeño péptido que actúa como señal de secreción, mientras que las subunidades maduras son codificadas por el segundo exón. Considerando la secuencia codificante, la identidad a nivel nucleotídico varía entre el 45 y el 82% entre las distintas subfamilias de genes del EgAgB. Además, llamó la atención que una misma subfamilia agrupa varias secuencias con alto grado de identidad nucleotídica (igual o mayor a 88%), por lo cual se trata de subfamilias polimórficas²⁰⁰. Se ha postulado que este polimorfismo está asociado a una adaptación de diferentes genotipos de E. granulosus s.l. a los hospederos que infectan, de hecho se encontró que distintos genotipos pueden contener alelos o isoformas diferenciales de algunos de estos genes^{196,197}. Además, se reportó una expresión diferencial de los genes EqAqB1-5 en los diferentes estadios del parásito así como también en distintos componentes de un mismo estadio, como la CG y los PE de la hidátide. En particular, se estudió su expresión a nivel del ARNm en los estadios de oncósfera, hidátide, PE, gusano adulto inmaduro y gusano adulto maduro¹⁸⁵. En la CG, se expresaron todos los genes pero EqAqB1 fue mayoritaria, seguida de EqAqB3, EqAqB2, EqAqB4, y finalmente EqAqB5 muy poco representada. La oncósfera, los PE y el gusano adulto inmaduro y maduro mostraron expresión principalmente de EqAqB3 y EqAqB5. En particular, la expresión de EqAqB3 en el gusano adulto inmaduro y maduro fue entre 3 a 10 veces superior a la determinada para otros estadios, lo que sugiere que esta subfamilia de genes puede jugar un papel en el desarrollo del gusano en el intestino del hospedero definitivo¹⁸⁵. Estudios en *E. multilocularis* empleando anticuerpos monoclonales específicos también mostraron un patrón de expresión diferencial de las subunidades proteicas del EmAgB según el estadio de desarrollo del parásito²⁰¹. Esto sugiere que las subunidades podrían interactuar con diferentes blancos presentes en los tejidos donde se expresan, cumpliendo funciones adaptadas al entorno celular y estadio del parásito.

Los productos proteicos maduros que derivan de estos genes contienen entre 65 y 71 aminoácidos alcanzando el peso molecular de aproximadamente 8 kDa. La identidad de aminoácidos entre las distintas subfamilias puede variar entre el 25 y el 69%, mientras que dentro de una misma subfamilia puede variar entre el 79 y el 100%²⁰⁰. La comparación de la secuencia aminoacídica de las distintas subunidades mostró que EgAgB8/1, EgAgB8/3 y EgAgB8/5 están más relacionadas entre sí que con las subunidades EgAgB8/2 y EgAgB8/4 y viceversa. Como ya se informó, las subunidades pueden formar oligómeros de mayor peso molecular, capacidad que se evidencia en el perfil característico -en escalera- que muestra el EgAgB analizado por electroforesis (SDS-PAGE) y que es resistente a las condiciones desnaturalizantes aplicadas¹⁹² (Figura 1.4 C). El análisis por dicroísmo circular demostró que las subunidades presentan un alto contenido de α -hélices (entre 35 y 65%)^{187,191,202}. A nivel estructural, nuestro grupo estudió *in silico* la estructura terciaria que adoptarían EgAgB8/1-EgAgB8/5 mediante modelado por homología (Figura 1.5). Se verificó el alto porcentaje de alfa-hélices y un perfil de distribución de cargas electrostáticas que favorecería la agregación (colaboración con Dr. Marcelo Costabel)²⁰³.





Figura 1.4. Caracterización del EgAgB nativo de E. granulosus. (A) Análisis por cromatografía de exclusión molecular acoplada a medición de la dispersión de luz (SEC-MALLS) del EgAgB (inmunopurificado de LH de hidátides bovinas fértiles¹⁹³) y de la HDL humana, paneles inferior y superior, respectivamente. Los gráficos corresponden al monitoreo de la elución de la cromatografía, donde la curva en negro representa el perfil de absorbancia a 280 nm y la curva roja corresponde a la masa estimada a partir del perfil de dispersión de la luz. Adaptado de⁴⁵. (B) Estructura propuesta para el EgAgB en base a la variedad de sus lípidos constituyentes, la relación lípido:proteína y la densidad y tamaño de las partículas. Esta estructura, similar a la de las lipoproteínas plasmáticas, presentaría un core hidrofóbico compuesto por TAG y EE; mientras que los fosfolípidos (PC, PS, PE y PI) y las distintas subunidades de EgAgB se encontrarían expuestas hacia el solvente. El colesterol y los ácidos grasos podrían repartirse entre un entorno más apolar (núcleo) y la capa de fosfolípidos. (C) Composición proteica del EgAgB analizada mediante Western-Blot de una muestra de LH proveniente de hidátides suinas empleando un anticuerpo policional de conejo anti-EgAgB nativo. Se observa el patrón de bandas regularmente espaciadas de 8, 16, 24, 32 y 40 kDa característico del EgAgB, donde la subunidad de 8 kDa constituye el bloque a partir del cual se arman los oligómeros de mayor tamaño. Adaptado de¹⁹³. (D) Composición de la fracción lipídica del EgAgB nativo y del LH fértil. Las fracciones lipídicas se obtuvieron por el método de Folch y analizaron mediante HPTLC. La identificación de las clases lipídicas se realizó por comparación con estándares primarios corridos en paralelo (STD). (E) La proporción de las distintas clases lipídicas presentes en el EgAgB y el LH fértil se estimó mediante densitometría a partir de los resultados de la HPTLC. Notar la similitud entre los lípidos contenidos en el EgAgB y los observados en el LH. Adaptado de⁴⁵. PC: fosfatidilcolina; PS: fosfatidilserina; PE: fosfatidiletanolamina; PI: fosfatidilinositol; CLP: cardiolipina; Col: colesterol, AG: ácidos grasos, TAG: triacilglicéridos; EE: ésteres de esteroles.



Figura 1.5. Modelos de la posible estructura terciaria adoptada por las subunidades de EgAgB8. En la primera fila se muestra el perfil electrostático de las apolipoproteínas con superficies positivas en azul y negativas en rojo. En la segunda fila se representan las características hidrofóbicas de las proteínas con los aminoácidos no polares en verde y los hidrofílicos en naranja.

Llamativamente el EgAgB8/1 adoptaría una estructura distinta al resto de las subunidades, lo cual podría relacionarse con diferencias en los ligandos hidrofóbicos que une y/o blancos con los que pueda interactuar. También es posible que las subunidades adopten estructuras con mayor complejidad, dada su capacidad de formar oligómeros de mayor tamaño. Aunque el mecanismo por el cual estas subunidades oligomerizan no se conoce, se determinó que no está mediado por puentes disulfuro, puesto que este patrón característico en los geles de poliacrilamida ocurre del mismo modo al emplear condiciones reductoras¹⁹². Mediante el análisis de las bandas correspondientes a los oligómeros por digestión en gel, se identificaron la mayoría de las subunidades presentes en el LH (EgAgB8/1 mayoritariamente y también EgAgB8/2, EgAgB8/3 y EgAgB8/4)²⁰⁴ aunque se desconoce si existen hetero u homo-oligómeros. Utilizando las subunidades recombinantes producidas en bacterias, se constató que EqAqB8/1, EqAqB8/2 y EgAgB8/3 son capaces de auto-asociarse en homo-oligómeros de tamaño variable, mayoritariamente de 125, 164 y 113 kDa para EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3, respectivamente^{202,204}. Adicionalmente el análisis por modelado molecular sugirió que la característica anfipática de las subunidades está relacionada con el proceso de oligomerización^{200,202}. Por otra parte, se determinó que las subunidades recombinantes libres de lípidos son capaces de auto-asociarse, formando oligómeros de 62 y 39 kDa para rEgAgB8/2 y rEgAgB8/3¹⁹⁸, en concordancia con la formación de oligómeros de 7-8 subunidades y de 4-5

40

subunidades, respectivamente. En conjunto, los resultados sugieren que la oligomerización de las subunidades de EgAgB no es absolutamente dependiente de la presencia de lípidos, aunque los lípidos facilitarían la formación de complejos de mayor tamaño, conduciendo al ensamblado de la lipoproteína nativa¹⁹⁸.

Estudios proteómicos describieron cualitativamente la composición proteica del EgAgB purificado del LH. De hecho, al inicio de esta tesis no se había definido con exactitud la abundancia relativa de cada subunidad y si esta abundancia varía entre hidátides fértiles y no fértiles, y/o entre diferentes especies de *E. granulosus* y/o de sus hospederos. Esta información contribuiría a comprender el papel que cumplen las distintas subunidades; posibles diferencias en su abundancia en el metacestodo y en su estructura terciaria podrían relacionarse con interacciones diferenciales del EgAgB con componentes del parásito o del hospedero.

Respecto al componente lipídico, el hecho de que el LH, medio fisiológico al que se secreta EgAgB, contenga una amplia gama de lípidos neutros y polares^{39,44}, planteó la posibilidad de que los ligandos fisiológicos putativos de las subunidades EgAgB8 incluyan un conjunto más diverso de lípidos. El componente lipídico del EgAgB fue caracterizado por nuestro grupo de investigación en el año 2012⁴⁵, mediante cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC, del inglés highperformance thin layer chromatography). El EgAgB se inmunopurificó a partir de LH fértil de origen bovino utilizando un anticuerpo monoclonal (Mo-EB7, que reconoce únicamente la subunidad EgAgB8/1¹⁹³) y se extrajeron los ligandos fisiológicamente unidos mediante el método de Folch²⁰⁵. La relación lípido:proteína (m:m) en el EgAgB se ubicó entre 0.6:1 y 1.1:1, representando la fracción lipídica entre el 38-52% de su masa total. Además, el componente lipídico resultó ser muy heterogéneo, conteniendo varias clases neutras y polares (Figura 1.4 D y E). Dentro de los lípidos neutros, se encontró una alta proporción de triacilglicéridos (31.3%), esteroles (20.2%), ésteres de esteroles (19%) y ácidos grasos libres (12%), así como también una fracción propuesta como alquildiacilgliceroles y/o alquenildiacilgliceroles. En el caso de los lípidos polares, la fosfatidilcolina fue el principal fosfolípido (64%), seguido por la fosfatidiletanolamina (20.8%), glicolípidos (8%), fosfatidilserina (3.8%), fosfatidilinositol (3.2%) y cardiolipina (0.3%). La abundancia de las diferentes clases lipídicas fue similar a la correspondiente al LH a partir del cual se purificó el EgAgB, sugiriendo que sus subunidades son capaces de unir la mayoría de los lípidos disponibles en su entorno⁴⁵ (Figura 1.4 D). En cuanto al contenido de ácidos grasos del EgAgB nativo, el análisis por cromatografía gaseosa permitió determinar la predominancia de las formas 16:0, 18:0 y 18:1, seguido de 18:2 y 20:4, y otros ácidos grasos que representaron menos del 5% del total (Figura 1.4 E).

La gran proporción de lípidos y su heterogeneidad, el tamaño aproximado de 230 KDa y su densidad llevaron a suponer que la partícula de EgAgB adpota una organización similar a la de las lipoproteínas de la hemolinfa de los invertebrados o del plasma de los vertebrados³⁵, particularmente a la fracción más pequeña de la HDL, conocida como HDL₃⁴⁵ (Figura 1.4 A). Teniendo en cuenta esta observación, la partícula de EgAgB nativo podría adquirir una estructura como la que se modela en la Figura 1.4 B., donde los lípidos más hidrofóbicos, como los triacilglicéridos y los ésteres de esteroles, se ubicarían en el interior de la partícula formando un núcleo (*core*) hidrofóbico mientras que los fosfolípidos estarían más expuestos, ubicando sus cabezas polares hacia el exterior y sus colas hidrofóbicas hacia el núcleo. Otros lípidos neutros menos hidrofóbicos, como el colesterol y los ácidos grasos, podrían formar parte del núcleo pero,

debido a la presencia de grupos polares, podrían también intercalarse con los fosfolípidos como ocurre en las membranas biológicas. En este contexto, las diferentes subunidades del EgAgB también quedarían expuestas en la superficie de esta partícula. Según el tamaño que alcanzan las partículas, se estima que entre 10 y 15 subunidades podrían estar expuestas al solvente y establecer contacto con diversas moléculas blanco.

1.5.2. Sobre las posibles funciones del EgAgB

1.5.2.1. Efectos inmunomoduladores

Si bien el EgAgB ha sido foco de estudio en numerosos trabajos relacionados con su valor para el diagnóstico de la CE, su función biológica no ha sido demostrada. El punto de partida de este trabajo de tesis tomó como centro el propuesto rol inmunomodulador del EgAgB. Como se mencionó en 1.2.4.2, este parásito despliega potentes mecanismos inmunomoduladores que influencian la intensidad y el tipo de respuesta inmune del hospedero, contribuyendo al establecimiento de una infección crónica y en la mayoría de los casos asintomática¹¹⁴. Los efectos inmunomoduladores del EqAqB podrían ocurrir en la fase de pre-enquistamiento, contribuyendo con el éxito del parásito para establecer infecciones primarias o secundarias, ya que las formas infectivas (oncósferas y PE) expresan el EgAgB (particularmente EgAgB3 y EgAgB5). De todas maneras, no hay evidencias de contacto de esta lipoproteína o sus subunidades con las células del hospedero en esta fase. A nivel de la hidátide, se conoce que el EgAgB se encuentra en una región desorganizada de la pared que bordea los cuerpos celulares tegumentarios de la CG, y su presencia fue dudosa en la CL²⁰⁶. Si bien no existe evidencia de un mecanismo de transporte activo del EgAgB fuera de la hidátide, el hecho que se genere una respuesta de anticuerpos específica demuestra que esta lipoproteína efectivamente logra interactuar con células inmunes del hospedero, al menos con células innatas en la interfaz hospedero-parásito y con los linfocitos B en los ganglios linfáticos. La hipótesis del EgAgB como molécula involucrada en la inmunomodulación encuentra cierto apoyo en evidencias experimentales sobre diferentes tipos celulares in vitro^{74,90,207}. Ensayos iniciales mostraron que el EgAgB afectó la funcionalidad de los neutrófilos; sus subunidades -eluídas de geles de poliacrilamida- inhibieron la quimiotaxis de los neutrófilos inducida por la proteína del sistema complemento C5a, el factor activador de las plaquetas¹⁸³ y productos bacterianos²⁰⁷. Estudios posteriores mostraron que el EgAgB también interfirió con la diferenciación y/o activación de algunas poblaciones celulares de la línea mieloide. En particular, afectó la diferenciación de las DCs, promoviendo una disminución de CD1a (marcador de maduración) y un aumento de la expresión de CD86 que no fue suficiente para inducir un fenotipo activador de linfocitos T vírgenes⁹⁰. Sumado a esto, la presencia de EgAgB durante la diferenciación de DCs alteró la respuesta frente a la estimulación con LPS, disminuyendo la expresión de las moléculas esenciales para cumplir su función presentadora (HLA-DR) e inmunoestimuladora (CD80, CD86) y modulando la producción de citoquinas que afectan el tipo de respuesta Th que se establece (TNF-α, IL-10, IL 6 e IL-12p70). Además, afectó el fenotipo de las DCs maduras aumentando sólo los niveles de TNF- α , IL-10, IL-6 per se y disminuyendo IL-12p70 inducidos por LPS, lo que en conjunto sugiere que el EgAgB no favorecería un perfil de activación Th1⁹⁰. En concordancia con estos resultados se encontró que la estimulación con EgAgB de PBMCs de pacientes con CE indujo la síntesis de IL-4 e IL-13, pero no de IL-12, sugiriendo que favorecería un perfil Th2 sobre el Th1 (según la relación IL-4/IFN- γ)²⁰⁷. Estos resultados sugieren que el EgAgB podría tener un rol modulador pero como utilizaron preparaciones de EgAgB desnaturalizadas (obtenidas por electroelución a partir de geles de poliacrilamida o precipitación diferencial del LH,

incluyendo un paso de calentamiento a 100°C) podrían diferir de las interacciones que establece el EgAgB en condiciones fisiológicas.

Para una mejor evaluación de las actividades inmunomoduladoras del EgAgB, nuestro grupo priorizó emplear metodologías de purificación que preservaran la estructura nativa de esta lipoproteína, buscando estudiar interacciones fisiológicamente relevantes con las células inmunes. La cromatografía de inmunoafinidad utilizando el Mo-EB7¹⁹³ fue la principal metodología para obtener preparaciones puras de EqAqB nativo a partir de LH. Dichas preparaciones mostraron que el EgAgB nativo no indujo *per se* respuestas de citoquinas (secreción de la quimioquina IL-8), expresión del receptor de superficie CD11b (asociado a activación) ni la producción de especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) en neutrófilos humanos preestimulados con el factor activador de plaquetas (PAF) o IFN-γ⁷⁴. Además, el EgAgB mostró capacidad para inhibir la producción de ROS inducida por ésteres de forbol en neutrófilos preestimulados con PAF. Además, se exploró el rol inmunomodulador del EgAgB sobre los monocitos y macrófagos, observando que inhibió la quimiotaxis de monocitos de sangre periférica inducida por las quimioquinas CCL2 y CCL13²⁰⁸. Más aún, estudios preliminares mostraron que el EgAgB inmunopurificado moduló la activación de monocitos y macrófagos de la línea celular THP-1 por LPS y por un sonicado de protoescólices, sintetizando menores niveles de interleuquinas proinflamatorias (TNF- α e IL-1 β)²⁰⁸.

1.5.2.2. Papel en el metabolismo lipídico

La pertenencia del EgAgB a la familia de las HLBPs sugiere su participación en los mecanismos de captación de lípidos del hospedero esenciales para E. granulosus y/o el transporte y distribución de lípidos entre los tejidos del parásito. Para cumplir esta función, sería necesaria por un lado la interacción del EgAgB con moléculas y/o células blanco del hospedero para adquirir los lípidos, y por otro lado la interacción con componentes del parásito, otras LBPs o células, para su eventual descarga. En relación a la toma de lípidos del hospedero, ésta podría ocurrir a partir de interacciones con las lipoproteínas plasmáticas del hospedero, reproduciendo mecanismos de intercambio de lípidos que son usados por las lipoproteínas de los mamíferos y que son responsables de la generación de los diferentes tipos de lipoproteínas circulantes²⁰⁹. No se puede descartar que el EgAgB intercambie lípidos con lipoproteínas plasmáticas del hospedero dentro de la hidátide. En este sentido, un estudio proteómico documenta la presencia de la Apo-Al principal apolipoproteína de la HDL⁴⁰. Alternativamente, el EgAgB podría captar lípidos de células del hospedero, en base a la interacción descripta con las células mieloides, por un mecanismo que podría asemejarse al mediado por la HDL para extraer el exceso de colesterol de los macrófagos (transporte reverso del colesterol). Ensayos preliminares realizados por nuestro grupo mostraron que el EgAgB nativo es capaz de unirse a monocitos purificados a partir de sangre periférica y a monocitos y macrófagos de la línea THP-1²⁰⁸, pero no se estableció el receptor que reconoce al EgAgB en estas células. Respecto a la entrega de los lípidos a células o moléculas blanco en el parásito, resulta interesante que flangueando al conjunto de genes que codifican para las distintas subunidades de EgAgB (cluster) se encuentra un gen que codifica para una proteína con homología con el receptor de la LDL (EmLDLR)²¹⁰. Resulta atractiva la idea de que el EgAgB establezca alguna interacción con receptores en las células del parásito¹⁵⁶ que permitan la descarga de los lípidos adquiridos del hospedero.

Poniendo en conjunto las ideas mencionadas, el EgAgB podría estar involucrado en diversos mecanismos que favorecerían la sobrevida del parásito en su hospedero. Por un lado, participando en la adquisición de lípidos esenciales, y por otro, en la generación de una repuesta inmune más tolerable. Se ha descrito la existencia de vías de coordinación entre las funciones inmunológicas y metabólicas que aseguran la homeostasis celular²¹¹. Por tanto sería posible que la actividad inmunomoduladora del EgAgB sea consecuencia de una interacción asociada a su posible rol en la toma y transporte de lípidos.

1.6. Células en la interfaz hospedero-parásito: los macrófagos y monocitos

Durante un proceso infeccioso, el sistema inmune innato despliega diversos mecanismos celulares y moleculares para combatir al patógeno. En relación al componente celular, las células residentes en los tejidos, como los macrófagos, DCs y mastocitos, son los primeros en activarse y actuar. Además promueven el reclutamiento de otras células desde la sangre, como monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos, que refuerzan los mecanismos innatos para la eliminación del patógeno. En el modelo experimental de infección secundaria en el ratón, la infección por *E. granulosus* genera acumulación de macrófagos, monocitos y eosinófilos en cavidad peritoneal^{69,72,73}. Teniendo en cuenta esta observación, a continuación se revisan las propiedades de macrófagos y monocitos, ya que participan de la respuesta inmune frente a la infección y constituyen las células centrales en esta tesis. Se discute a continuación la información disponible sobre su origen, distribución, perfiles de activación, fenotipos existentes y funciones efectoras.

1.6.1. Los macrófagos

1.6.1.1. Funciones y fenotipos

Los macrófagos son células del sistema inmune residentes en prácticamente todos los tejidos, altamente plásticas, que cumplen funciones variadas tanto en el mantenimiento de la homeostasis como durante procesos infecciosos o de daño tisular. Tienen un papel central en la instrumentación de la respuesta inmune en los diferentes contextos de inflamación y durante un proceso infeccioso son capaces de participar en el inicio de la respuesta y la eliminación directa de las infecciones, así como la resolución de la inflamación y la reparación de tejidos. Son capaces de reconocer la presencia de una amplia gama de ligandos endógenos y exógenos, encendiendo mecanismos innatos que buscan contener la diseminación de la inflección. Para esta contención los macrófagos pueden actuar como células efectoras con alta capacidad fagocítica e inflamatoria, constituyendo una de las primeras barreras de defensa del organismo contra los patógenos. Además, son células con potencial regulador, porque ayudan a mantener la integridad y homeostasis de los tejidos eliminando células apoptóticas y restos celulares, originados en ausencia de inflamación o como consecuencia de la inflamación inducida por agentes infecciosos o trauma. Esta regulación se asocia con la producción de citoquinas anti-inflamatorias y factores de crecimiento vinculados a la reparación de los tejidos (revisado por^{212,213}).

Los macrófagos residen en tejidos linfoides y no linfoides. Los orígenes de los macrófagos residentes en tejidos y su desarrollo han sido ampliamente investigados (revisado por²¹⁴). El dogma original proponía que se diferenciaban en el tejido a partir de monocitos²¹⁵, hecho que sucede, por ejemplo, en el intestino o la dermis^{216,217}. En el ratón, se observó que células precursoras

embrionarias colonizaron la mucosa intestinal y proliferaron *in situ* durante el período neonatal pero no persistieron en el intestino de los ratones adultos. Fueron reemplazados por el reclutamiento de monocitos, dependiente del receptor de quimioquinas CCR2, que se diferenciaron localmente a macrófagos maduros instruidos por el entorno del tejido local y la microbiota²¹⁷. Sin embargo, en otros tejidos como el cerebro, los pulmones y la epidermis los macrófagos murinos derivan exclusivamente de precursores embrionarios que en la etapa de desarrollo fetal pueblan los tejidos y se mantienen allí hasta la adultez. Durante el transcurso de la vida del individuo, estos macrófagos son capaces de auto-renovarse, manteniendo un pool constante de células en los tejidos independientemente de los monocitos circulantes en sangre^{218–220} (y revisado por^{221–224}). Sumando complejidad en el campo de la ontogenia de los macrófagos, estudios recientes demostraron que hay situaciones en las que los monocitos pueden reemplazar temporalmente a los macrófagos de origen embrionario. Esto sucede cuando hay un déficit en el número de células debido a un evento inflamatorio y el reclutamiento de monocitos contribuye a sostener funciones efectoras y colabora con la recuperación de las poblaciones de macrófagos permitiendo el retorno a la homeostasis²²⁵.

El desarrollo, diferenciación y supervivencia de los macrófagos en general dependen íntimamente del nicho en el que se encuentran^{223,226} y del factor estimulante de colonia 1 (M-CSF) e IL-34^{227,228}. Los macrófagos presentan una gran plasticidad que les permite modificar su fenotipo en función de las señales que censan del entorno. Al igual que otras células de la inmunidad innata contienen receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), codificados en la línea germinal, que reconocen señales de peligro en el tejido donde residen; detectan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés Pathogen Associated Molecular Patterns) o a daño tisular (DAMPs, del inglés Damage Associated Molecular Patterns). Existen 4 clases principales de familias de PRR que incluyen proteínas transmembrana, como los receptores tipo Toll y lectina tipo C, y proteínas citosólicas, como los receptores tipo RIG y tipo NOD (denominados por sus siglas en inglés, TLR, CLR, RLR y NLR, respectivamente). De estos PRRs, sólo los CLRs son receptores fagocíticos; el reconocimiento conlleva principalmente a la captura e internalización del ligando y la consecuente activación del estallido respiratorio que contribuye al ambiente oxidativo del fagolisosoma. Por otra parte, la detección de PAMPs o DAMPs por los PRRs no-fagocíticos o de señalización (TLR, RLR y NLR), regula al alza la transcripción de genes implicados en la respuesta inflamatoria como citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas y péptidos antimicrobianos, entre otros. Más allá del reconocimiento y activación a través de PRRs, los macrófagos pueden internalizar componentes por macropinocitosis, un mecanismo que incorpora fluído y partículas en vesículas citoplasmáticas mediante la formación de grandes extensiones de membrana plasmática (ruffing), en forma independiente de un receptor.

Según las señales recibidas a través de los PRRs los macrófagos se diferencian a fenotipos con propiedades contrastantes, llamados clásicos o M1 y alternativos o M2^{229,230} (revisado por^{214,231}), en un intento de hacer un paralelismo con la diferenciación de las células T²³². La Figura 1.6 ilustra estos fenotipos, incluyendo las señales que los inducen, las moléculas que expresan y sus cometidos frente a la infección. Los macrófagos M1 son activados directamente por patógenos en un contexto inflamatorio, a través del reconocimiento de PAMPs (como el LPS²³³) o DAMPs por receptores tipo TLRs, y de IFN-γ por su receptor específico. El IFN-γ es producido principalmente por las células NK (del inglés *Natural Killers*) en la fase innata de una respuesta y resulta muy aumentado cuando se generan linfocitos Th1 efectores, por lo cual los macrófagos M1 se asocian

con respuestas inmunes con esta perfil de activación T. De hecho, para mantener la diferenciación del fenotipo M1 a lo largo de una respuesta inmune, es necesaria la participación de linfocitos Th1 efectores, como fuente del IFN-y. Como resultado de su activación, los macrófagos clásicos aumentan las expresión en superficie de las moléculas coestimuladoras (CD40 y CD80/86) y del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, moléculas presentadoras del antígeno) de clase II (MHC-II), y secretan citoquinas (IL-1 β , IL-6, IL-12 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α^{234}). Estas citoquinas median la activación de células endoteliales e innatas, promoviendo y sosteniendo el reclutamiento y la activación de monocitos, neutrófilos y células NK capaces de eliminar patógenos. Cuando esta respuesta no es finamente controlada, puede dañar los tejidos propios. Adicionalmente los macrófagos M1 son altamente microbicidas como consecuencia de su gran potencial fagocítico²³⁵ y de su capacidad de realizar el estallido respiratorio, activando la NADPH oxidasa y generando ROS. Sus propiedades microbicidas también se potencian gracias a la inducción de la sintasa de óxido nítrico (NOS2, conocida también como iNOS, del inglés, Inducible Nitric Oxide Synthetase) que genera especies reactivas del nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés)²³⁶. Por otra parte, el fenotipo alternativo o M2 fue descrito en 1992 por Stein, Doyle y colaboradores, quienes encontraron que la IL-4 e IL-13 inducían la expresión de receptores fagocíticos, como el receptor de manosa (MR, CD206), dando lugar a un fenotipo diferente especializado en la reparación tisular^{108,109}. La IL-4 sería producida como resultado de daño tisular, aunque no es claro qué células son las responsables de su producción²³⁷, siendo los basófilos y mastocitos una de las fuentes propuestas para su producción temprana mientras que los linfocitos Th2 sostendrían la producción de IL-4 e IL-13 en el largo plazo²³⁸. Además, la diferenciación a M2 induce la expresión de la enzima arginasa-1 que conduce a la conversión de la arginina en ornitina, metabolito inmediato de la arginina en el ciclo de la urea. La ornitina posteriormente es metabolizada: la ornitina descarboxilasa conduce a la biosíntesis de poliaminas, esenciales para la proliferación celular, y la ornitina aminotransferasa genera prolina y glutamato, necesarios para la producción de colágeno²³⁹ (revisado por²⁴⁰). A su vez al consumir la L-arginina, disminuye su disponibilidad generando una baja en la producción de óxido nítrico por parte de la NOS2²⁴¹. De todas maneras para la definición del fenotipo M2 se aconseja el uso de varios marcadores en paralelo, siendo los principales las quitinasas como Ym1 y Ym2, producidas en grandes cantidades y relacionadas con la reparación de tejido y la homeostasis^{242,243}, así como también Relm α^{244} . Resulta interesante que la administración de IL-4 in vivo es suficiente para inducir la proliferación de macrófagos, mecanismo responsable de la auto-renovación de los macrófagos tisulares²⁴⁵.

Posteriormente se observó que dentro del perfil M2 se estaban incluyendo células con diferentes funciones, y por simplicidad, algunos autores propusieron diferenciar a estos macrófagos según sus roles en el mantenimiento de la homeostasis (revisado por²³²), definiendo al menos dos grandes grupos, los macrófagos alternativos especializados en la reparación tisular y los macrófagos reguladores, asociados principalmente con propiedades antiinflamatorias. Dentro de estos últimos se incluye un fenotipo, producto de la estimulación con ligandos de TLR junto con complejos inmunes de IgG, que puede generarse sobre el final de la respuesta inmune como forma de limitar la inflamación. La combinación de estos estímulos inducen un aumento en la expresión de IL-10, característica distintiva de este fenotipo regulador, a la vez que se provoca una baja en la producción de la interleuquina inflamatoria IL-12²⁴⁶. Como la IL-10 puede inhibir la producción y actividad de varias citoquinas pro-inflamatorias, estos macrófagos son potentes inhibidores de la inflamación, por más de que preserven la capacidad de producir citoquinas pro-inflamatorias y de ser células presentadoras de antígenos²⁴⁶. Además, se propuso que los 46

glucocorticoides liberados en respuesta al estrés inhiben la transcripción de citoquinas inflamatorias originando un fenotipo con propiedades reguladoras (revisado por²⁴⁷).



Figura 1.6. Macrófagos clásicos (M1) y alternativos (M2): señales que promueven su diferenciación, fenotipos adquiridos y respuestas efectoras consecuentes. Los estímulos M1 se agrupan según su capacidad para inducir respuestas y marcadores inflamatorios, siendo los principales el IFN- γ y el LPS. Al tomar contacto con los receptores celulares específicos, activan en los macrófagos vías de señalización diferenciales (JAK1-2/STAT1-2 y dependientes de MyD88/TRIF, respectivamente) promoviendo la expresión de moléculas presentadoras de antígeno (MHC-II) y coestimuladoras (CD86) así como de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF α) y perfiladoras de la activación T (IL-12) que generan respuestas de tipo 1 especializadas en eliminar patógenos intracelulares. Los estímulos M2, como la IL-4 o IL-13, encienden cascadas alternativas (JAK1-3/STAT6) que promueven un fenotipo caracterizado por la expresión del receptor de manosa (MR) y barrenderos (SRs), de arginasa (Arg) y la secreción de IL-10 y del receptor de IL-1 (IL-1r) asociado a las respuestas tipo 2 especializadas en eliminar/encapsular parásitos. Adaptado de²²⁹.

En la actualidad hay un intento por dejar atrás las clasificaciones de los macrófagos hasta ahora utilizadas e intentar unificar los criterios, mediante el uso de una nomenclatura que especifique el estímulo utilizado para la diferenciación del macrófago. Por ejemplo, el macrófago clásicamente activado debería nombrarse como M (LPS+IFN-γ), mientras que aquél al que definimos anteriormente como reparador debería definirse como M (IL-4) (revisado por²⁴⁸). De este modo se evita el uso de los términos, como M1, M2, clásico, alternativo y regulador, que a veces contemplan a más de una población y no reflejan el estímulo empleado para la obtención de las células. De todas formas, este cambio no está completamente instaurado.

1.6.1.2. Macrófagos de cavidad peritoneal

Debido a que en este trabajo se utilizó la cavidad peritoneal para analizar las propiedades inmunomoduladoras del EgAgB, se resumen las principales características de su composición celular, con énfasis en los macrófagos.

La cavidad peritoneal del ratón (CP) es un entorno único, caracterizado por la presencia e interacción de muchos tipos celulares. En condiciones basales la mayoría de las células peritoneales son macrófagos y linfocitos B1 aunque también están presentes, en proporciones menores, linfocitos B2 convencionales, linfocitos T, células NK, DCs y granulocitos (principalmente eosinófilos)^{249,250}. Sumado a la complejidad de la composición celular en la CP, se demostró la coexistencia de dos subconjuntos de macrófagos, que exhiben distintos fenotipos, funciones y orígenes. Estos subconjuntos se clasificaron según su morfología en macrófagos peritoneales grandes (LPM, del inglés large peritoneal macrophages) y macrófagos peritoneales pequeños (SPM, del inglés small peritoneal macrophages). SPM y LPM expresan diferencialmente una variedad de marcadores de superficie, incluidos los PRRs y proteínas implicadas en la presentación de antígenos y la migración celular. Los LPM son los más abundantes en el estado basal y expresan niveles altos del marcador fenotípico F4/80 y niveles nulos/bajos de MHC-II (F4/80⁺⁺MHC-II^{-/+}). Parecen originarse a partir de precursores embriogénicos y conservan la capacidad de proliferar in situ para conservar los niveles fisiológicos^{218,251}. Su mantenimiento en la CP está regulado por la expresión de factores de transcripción específicos y señales derivadas de los tejidos. Por el contrario, los SPM, representan un porcentaje menor en la CP en estado basal, tienen un fenotipo F4/80 bajo y MHC-II alto (F4/80⁺MHC-II⁺⁺), y se generan a partir de precursores mieloides derivados de la médula ósea²⁵². Las poblaciones mencionadas promueven respuestas diferenciales frente a la estimulación in vitro e in vivo, reforzando que los macrófagos peritoneales no pueden considerarse una población única. En respuesta a estímulos infecciosos o inflamatorios, la composición celular de la CP se altera drásticamente, los LPM desaparecen y los SPM aumentan y se convierten en la población prevalente junto con su precursor, el monocito inflamatorio reclutado desde la circulación^{249,251,253–255}. La reacción de desaparición de LPM en la CP ocurre en procesos inflamatorios agudos²⁵⁶ e inicialmente se asoció con la muerte celular, la migración a los ganglios linfáticos drenantes o la adherencia de los macrófagos a los tejidos estructurales. Hoy se sabe que este comportamiento se debe principalmente a su migración al omento o epiplón mayor^{249,254}. Frente a la estimulación de la CP con LPS, zymosán o tioglicolato y el estudio de sus efectos locales en el corto plazo, se ha observado que los LPM tienen una dinámica inicial de desaparición y sus niveles no se recuperan totalmente tras los primeros días (entre dos y cuatro días dependiendo de la estimulación^{249,257}). En cuanto a sus cometidos, los SPM y LPM exhiben funciones diferenciadas y especializadas en la CP; los SPM presentan un perfil pro-inflamatorio y los LPM parecen tener un papel en el mantenimiento de la homeostasis. En este sentido, los SPM

48

serían la principal fuente de mediadores inflamatorios en la CP durante la infección, mostrando una mayor actividad fagocítica y siendo la principal fuente de IL-12²⁵⁵. Este hecho se ha correlacionado con la renovación y mejora de las condiciones inmunitarias de la CP²⁵⁵. Los LPM, por su parte, contribuirían a la producción de IgA por células B1 peritoneales dependiente del ácido retinoico e independiente del tejido linfoide asociado al intestino²⁵⁴. Por lo tanto, la presencia de LPM y SPM especializados en la CP es crucial para mantener la salud de este compartimento²⁵².

1.6.2. Los monocitos

Los monocitos constituyen el 10% de los leucocitos circulantes en humanos y el 4% en ratón. Se desarrollan en la médula ósea a partir de un progenitor mieloide común compartido con los eritrocitos, plaquetas, DCs y granulocitos. Adicionalmente, el bazo del ratón constituye un reservorio periférico importante de monocitos²⁵⁸. Históricamente, se pensaba que los monocitos se diferenciaban exclusivamente a macrófagos y DCs en el tejido. Sin embargo, hoy sabemos que la mayoría de los macrófagos residentes posee un origen embrionario mientras que las DCs derivan principalmente de distintos precursores de la médula ósea. Por lo tanto, los monocitos se han liberado de su imagen exclusiva como "hermanos inmaduros" de los macrófagos o DCs²⁵⁸. De hecho, los monocitos reclutados durante la inflamación dan lugar a células derivadas de monocitos que a menudo son funcionalmente distintas de dichas poblaciones²⁵⁹.

Los monocitos se caracterizan por funcionar como un "escuadrón de emergencia", preparado para movilizarse rápidamente y en grandes cantidades a los sitios inflamados, y por su gran plasticidad lo que les permite mediar efectos pro-inflamatorios o resolutivos. Esta plasticidad es compartida por otras células mieloides como los macrófagos, ya que es consecuencia de que sus propiedades derivan de la activación inducida por el reconocimiento de las señales de peligro (PAMPs o DAMPs) a través de PRRs. Dependiendo del conjunto de señales detectadas, los monocitos pueden adquirir propiedades pro-inflamatorias y citotóxicas (secreción de citoquinas y mediadores lipídicos pro-inflamatorios y producción de ROS/RNS), o resolutivas y de reparación celular (secreción de citoquinas y mediadores lipídicos anti-inflamatorios entre otros productos) (Figura 1.7). En modelos de infección por Listeria monocytogenes, Trypanosoma brucei, Toxoplasma gondii o Leishmania major se identificó un subconjunto de monocitos efectores, llamados (Tip)-DC, que refuerzan la función de eliminación de los patógenos por los macrófagos residentes mediante la secreción de la citoquina proinflamatoria TNF- α y la producción de óxido nítrico (revisado por²⁵⁸). Adicionalmente, en la infección por helmintos como Schistosoma mansoni, se ha descrito que los monocitos infiltrantes pueden adoptar un fenotipo similar a M2, con expresión de CD206 (MR) incluso antes de su diferenciación a macrófagos²⁶⁰. En procesos inflamatorios crónicos el reclutamiento de monocitos puede contribuir a perpetuar la inflamación favoreciendo la patología como sucede en enfermedades autoinmunes como la encefalomielitis autoinmune²⁶¹, el lupus eritematoso sistémico, la esclerosis sistémica y la artritis reumatoidea (revisado por²⁶²). Asimismo, en un modelo de colitis, se mostró que los monocitos reclutados contribuirían a perturbar la homeostasis en el colon e impulsar aún más la colitis, ya que produjeron menos IL-10 y más TNF-α que los macrófagos derivados de monocitos presentes en el intestino previo a la inducción de la patología²⁶³. Los fenotipos de monocitos regulatorios podrían adquirirse incluso mientras se encuentran en circulación, antes de extravasar al tejido lesionado o inflamado²⁶⁴. Existen varios modelos en los que se postula la contribución de los monocitos a la regulación de la inflamación y

la reparación tisular, incluyendo situaciones de daño cardíaco (infarto)^{265,266}, hepático (donde serían responsables de acelerar el proceso de cicatrización)^{267–269}, lesiones en la retina y la médula espinal^{258,270} así como también durante la inflamación alérgica, donde amortiguan las respuestas alérgicas crónicas promovidas por la IL-4 derivada de los basófilos²⁷¹.

En humanos, existen tres grandes grupos de monocitos que se definen dentro del conjunto de células HLA-DR⁺: los monocitos clásicos CD14⁺⁺CD16⁻ constituyen entre el 80-90% de los monocitos circulantes y los monocitos intermedios CD14⁺CD16⁺ y no clásicos CD14^{-/+}CD16⁺ completan el 10 a 20% restante^{214,272}. En el ratón se clasifican los monocitos clásicos son Ly6C⁺⁺CCR2⁺CX3CR1⁻ y los no clásicos son Ly6C^{-/+}CCR2^{-/+}CX3CR1^{++221,273}. La comparación transcripcional entre el humano y el ratón mostró una correlación entre los monocitos clásicos CD14⁺⁺CD16⁻ y los Ly6C⁺⁺, así como entre los no clásicos CD14^{-/+}CD16⁺ y los Ly6C^{-/+}. De todos modos, la representación de cada grupo difiere entre las especies ya que en humanos predominan los clásicos mientras que en ratón están igualmente representadas las poblaciones. Se propone que las distintas poblaciones de monocitos difieren en sus funciones efectoras^{214,274}. Los monocitos clásicos tienen la capacidad de migrar a los tejidos en condiciones homeostáticas²⁷⁵ y una vez allí pueden transportar antígenos a los ganglios linfáticos o contribuir a la población de macrófagos residentes^{216,225,276,277}. Secretan principalmente citoquinas inflamatorias como IL-6 y quimioquinas como IL-8, CCL2 y CCL3 en respuesta a PAMPs o DAMPs, reclutando más células inflamatorias al sitio de infección/daño^{278,279}. Como ya se mencionó, estos monocitos cubrirían la desaparición de macrófagos residentes que se da bajo ciertas condiciones inflamatorias^{264,280}. En el caso de la cavidad peritoneal, los monocitos infiltrados comienzan un camino de diferenciación que lleva a la reducción de la expresión de Ly6C para culminar aportando a la población de macrófagos residentes (SPM, F4/80⁺MHC-II⁺⁺)²⁵⁵. No se conoce con exactitud si los macrófagos que derivan de monocitos infiltrantes pueden suplir todas las funciones de los macrófagos residentes de origen embrionario. Se piensa que al entrar al tejido sufren cambios transcripcionales inducidos por estímulos del ambiente que los asemeja a los macrófagos residentes de origen embrionario, pero mantienen diferencias epigenéticas, transcripcionales y funcionales, incluyendo el hecho que carecen de la capacidad de autorrenovarse, al menos por períodos largos. En la sangre, los monocitos clásicos que permanecen en circulación, se diferencian en monocitos intermedios CD14⁺CD16⁺²⁷³ que pueden secretar grandes cantidades de IL-1 β y TNF- α cuando se estimulan con PAMPs como el LPS^{278,279}. Se ha visto que en células del endotelio activadas por TLR7, los monocitos CD14⁺CD16⁺ se encargan del reclutamiento de los neutrófilos que median la muerte de las células endoteliales, para luego proceder a la eliminación de los deshechos celulares generados²⁸¹. Por otra parte, los monocitos CD14^{-/+}CD16⁺ se conocen como monocitos "patrulleros" que actúan como fagocitos residentes de la vasculatura, examinando continua y activamente el endotelio y eliminando desechos²⁷² (restos celulares circulantes²⁸² y la proteína βamiloide en el lúmen de las venas²⁸³). La molécula CD16 es un receptor para el fragmento Fc de anticuerpos IgG, por tanto los monocitos que expresan CD16 son eficientes en realizar fagocitosis mediada por anticuerpos. Respecto al tiempo de vida, los monocitos no clásicos circulan en promedio en la sangre 2 días en el ratón y 7 días en el ser humano^{218,273}, dependiendo de la disponibilidad de M-CSF²⁸⁴. El mayor tiempo de vida en la circulación les otorga una ventaja ya que mantiene un pool importante de células circulantes, incluso en condiciones de inflamación, cuando los monocitos clásicos se destinan mayoritariamente a extravasar a los tejidos y no pueden originar monocitos no clásicos.



Figura 1.7. Diversidad de funciones de los monocitos en condiciones fisiológicas y patológicas. Los monocitos constituyen reservorios periféricos, pueden diferenciarse al fenotipo no clásico patrullante o ingresar a los tejidos para cumplir distintas funciones en condiciones homeostáticas o patológicas. Dependiendo del estímulo, al ingresar al tejido pueden adquirir capacidades inflamatorias, de presentación de antígenos, moduladoras, anti-inflamatorias o regenerativas. La inflamación puede conducir a la producción de nuevos subconjuntos de monocitos y contribuir con la inmunidad entrenada asociada al aumento en su número y en la producción de citoquinas inflamatorias. Adaptado de²⁵⁸.

1.6.3. Respuesta inducida por el LPS en macrófagos y monocitos

1.6.3.1. Generalidades sobre el LPS

Dado que en este trabajo se utilizó LPS como agonista para modelar la activación inflamatoria de monocitos y macrófagos, se revisa aquí la literatura sobre sus principales características bioquímicas, relevantes en cuanto a la interacción con los principales PRRs en células innatas, particularmente el receptor TLR4 y NLRP3. Por otra parte, vale la pena resaltar que si bien no se trata de un PAMP derivado de cestodos, existe un arrastre de productos derivados de la microbiota intestinal al hígado, por la vía porta, que mantienen niveles de LPS en el hígado²⁸⁵, principal localización de la hidátide. Por esta razón, es un agonista que fisiológicamente podría estar presente en el sitio de establecimiento de la hidátide.

El LPS es una molécula grande de naturaleza glicolípidica, anfipática, considerada como el antígeno de superficie más importante de las bacterias Gram-negativas. Desempeña una importante función en la activación del sistema inmune, siendo el responsable del shock endotóxico²⁸⁶. Los estudios de varias bacterias Gram-negativas sugieren una estructura general común del LPS (revisado por²⁸⁷). La molécula se compone de tres regiones principales, el lípido A, la región central y las colas de O-polisacáridos, cada una con funciones diferentes y/o sinérgicas

que contribuyen a su virulencia y a la complejidad de las interacciones que establece con células del hospedero. Brevemente, el lípido A, es la porción lipofílica de la molécula; generalmente se compone de un dímero de glucosamina (D-GlcN) unido a seis cadenas de acilo por enlaces éster o amida que le permiten ensamblarse en la membrana externa bacteriana. La región central o core se divide en dos partes: una región interna, compuesta por heptosas, ácido 3-desoxi-Dmanooctulosónico (Kdo) y L-glicero-D-manoheptosa, y una externa, formada por hexosas (glucosa, galactosa y N-acetilglucosamina). En la mayoría de las cepas Gram-negativas, esta región central está unida a las unidades repetidas de sacáridos llamados O-polisacáridos u Oantígenos^{288–290} (Figura 1.8). Los antígenos O varían entre las cepas bacterianas y dan a las bacterias un fenotipo rugoso o liso; están truncados o ausentes en el fenotipo rugoso en comparación al liso. Las variaciones en los antígenos O pueden asociarse con mecanismos de evasión del sistema inmunitario, en particular el sistema del complemento del hospedero²⁹¹. Por otra parte, el lípido A, así como las regiones de polisacáridos, pueden inducir potentes respuestas inmunitarias^{289,292-294}. Particularmente, el lípido A es responsable de varios efectos fisiopatológicos que incluyen toxicidad, mitogenicidad, reactividad del complemento^{295,296} y gelificación del lisado de Limulus^{297,298}. La fracción soluble de lípido A indujo toxicidad y pirogenicidad en ratones y conejos, reproduciendo las propiedades del LPS intacto²⁹⁷. Además, el lípido A de *E. coli* sintetizado químicamente mostró actividad endotóxica idéntica a la del compuesto natural, respaldando aún más al lípido A como centro endotóxico del LPS^{292,297,298}.



Figura 1.8. Estructura del LPS presente en la pared de bacterias Gram-negativas. El LPS proporciona integridad estructural y funcional a la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. Es una molécula anfipática con una estructura general que consta de tres regiones diferentes: el lípido A hidrofóbico, un polisacárido central y el antígeno O. El lípido A consta de un esqueleto de diglucosamina bifosforilada (GlcN-P) sustituido con seis cadenas de acilo que están unidas por un enlace éster o amida. Adaptado de²⁸⁷.

Existen varias moléculas de reconocimiento del LPS en las células innatas, entre los que se encuentran receptores de membrana y citosólicos. Dentro de estos receptores, el TLR4 es el más importante y mejor caracterizado en relación a la interacción con el LPS. Está expresado en la superficie de las células fagocíticas del sistema inmune, incluídos los macrófagos tisulares, los monocitos periféricos, los neutrófilos y las DCs²⁸⁷. El reconocimiento de LPS por TLR4 induce una cascada de señalización inflamatoria con producción de citoquinas que contribuye a eliminar patógenos invasores (revisado por^{291,299}). Si bien se pensaba que el TLR4 era el único receptor para el LPS, estudios recientes han proporcionado información sobre dos sistemas de reconocimiento de LPS independientes de TLR4, el receptor de potencial transitorio (TRP, del inglés *transient receptor potential*) dependiente de canales que detecta LPS extracelular y la caspasa-4/5/11 que detecta LPS intracelular. El LPS extracelular detectado por los canales TRP presentes en las células neuronales provoca inflamación neurogénica y dolor en ratones³⁰⁰. La caspasa-4/5 en humanos y la caspasa-11 en ratones detectan LPS dentro del citosol de las células inmunes innatas, como los macrófagos, para impulsar la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-1β e IL-18 y la muerte celular inflamatoria, denominada piroptosis³⁰¹⁻³⁰³.

1.6.3.2. Principal sensor celular para el LPS: el TLR4

Como lo dice su nombre, el receptor TLR4 pertenece a la familia de TLRs, proteínas transmembrana que atraviesan una única vez la bicapa lipídica de la célula que tienen la capacidad de reconocer diferentes ligandos (revisado por³⁰⁴). Estructuralmente posee una región extracelular con copias de un dominio de repetidos ricos en leucina (LRR del inglés, Leucine Rich Reapets) y una porción citoplasmática con un dominio Toll/receptor de IL-1 (TIR, del inglés Toll-IL-1 Receptor). El conjunto de dominios LRR en el exterior adopta una forma de herradura que se adapta al reconocimiento y unión del ligando específico. Tras el reconocimiento se produce la dimerización del TLR4 que acerca los dominios TIR y permite su interacción con moléculas adaptadoras que continúan la señalización intracelular. Existen cuatro moléculas adaptadoras que participan en vías de señalización dependientes de TLR4 (Figura 1.9): TIRAP, MyD88, TRIF y TRAM (revisado por³⁰⁴). Una de estas vías utiliza a TIRAP/MyD88^{305,306}, proteínas que poseen un dominio TIR C-terminal que se asocia con el dominio TIR del TLR4 y lleva a la formación de un complejo proteico, o myddosoma, junto con otras serin-treonin quinasas de la familia IRAK³⁰⁵. El reclutamiento de IRAK-4 facilita la fosforilación de IRAK-1 mediada por IRAK-4. IRAK-1 activado luego se asocia con TRAF6 lo que conduce a la activación de dos vías de señalización distintas. Por un lado la activación de los factores de transcripción AP-1, a través de la activación de MAP quinasas, y por otro la activación del complejo TAK1/TAB, que potencia la actividad del complejo IKB quinasa (IKK) asociada a la fosforilación y posterior degradación del inhibidor IKB, y la consecuente translocación nuclear del factor de transcripción NF-KB³⁰⁷. La activación de este factor es responsable de la expresión de diversas citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-12 y TNF- α , entre otras³⁰⁸ y de la producción de NO. Por otro lado, se observó que la estimulación vía TLR4 de macrófagos deficientes en MyD88 llevó a la activación de NF-κB con una cinética retrasada, identificando una vía independiente de MyD88 y dependiente de la endocitosis del TLR4 y su asociación con TRIF y TRAM (del inglés TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β y trif related adaptor molecule, respectivamente)^{309,310}. Esta vía, a través del factor RIP1, conduce a esta activación retrasada de NF-κB³¹¹ y a través de TBK1 e ΙΚΚί/ΙΚΚε^{312,313}, que son miembros de las quinasas ΙκΒ no canónicas, activa directamente IRF3³¹⁴. TBK1, y en menor medida, IKKi/IKKɛ, participan en la inducción de IFN tipo I y genes estimulados por IFN dependiente de TRIF³¹⁵⁻³¹⁸. En conjunto, el

reconocimiento de ligandos por el TLR4 enciende vías que promueven la expresión de citoquinas proinflamatorias y de moléculas coestimuladoras sobre la superficie celular, relevantes para la activación T en el ganglio o el reconocimiento con linfocitos T efectores en el tejido.



Figura 1.9. Vías de señalización a través de TLR4. Las vías de señalización de TLRs consisten en dos principales cascadas según los adaptadores que contiene el dominio TIR, como TIRAP/MyD88 y TRIF/TRAM. MyD88 media la activación de NF-κB y la subsiguiente inducción de genes de citoquinas inflamatorias y NOS2. TRIF media la activación dependiente de IRF3 y NF-κB y la posterior inducción de IFN-β y de moléculas co-estimuladoras. Adaptado de³⁰⁴.

1.6.3.3. Reconocimiento del LPS dependiente e independiente de TLR4

El reconocimiento eficiente del LPS por las células inmunes y la consecuente producción de mediadores inflamatorios por parte del TLR4 (Figura 1.10) requiere de la acción orquestada de varias proteínas accesorias, como la proteína de unión a LPS (LBP, del inglés *LPS-binding protein*), CD14 y MD2^{319,320} (y revisado por²⁸⁷). Aunque la naturaleza exacta de la interacción entre el LPS y el complejo TLR4/MD2 es algo incierta aún, varios estudios han podido desentrañar etapas del proceso. El LPS forma micelas que a menudo son secretadas por bacterias Gram-negativas en forma de vesículas de membrana externa^{321,322} (OMV, del inglés *outer membrane vesicles*). La extracción del monómero de las micelas de LPS requiere la acción concertada de la LBP y CD14. Se postula que el inicio del reconocimiento comienza con la disociación del monómero de agregados de LPS por la LBP, acción que depende del dominio N-terminal de esta proteína^{323,324}. La LBP media el transporte del LPS a CD14, presente en la mayoría de las células fagocíticas³²⁵. En una mezcla de reacción de micelas de LPS con LBP o CD14, sólo las moléculas de LBP se unieron a la superficie de las micelas de LPS, lo que sugiere que CD14 no puede interactuar directamente con los agregados de LPS. Sin embargo, CD14 puede unirse al agregado LBP-LPS y extraer monómeros



Figura 1.10. Reconocimiento del LPS por el receptor TLR4 y sus consecuencias funcionales. La proteína sérica LBP se une al monómero de LPS y lo entrega a una molécula de CD14 que puede ser soluble o estar unida a la membrana (proteína anclada a glicosilfosfatidilinositol). CD14 transfiere el LPS al ectodominio del complejo receptor TLR4/MD2 que conduce a la homodimerización del TLR4 y la posterior activación de la vía MyD88/TIRAP. Por otra parte, la endocitosis del complejo LPS-TLR4/MD2 conduce a la activación de la vía TRIF/TRAM.

de LPS por un mecanismo que involucra la interacción de CD14 con el extremo C-terminal de la LBP³²⁴. Una vez que el CD14 se carga con un monómero de LPS, se disocia de la LBP y facilita la transferencia del LPS al complejo MD2/TLR4 en un proceso de un solo paso (el MD2 sólo no puede recibir/extraer el LPS de CD14)³²⁴. La unión del LPS conduce a la dimerización del complejo TLR4/MD2-LPS, permitiendo que el LPS interactúe con el bolsillo hidrofóbico presente en MD2, donde cinco de las seis cadenas lipídicas quedan enterradas en el interior del bolsillo y una expuesta a la superficie que interactúa con una segunda molécula de TLR4. Esto conduce a cambios estructurales adicionales en MD2 que respaldan la dimerización del complejo TLR4-MD2^{326,327}. La unión del LPS al complejo TLR4-MD2 depende de la estructura del LPS, en particular el LPS de R. sphaeroides no conduce a la dimerización del TLR4 en comparación con el LPS de E. $coli^{328}$. La unión de TLR4/MD2-LPS promueve la homodimerización de los ectodominios de TLR4 y los cambios estructurales y conformacionales subsiguientes inducen la dimerización del dominio TIR. Como ya se mencionó, el myddosoma media cascadas de señalización que conducen a la translocación de NF-KB y AP-1 induciendo la expresión de citoquinas proinflamatorias y de la NOS2^{329–331} (revisado por^{308,332}). Además de la señalización iniciada en la superficie celular, la unión de LPS conduce a la endocitosis del TLR4 activando TRIF/TRAM con la consecuente inducción de interferones de tipo 1 y potenciación de NO.^{310,318,333}. Esta vía, además, parece ser la principal responsable de la inducción de la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD40 y CD86 que caracterizan a la activación de APCs por LPS³³⁴⁻³³⁷. En conjunto, la literatura muestra la importancia del TLR4 como sensor del LPS. De hecho, ratones deficientes en TLR4 son muy susceptibles a la infección por diferentes cepas de bacterias Gram-negativas debido a la incapacidad de reconocer e iniciar una respuesta inmunitaria adecuada³³⁸. En contrapartida, esta deficiencia los hace resistentes al shock por LPS³³⁹.

Por otra parte, corresponde mencionar que el LPS asociado con bacterias u OMVs, y quizás el LPS purificado, puede in vivo acceder al citosol y estimular PRRs (Figura 1.11)³⁴⁰; esto no parece suceder con el LPS purificado en modelos de estimulación *in vitro*³⁴⁰. Se ha demostrado que el DAMP HMGB1, con capacidad para unirse a LPS, está involucrado en el transporte intracelular de LPS^{341,342} (Figura 1.11). No obstante, la mayoría de los mecanismos por los cuales el LPS libre se traslada al citosol in vivo siguen siendo desconocidos. En el citosol existen receptores para PAMPs, de la familia de receptores tipo NOD (NLRs, del inglés nucleotide-binding and oligomerization domainlike receptors). Miembros de esta familia, como el NLRP3, detectan productos y actividades microbianas conduciendo al ensamblado de un complejo supramolecular especializado llamado inflamasoma (revisado por³⁴³), responsable de la activación de la caspasa-1, que es necesaria para la maduración y consecuente secreción de las citoquinas proinflamatorias IL-18 e IL-18³⁴⁴. Sin embargo, dos estudios independientes describieron que el LPS que logra el acceso al citosol celular puede activar otra caspasa, la caspasa-11, en forma independiente de TLR4 y de NLRs^{302,345}. Esta activación, que depende de la unión del lípido A al dominio CARD de la caspasa-11, tiene una alta afinidad (comparable a la de la unión al complejo TLR4-MD2³⁴⁶) y desencadena su oligomerización y activación catalítica, de acuerdo con el modelo donde las caspasas iniciadoras se activan por proximidad. Los ortólogos humanos caspasa-4 y caspasa-5 también pueden unirse directamente al LPS y activarse proteolíticamente para desencadenar la piroptosis³⁴⁶. Este mecanismo de activación de las caspasas 11/4/5 que no requiere de un andamio de tipo NLR para su activación, constituye una vía para la generación de un inflamasoma no-canónico. Se puede interpretar que estas caspasas actuarían como receptores funcionales para el LPS intracelular (revisado por³⁴⁷), induciendo la formación de un inflamasoma no canónico^{302,345,346} que lleva al procesamiento de la gasdermina D (GSDMD) y la piroptosis. En forma secundaria a la formación de este inflamasoma, el efecto de la GSDMD sobre la membrana celular conduce a la activación del inflamasoma NLRP3 y la maduración de caspasa-1, IL-1β e IL-18³⁴⁸⁻³⁵⁰ (Figura 1.11), probablemente como consecuencia de la disminución del K⁺ intracelular (revisado por³⁵¹). CD14 desempeñaría un papel esencial en la activación in vivo de la caspasa-11 por LPS intracelular, independiente de TLR4, sugiriendo que es un componente integral del inflamasoma no canónico inducido por el LPS³⁵².

De acuerdo con las vías de señalización anteriormente descriptas, la estimulación con LPS de monocitos y macrófagos promueve un fenotipo tipo M1 pro-inflamatorio, aumentando la expresión de moléculas presentadoras de antígeno (MHC-II) y coestimuladoras (CD40 y CD80/86), de la NOS2, y la producción de las citoquinas IL-1β, IL-6, IL-12 y TNF-α, entre otras^{234,353}. Debido a sus fuertes efectos proinflamatorios el LPS se ha utilizado como modelo para activar monocitos y macrófagos *in vitro*^{354,355 356-360}, particularmente para el estudio de propiedades moduladoras de componentes parasitarios^{131,361208}. En cuanto a los monocitos, se observaron diferencias en la capacidad de respuesta/fenotipo entre los pertenecientes a la línea THP-1 y aquellos derivados de sangre periférica tras su estimulación con LPS^{353,362,363}, lo que refleja la heterogeneidad poblacional y efectora en los modelos existentes, complejizando su estudio. Existen también modelos *in vivo* de estimulación con LPS que han permitido comprender la dinámica de las poblaciones de monocitos y macrófagos peritoneales y sus fenotipos en presencia de inflamación^{249,255} así como describir el rol protector/modulador de componentes con posibles aplicaciones para el tratamiento de trastornos inflamatorios crónicos³⁶⁴.



Figura 1.11. Detección de LPS citosólico por el inflamasoma no canónico. El LPS que accede al citosol es detectado por una subfamilia de caspasas, la caspasa-11 en ratones y la caspasa-4/5 en humanos. Las acciones coordinadas de GBPs e IRGB10 facilitan la liberación de LPS de bacterias en el fagosoma o bacterias que han invadido el citosol. Las OMV secretadas por las bacterias también permiten que el LPS alcance localización citosólica durante la infección. La señalización de interferón tipo I iniciada tras el reconocimiento de LPS por TLR4-TRIF asegura la expresión adecuada de componentes del inflamasoma no canónico, como caspasa-11, GBP e IRGB10. La caspasa-11 y la caspasa-4 activas escinden GSDMD para liberar su NTD, que migra a la membrana plasmática para formar poros con un diámetro interno de aproximadamente 18 nm. En los monocitos, el inflamasoma NLRP3 también se activa después de formación de los poros de GSDMD, muy probablemente debido a la disipación de potasio intracelular (K+) a través de éstos. La acumulación de poros de GSDMD en la membrana plasmática eventualmente conduce a la muerte celular piroptótica, que ocurre tanto en los monocitos como en las células no monocíticas. IFNAR: receptor de interferones tipo I; GBPs: proteínas de unión a guanilato; IRGB10: miembro B10 de la familia GTPasa relacionada con la inmunidad; IFN-β: interferón-β; GSDMD: gasdermina DFL: largo total; NTD: dominio amino terminal.

1.7. Hipótesis y objetivos de la tesis

1.7.1. Hipótesis de estudio

E. granulosus regula la respuesta inmune de su hospedero permitiéndole establecer infecciones crónicas. La potente inmunomodulación desplegada es producto de múltiples mecanismos donde intervienen distintos componentes del parásito. Uno de los candidatos parasitarios es el EgAgB, dado su potencial inmunomodulador, su expresión en las formas infectivas (oncósfera y PE) y en la hidátide y su evidente interacción con el sistema inmune del hospedero dada la generación de anticuerpos específicos.

La hipótesis de este trabajo es que el EgAgB interacciona con células de la inmunidad innata, incluyendo macrófagos y monocitos inflamatorios, lo que contribuye a limitar la inflamación local y probablemente repercute en la respuesta adaptativa montada frente a la infección. Además, por ser una lipoproteína similar a la HDL de vertebrados y contener lípidos esenciales para el parásito, particularmente esteroles, planteamos que el EgAgB se une a estas células innatas a través de receptores para lipoproteínas y cumple un papel dual: transduce señales moduladoras que contribuyen al apagado de la inflamación inducida por la infección y participa en la adquisición y/o transporte de colesterol del hospedero²⁰³ (Figura 1.12).



Figura 1.12. Hipótesis sobre el papel del EgAgB durante el desarrollo de la larva de *E. granulosus* en el hospedero intermediario. La infección por el parásito en vísceras del hospedero lleva al desarrollo de una respuesta inflamatoria desencadenada por señales de peligro derivadas de componentes de la larva y de la generación de DAMPs. El EgAgB, sintetizado en la etapa de pre-enquistamiento por la oncósfera (infección primaria) o el PE (infección secundaria), o en la etapa post-enquistamiento por la hidátide, alcanza la interfaz con el hospedero donde se encuentran células de la inmunidad innata. El EgAgB interactúa con macrófagos y monocitos inflamatorios para tomar lípidos esenciales para el parásito, como el colesterol, y a la vez imprime señales anti-inflamatorias que contribuyen a regular la inflamación inducida por la infección. El rol

inmunomodulador encuentra sustento en ensayos con preparaciones de EgAgB desnaturalizadas pero no se ha estudiado utilizando la lipoproteína en su estado nativo.

1.7.2. Objetivo general

Buscar evidencias de la participación del EgAgB en circuitos de inmunomodulación y en el metabolismo lipídico de *Echinococcus granulosus* s.l..

1.7.3. Objetivos específicos

1) Caracterizar la composición química del EgAgB nativo obtenido de materiales parasitarios disponibles en nuestro laboratorio

- 1.1 Poner a punto una nueva metodología para la purificación del EgAgB nativo que permita la caracterización de su composición y función
- 1.2 Identificar las variantes apolipoproteicas y los ligandos hidrofóbicos del EgAgB nativo presente en el LH

2) Analizar la capacidad de unión del EgAgB a macrófagos y monocitos, posibles blancos presentes en la interfaz hospedero-parásito, incluyendo:

- 2.1 la contribución del componente proteico y lipídico
- 2.2 la participación de receptores para lipoproteínas plasmáticas
- 3) Estudiar a nivel funcional los efectos del EgAgB sobre células innatas, evaluando:
 - 3.1 si es capaz de modular la respuesta inflamatoria de macrófagos, en modelos *in vitro* de activación por agonistas de TLRs
 - 3.2 si es capaz de remover colesterol de los macrófagos *in vitro*
 - 3.3 en el modelo murino, si altera la composición de la cavidad peritoneal a nivel celular y de mediadores solubles, en ausencia o presencia de LPS

CAPÍTULO 2

Materiales y Métodos

CAPÍTULO 2: Materiales y Métodos

En este capítulo de describen los materiales y métodos empleados durante el desarrollo del presente trabajo. Los procedimientos se llevaron a cabo, en su mayoría, en el Área Inmunología perteneciente a Facultad de Ciencias y Facultad de Química. En caso contrario, se indica oportunamente el lugar donde se realizaron los experimentos.

2.1. Materiales

2.1.1. Reactivos generales

Se adquirieron del laboratorio Sigma-Aldrich (EEUU) todas las sales inorgánicas utilizadas en las soluciones amortiguadoras, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), di-tert-butil-4-metilfenol (BHT), bromuro de potasio, albúmina del suero bovino (BSA), ovoalbúmina (OVA), detergentes laurilsulfato de sodio (SDS), monolaurato de polioxietilen-sorbitan (Tween 20), 4-(1,1,3,3-Tetrametilbutil) fenil-polietilenglicol (Tritón X-100), gel de sílica (flash sílica), 3,3',5,5'tetrametilbenzidina (TMB), estreptavidina conjugada a peroxidasa y los reactivos para la preparación de geles de poliacrilamida como bisacrilamida, N,N,N,N-tetrametiletilenodiamina (TEMED) y persulfato de amonio, ácido tri-fluoro acético (TFA), azul de Coomassie R250, marcador de peso molecular de amplio rango (#S8455). Además, se obtuvieron reactivos para su uso en cultivo celular incluyendo bicarbonato y piruvato de sodio, HEPES, dimetil sulfóxido (DMSO), Lglutamina, solución antibiótica/antimicótica (Ab/Am, conteniendo 100 U/ml penicilina, 0.1 mg/ml estreptomicina y 250 ng/ml anfotericina B), forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), lipopolisacárido (LPS, Sigma #L4516, Escherichia coli O127:B8), zymosán, ácido poliinosínico-policitidílico (Poly I:C), lactoferrina y ácido poli-inosínico, LB agar, LB líquido, ampicilina, kanamicina. De los laboratorios Pierce-Thermo Fisher Scientific (EEUU) se adquirieron N-hidroxisuccinimida-biotina (NHS-Biotina), N hidroxisuccinimida-fluoresceína (NHS-FITC), reactivos para reacciones de PCR incluyendo la Tag ADN polimerasa (Fusion #F530S), MgCl₂, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) solución amortiguadora concentrada (buffer 10x Phusion HF), reactivos para electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa (amortiguador de muestra 6x y marcador de peso molecular) y marcador de peso molecular preteñido (#26616) utilizado en las SDS-PAGE. Del laboratorio AppliChem (Alemania) se obtuvieron reactivos para electroforesis como acrilamida, ditiotreitol -DTT-, urea y tricina) y los medios de cultivo DMEM (bajo y alto contenido en glucosa) y RPMI 1640. De Dorwil (Argentina) se obtuvieron el ácido acético, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, cloroformo, etanol, formaldehído, isopropanol y metanol. Del laboratorio Merck (Alemania) (acetato de etilo, acetona, diclorometano, dietiléter y hexano). El origen del resto de reactivos bioquímicos se detalla en la descripción de los procedimientos donde se utilizaron. Finalmente la fosfolipasa D se adquirió en Calbiochem, la estreptavidina FITC en BD Bioscience, el marcador de viabilidad AOPI en Perkin Elmer, el anestésico inhalatorio isofluorano en Cristalina, la PC y PS en Avanti Polar Lipids, el LPS-Alexa 488 en Molecular Probes y la columna Strep-Tactin XT de 5 mL (IBA Life Sciences) y sus soluciones para la unión y elución en IBA Life Sciences.

2.1.2. Anticuerpos

El anticuerpo monoclonal EB7 (Mo-EB7) que reconoce la apolipoproteína EgAgB8/1¹⁹³ fue generosamente donado por el Dr. Gualberto González (Área Inmunología, Facultad de Química).

Para los ensayos de unión del EgAgB a las células en cultivo se utilizó un anticuerpo IgG1 kappa como isotipo control del Mo-EB7 y un anticuerpo anti-IgG/IgM de ratón conjugado a FITC (BD Biosciences) para revelar la interacción. En aquellos ensayos de unión a células inflamatorias de ratón, los monocitos/macrófagos se identificaron empleando un anticuerpo anti F4/80-PE (BD Biosciences).

2.1.3. Animales de experimentación

Se utilizaron hembras de las cepas C57BL/6 ó Balb/c de 9 a 12 semanas de edad, criadas en el bioterio de la Unidad de Animales Transgénicos de Experimentación del Instituto Pasteur de Montevideo para la obtención de células inflamatorias de cavidad peritoneal y para la generación de macrófagos derivados de médula ósea (BMDM), respectivamente. Adicionalmente, se utilizaron hembras Balb/c de la misma edad pero criadas en la División de Laboratorios Veterinarios "DILAVE Miguel C Rubino" para los experimentos *in vivo*. Todos los protocolos empleados obtuvieron la aprobación de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA, UdelaR): protocolos 538, Exp. N° 101900-000999-17 y 542, Exp. N° 101900-000972-17.

2.2. Líneas celulares y métodos para la obtención y cultivo de células primarias

2.2.1. Medios de cultivo

Para los cultivos celulares se utilizaron los medios de cultivo RPMI (RPMI 1640 suplementado con L-glutamina 2 mM, bicarbonato de sodio 1.5 g/L, hepes 10 mM, ácido pirúvico 1 mM y AbAm 1%) y DMEM (DMEM suplementado con-glutamina 2 mM, bicarbonato de sodio 3.7 g/L, hepes 10 mM y AbAm 1%). También se emplearon los medios Schneider y XPress (Gibco #21720-024 y Lonza #BE12-730Q, respectivamente), suplementados con streptomicina 50 µg/mL, penicilina 50 U/mL. Adicionalmente, al medio XPress se le agregó puromicina 6 µg/mL. Para obtener medios de crecimiento celular, a los que denominaremos medios completos, se adicionó SFB. En general se utilizó 10% (v/v) de SFB (excepto al XPress) salvo que se indiquen cambios.

Para los cultivos de bacterias *E. coli* BL21 se utilizó medio LB agar y LB líquido (Sigma Aldrich) conteniendo kanamicina 40 µg/mL y glucosa 4%.

2.2.2. Línea premonocítica humana THP-1

Se utilizó la línea celular THP-1 (TIB-202, American Type Culture Collection -ATCC-, EEUU), disponible en la sección Inmunología. Se descongelaron rápidamente (en baño a 37°C con agitación) alícuotas correspondientes a generaciones bajas (G 4-8, 5.0-7.0x10⁶ células congeladas en medio RPMI completo conteniendo 10% DMSO) y se lavaron dos veces con RPMI completo centrifugando 10 minutos a 350 g cada vez. Los cultivos se mantuvieron en frascos de cultivo T-25 (Greiner, #690160) con medio RPMI completo a 37°C y en atmósfera húmeda con 5% de CO₂,

siguiendo el protocolo descripto por ATCC. Se sub-cultivaron cada 3-4 días para mantener la densidad del cultivo entre 0.2 y 1.0×10⁶ cél/ml y se amplificaron en frascos de cultivo T-75 (Greiner #658170) para los experimentos. Para la diferenciación a macrófagos los pre-monocitos se estimularon con 50 ng/mL de PMA en RPMI-5% SFB por 48 o 72 horas (se indica en cada experimento). Cuando se emplearon 48 horas, se realizó un posterior cambio de medio, dejando a las células en RPMI completo (5% SFB) por 24 horas adicionales.

2.2.3. Línea de macrófagos murinos J774

Se utilizó la línea J774A.1 (TIB-67, ATCC). El cultivo de éstas células se mantiene de forma constante en el laboratorio del Grupo de Bases Metabólicas del Riesgo Cardiovascular (Instituto de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, España). Su cultivo se practicó siguiendo el protocolo descripto por ATCC. Brevemente, las células se cultivaron en frascos T-75 (Corning #430641) con medio RPMI completo a 37°C y en atmósfera húmeda con 5% de CO₂, y se subcultivaron cuando alcanzaron un 80-90% de confluencia. Para ello, se quitaron dos tercios del medio de cultivo, se despegaron las células con un rastrillo y finalmente se diluyó la suspensión celular al tercio en medio RPMI completo.

2.2.4. Línea de hepatocitos HepG2

Se utilizó la línea HepG2 (HB-8065, ATCC), disponible en la sección Inmunología. Se descongelaron rápidamente (en baño a 37°C con agitación) alícuotas correspondientes a generaciones bajas (G 4-6.5-7.0x10⁶cél/mL, congeladas en medio RPMI completo conteniendo 10% DMSO) y se lavaron dos veces, con DMEM completo, centrifugando 10 minutos a 350 g cada vez. Los cultivos se mantuvieron en frascos de cultivo T-25 (Greiner) con medio DMEM completo a 37°C y en atmósfera húmeda con 5% de CO₂, siguiendo el protocolo descripto por ATCC. Se sub-cultivaron cada 3 días cuando alcanzaron 80-90% de confluencia; se quitaron 2/3 del medio de cultivo, se despegaron las células con un rastrillo y se amplificó diluyendo la suspensión celular al tercio en medio DMEM completo nuevo. Se amplificaron en frascos de cultivo T-75 (Greiner) para los experimentos.

2.2.5. Macrófagos derivados de médula ósea de ratón (BMDM)

La obtención de BMDM se realizó, como ya se comentó, siguiendo el protocolo N° 538 (Exp. N° 101900-000999-17) avalado por la CHEA-UdelaR. Los progenitores de médula ósea se diferenciaron con M-CSF, utilizando como fuente de este factor de crecimiento el sobrenadante de cultivo de la línea celular de fibroblastos L929³⁶⁵.

Se partió de un cultivo de células L929 (ATCC, EEUU). Las células se cultivaron a 37°C y en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ en medio DMEM completo. La línea se expandió sub-cultivando las células cada vez que alcanzaron la confluencia. Para la producción del sobrenadante de L929 como fuente de M-CSF, se sembraron varios frascos de cultivo T175 en paralelo (Greiner, #661160), recuperando el sobrenadante y agregando DMEM completo fresco cada 3 días. El sobrenadante se centrifugó 5 minutos a 350 g para descartar restos celulares y la fracción soluble se conservó a -80°C. Se repitió este procedimiento hasta que comenzó a despegarse la monocapa de células. En ese punto, se mezclaron todos los sobrenadantes obtenidos, se filtraron con filtros de 0.22 µm y se titularon. La titulación consistió en la producción de BMDM en presencia de distintos porcentajes del sobrenadante de L929 (5, 10, 15 o 20%), con el fin de determinar la concentración óptima de

uso como aquella que permitió obtener la mayor cantidad de BMDM (mayor rendimiento). De acuerdo con la concentración óptima de uso (15% del sobrenadante de L929) se prepararon alícuotas del sobrenadante que se conservaron a -80°C.

Para la producción de BMDM los ratones Balb/C se sacrificaron mediante el anestésico inhalatorio isofluorano. Se practicó una disección de sus patas para recuperar las tibias y los fémures. Los huesos se limpiaron con etanol 70% (v/v) utilizando papel absorbente y se colocaron en una placa de Petri con medio DMEM bajo cámara de flujo laminar. Para extraer la médula ósea se cortaron las epífisis de los huesos y se perfundió el canal medular de cada hueso con 3 mL de medio DMEM, utilizando una jeringa estéril con aguja 24G. Se rompieron los agregados celulares mediante pipeteo suave y la suspensión obtenida se centrifugó por 10 minutos a 350 g y 18°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 10 mL de DMEM para el conteo. Se plaquearon 5x10⁶ células por placa de Petri estériles (10 cm, Greiner #633181) en 15 mL de medio DMEM completo conteniendo 15% (v/v) del sobrenadante de cultivo de L929. Al quinto día se realizó un cambio de medio (las células en diferenciación ya son adherentes). Los macrófagos se cosecharon al séptimo día de cultivo por despegado mecánico mediante pipeteo utilizando PBS conteniendo EDTA 3 mM y glucosa 0.1%. Se obtuvieron entre 7 y 12x10⁶ células por placa de cultivo.

2.2.6. Determinación de la concentración y viabilidad celular

El conteo del número de células viables se realizó en cámara de Neubauer utilizando una dilución del cultivo que permitiera contar entre 25 y 75 células por cuadrante de la gradilla grabada en la cámara, con el agregado de tripán blue como marcador de viabilidad.

2.3. Material parasitario

Se dispuso de hidátides fértiles y no fértiles colectadas en frigoríficos a partir de los hígados y pulmones de animales infectados. Se colectó LH sólo de vísceras sin signos de putrefacción y quistes turgentes, con paredes gruesas, íntegras y blanquecinas. El material de origen bovino se obtuvo localmente (Frigorífico Urexport) y el suino en Argentina (donado gentilmente por La Dra. Mara Rosenzvit). El LH se extrajo mediante punción aséptica y se conservó a -20°C con el adicionado de EDTA 5 mM γ BHT 20 μM para evitar la oxidación de lípidos. Para el caso de los estudios proteómicos también se colectaron los PE de las hidátides fértiles, a partir de los cuales se obtuvo información del genotipo mediante la amplificación y secuenciación de un fragmento de la subunidad 1 de la enzima mitocondrial citocromo c oxidasa 1 (realizado por la Dra. Marcela Cucher de la Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina). Esta información mostró que los pooles bovinos pertenecieron mayormente al genotipo G1 de E. granulosus s.s., aunque también se detectaron hidátides del genotipo G3 y G5 (E. ortleppi). Concretamente para el análisis proteómico cuantitativo el pool bovino utilizado provino de 20 hidátides pertenecientes a E. granulosus s.s. (n=18 y n=2 para los genotipos G1 y G3, respectivamente) y de 3 hidátides pertenecientes a E. ortleppi (genotipo G5). El pool de origen porcino fue, en su totalidad, del genotipo G7 de E. canadensis (n=24). Adicionalmente se solubilizó con agentes disociantes un pool de PE proveniente de 15 muestras biológicas.

2.4. Obtención de preparaciones de EgAgB

Los protocolos de obtención del EgAgB se fueron perfeccionando en el transcurso de este trabajo sumando una serie de cuidados con la finalidad de evitar contaminación de las fracciones purificadas. En este sentido, se utilizó material estéril de vidrio, soluciones preparadas con agua apirógena (ICU-VITA), filtradas por 0.22 µm y suplementadas con EDTA, BHT y AbAm (EgAgB_{AbAm}) y se trabajó en cámara de flujo laminar (en aquellas etapas que lo permitieron).

2.4.1. Puesta a punto de una nueva metodología para la purificación del EgAgB nativo por cromatografía de intercambio iónico y ultracentrifugación en gradiente de densidad

El EgAgB nativo se purificó a partir de pooles de LH de entre 5 y 25 hidátides (fértil o no fértil según se indique), completando un volumen aproximado de entre 0.7 y 2.5 L. En primer lugar el LH se clarificó mediante centrifugación a 7800 rpm durante 20 minutos a 4°C (Sorvall RC 6 Plus, Thermo) seguido de filtración por membranas de 0.45 µm. Para su fraccionamiento, se realizó un primer paso de cromatografía de intercambio iónico en un equipo FPLC System (Pharmacia Biotech) que permite obtener una fracción enriquecida en las proteínas parasitarias y eliminar la seroalbúmina bovina y las inmunoglobulinas del hospedador presentes en el LH¹⁹³. Para ello, se empleó la resina aniónica Q-Sefarosa (GE Healthcare Life Sciences) empaquetada en una columna de 40 mL de lecho y equilibrada en una solución amortiguadora fosfato 20 mM pH 7.2, conteniendo NaCl 0.2 M, EDTA 5 mM, BHT 20 μM γ AbAm 1%. Se aplicó el LH a la columna a un flujo de entre 0.5 y 1 mL/min y posteriormente se lavó con la solución amortiguadora de equilibrio hasta que la absorbancia a 280 nm (Abs₂₈₀) a la salida de la columna fue menor a 0.05. La fracción retenida (QS_f,) se eluyó de la columna aumentando la fuerza iónica de la solución amortiguadora hasta alcanzar NaCl 0.60 M, utilizando un flujo de 1 mL/min y siguiendo la coloración amarilla del eluato. Luego, QS_f se dializó contra PBS conteniendo EDTA 5 mM, BHT 20 μ M y AbAm 1% (PBS_{F-R-} Abam) diluido 10 veces, lo cual permitió concentrarla (10 veces) en un equipo SpeedVac Concentrator (Savant, Thermo Fisher Scientific). Este paso de concentración se efectuó para adecuarnos a los volúmenes óptimos para realizar la ultracentrifugación en nuestro laboratorio (inicialmente este procedimiento se llevaba a cabo en tubos de mayor volumen en Facultad de Ciencias); permitió también intensificar la coloración de la preparación facilitando su visualización al momento de recuperar la fracción Ldf del tubo de ultracentrífuga. Posteriormente, QSf se fraccionó en un gradiente de densidad de KBr, aplicando una metodología basada en la obtención de lipoproteínas plasmáticas³⁶⁶. Para ello, se agregó KBr a una concentración de 0.49 g/mL a la fracción QS_f y una vez que se disolvió completamente la sal se transfirió la solución a un tubo de ultracentrífuga de 5 mL. En la parte superior del tubo se agregó una solución conteniendo NaCl 0.15 M, KBr 0.05 g/mL, AbAm 1%, de forma cuidadosa para evitar que se mezcle con la solución inferior, y se centrifugó a una velocidad de 245.000 g durante 5 horas a 4°C en una ultracentrífuga (Sorval mX 120, Thermo). Una vez transcurrido este tiempo, la fracción de EgAgB apareció como una banda de color amarillo (debido a la presencia de lípidos en el EgAgB), posicionada en el tubo de acuerdo a su densidad, mientras que el resto de las proteínas se concentraron en el fondo del tubo. Se aspiró la banda coloreada, se transfirió a un tubo de vidrio y se realizaron dos rondas adicionales de ultracentrifugación en forma sucesiva (UC1 y UC2). Finalmente, el KBr se eliminó utilizando una columna de desalado PD10 (#17-0851-01, GE Healthcare) equilibrada PBS_{F-B-AbAm}. Las fracciones de EgAgB obtenidas se preservaron en frascos de vidrio estériles y bajo atmósfera de nitrógeno a 4°C durante un tiempo máximo de uso, no mayor a los 3 meses.

2.4.2. Obtención de preparaciones de EgAgB para su uso en ensayos funcionales

Las preparaciones de EgAgB nativo obtenidas siguiendo la metodología descripta en 2.4.1 no fueron adecuadas para evaluar sus efectos sobre las células innatas por la presencia de trazas de contaminantes tipo pirógenos (particularmente LPS), pese a la serie de cuidados tomados durante el protocolo de purificación (ver sección 5.1). Apuntando a mejorar la pureza de la preparación de EgAgB se planteó producir anticuerpos monodominio de llama (VHH, conocidos como nanoanticuerpos o nanobodies) anti-EgAgB8/1 para sumar un paso final de cromatografía de inmunoafinidad al protocolo de purificación descripto en 2.4.1. Por otra parte, como una alternativa al uso del EgAgB nativo, se abordó la producción de la forma recombinante del EgAgB8/1 en células eucariotas (*Drosophila melanogaster*).

2.4.2.1. Preparación de anticuerpos monodominio de llama (VHHs) anti-EgAgB8/1 y su uso en la purificación del EgAgB nativo por cromatografía de inmunoafinidad

Esta actividad se realizó en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Gualberto González (Inmunoquímica, Área Inmunología, Facultad de Química). Para tal objetivo el Dr. Andrés González llevó adelante un protocolo de inmunización de las llamas por vía subcutánea, utilizando en la primera y segunda inoculación (priming y booster, respectivamente) 400 µg de EgAgB nativo en presencia del Adyuvante Incompleto de Freund (AIF). Tres semanas luego de la última dosis se recolectaron 150 mL de sangre del animal a partir de la cual se generó una biblioteca en fagos filamentosos procediendo tal como se describe en³⁶⁷ (realizado por el Lic. Diego Pérez). Posteriormente, la Lic. Romina Alvez seleccionó los fagos que expresaban el VHH específico contra EgAgB8/1, los tituló, amplificó y clonó en el vector de expresión pINQ-H6HA (esquema disponible en la Figura S2.1 A), una versión derivada del vector pET28a(+) (Novagen) que presenta una cola de 6 Histidinas y un dominio hematoglutinina³⁶⁸. Los 9 clones obtenidos fueron secuenciados para evaluar la variabilidad de las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs, del inglés complementarity determining regions) entre ellos y la presencia de lisinas (residuos relevantes para la inmovilización en matrices). Además se evaluó su interacción con las subunidades EgAgB8/1, EqAgB8/2 y EqAgB8/3, donde 5 de los 9 clones unieron únicamente EqAgB8/1 (los restantes no exhibieron interacción con ninguna subunidad). Considerando estos datos y la expresión de las clonas en forma soluble se seleccionó el clon 1, cuya secuencia se muestra en la Figura S2.1 B. La especificidad de la columna conteniendo VHHs anti-EgAgB8/1 se confirmó por Western blot de la fracción eluída, utilizando medio del hibridoma de ratón conteniendo el anticuerpo monoclonal Mo-EB7 y revelando con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Figura S2.1 C, adaptada de³⁶⁸). A partir de este punto, realicé los pasos de expresión y purificación de los VHH anti-EgAgB8/1.

2.4.2.1.1. Expresión de los VHHs anti-EgAgB8/1

Se transformaron 30 µL de células electrocompetentes *E. coli* BL21 con 100 ng de ADN plasmídico, en cubetas de electroporación de 0.2 mm (Sigma-Aldrich). Las células se plaquearon en placas conteniendo medio LB agar (Sigma Aldrich) conteniendo kanamicina y glucosa y se incubaron por una noche. Se recogió con 3 mL de LB líquido la totalidad de las colonias de la placa en la que las mismas se presentaban más separadas y de mayor tamaño, agregando la cantidad necesaria de esta suspensión de células a 500 mL de LB líquido conteniendo kanamicina y glucosa. Cuando el cultivo alcanzó una DO 600 nm inicial = 0.5 UA se realizó la inducción con 3 µM de IPTG (Gold



Figura 2.1. El lisado de las bacterias por shock osmótico permitió obtener una preparación más pura del VHH anti-EgAgB8/1. Las bacterias BL21 transformadas con el vector de expresión del VHH anti-EgAgB8/1 e inducidas con IPTG se lisaron por shock osmótico o sonicación. El VHH anti-EgAgB8/1 se purificó por cromatografía de afinidad por Ni²⁺ (Ni-NTA utilizando para la elución un gradiente de imidazol (40 a 500 mM). Las fracciones eluídas a distintas concentraciones de imidazol (f1 a f6) se analizaron por SDS-PAGE (15% acrilamida) en paralelo con un marcador de peso molecular (MPM), y se revelaron por tinción con Coomasie G. El VHH anti-EgAgB8/1 producido mostró un tamaño compatible con una masa molecular esperada en el entorno de 20 kDa que presentó mayor pureza cuando se lisaron las bacterias por shock osmótico.

biotechonology) durante toda la noche a 37°C y con agitación (250 rpm). Finalizada la incubación las bacterias se cosecharon por centrifugación a 6000 g durante 15 minutos a 4°C. A partir de aquí junto con la Lic. Sofía Lagos (Área Inmunología, Facultad de Química/Facultad de Ciencias, UdelaR) se ensayaron dos estrategias para el lisado de las bacterias, buscando determinar cuál arrojaba mejor rendimiento. Por un lado, el pellet celular se resuspendió en 10 mL de PBS y se sometió a sonicado (15 minutos, pulso al 50% y potencia 60%). Por otro lado, el pellet se sometió a lisis osmótica incubando con solución TES (conteniendo Tris-HCL 0.2 M, sacarosa 0.5 M, EDTA 0,5 mM, pH 8.0). Posteriormente se centrifugó a máxima velocidad por 20 minutos a 4°C. La centrifugación se repitió el número de veces necesaria hasta la obtención de una solución translúcida. Se recolectó el sobrenadante y se filtró por 0.22 nm, obteniéndose así los VHHs expresados en forma soluble. Luego se realizó la purificación del VHH anti-EgAgB8/1 por cromatografía de afinidad. Dada la presencia en los vectores pINQ de una cola de histidinas, la purificación de los VHH se realizó mediante la utilización de una columna Ni-NTA (GE Healthcare) en el equipo AKTA purification system (GE Healthcare). A la fracción a purificar, previo a su inyección en la columna, se le agregó imidazol a una concentración final 20 mM, para igualar la concentración que presentaba la solución A en la que se encontraba equilibrada la columna. Tras la inyección de la muestra en el eguipo, se realizó un primer lavado con 5 mL de la solución A (20 mM imidazol), y luego se eluyó el VHH utilizando mayor concentración de imidazol. Para esto, se agregaron 5 mL de 40 mM de imidazol (3% de la solución B conteniendo 500 mM imidazol en solución A) seguido de 5 mL de 50 mM de imidazol (6% de solución B en solución A). Para la elución total del VHH se aplicó a la columna 5 mL de solución B). Todo el proceso de purificación se monitoreó mediante espectrofotometría a 280 nm. El pico observado en el perfil de elución (Abs₂₈₀) se dializó en 2 L de solución de conjugación (NaHCO₃ 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH 8.3-8.5) durante 48 horas con cambios de solución luego de transcurridas las primeras 4 horas y a las 24 horas. Una vez dializada la fracción se estimó su contenido proteico por medida de la Abs₂₈₀ utilizando el equipo NanoDrop1000 spectrophotometer (ThermoFisher) y el blanco correspondiente. Las diferentes fracciones obtenidas durante el proceso de purificación (f1-f6) se visualizaron por SDS-PAGE; se cargó el volumen máximo (20 µL) de todas las fracciones. Tal como se muestra en la Figura 2.1 el VHH anti EgAgB8/1 eluyó a partir de una concentración 35 mM de imidazol (3% de solución B). El método de lisis osmótica dio mejor resultado, obteniendo un producto más puro (y similar concentración, aprox. 16 mg por litro de cultivo). En base a estos resultados se realizó una producción a gran escala, lisando las bacterias cosechadas luego de la inducción. Esta producción permitió obtener 30 mg de VHH anti-EgAgB8/1 a partir de un litro de cultivo.

Finalmente, se inmovilizó el VHH anti-EgAgB8/1 sobre una matriz de Sefarosa (utilizando Sefarosa activada con CNBr y siguiendo las recomendaciones del fabricante, GE Healthcare #17-0430-01). Brevemente, se incubó el VHH anti-EgAgB8/1 con la matriz (activada previamente con 15 mL de HCl 1 mM frío y equilibrada en solución amortiguadora de conjugación conteniendo NaHCO₃ 0.1 M y NaCl 0,5 M a pH 8.3) a una relación de 10 mg/mL durante toda la noche a 4°C y con agitación. Transcurrido este tiempo se bloqueó la unión intercalando lavados con 3 mL de ácido acético/acetato de sodio 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH 4.0 y de Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.5 M, pH 8.5 (6 repeticiones sucesivas). Se obtuvo un ~99% de rendimiento en el acoplamiento de los VHHs a la matriz. La columna generada se utilizó para realizar un paso final en el proceso de purificación del EgAgB. Se dividió en dos partes iguales (~1.5 mL cada una) para ser utilizada para el EgAgB nativo y rEgAgB8/1 (ver sección 2.2.2.2) exclusivamente. Referente a la inmunopurificación del EgAgB nativo, la matriz se equilibró con 30 mL de PBS_{E-B-AbAm} (20 volúmenes de columna, VC) y se aplicó la fracción EgAgB_{AbAm} (se observó la coloración en la matriz para evaluar saturación de la unión del EqAgB nativo que se verificó luego en base a la cuantificación proteica de las distintas fracciones colectadas). Luego se realizaron pasos de lavado, inicialmente con alta fuerza iónica (PBS conteniendo NaCl 1 M, 5 VC) y luego con PBS (10 VC), con el objetivo de remover todo aquello que no presentara una fuerte interacción con los VHHs inmovilizados. La elución se realizó con glicina 0.1 M ensayando diferentes pH; a pH 4.0 y 5.0 (2 VC) no hubo elución pero a pH 2,5 se obtuvo una fracción amarillenta, indicando la presencia de EgAgB nativo, que denominamos EgAgB inmunopurificado (EqAgB_{IP}). El eluato se llevó a la solución amortiguadora PBS_{F-B-AbAm} utilizando una columna de desalado PD10 en cámara de flujo laminar. Para su conservación, EgAgB_{IP} se gaseó bajo corriente de N_2 (g) para evitar la oxidación de los lípidos y conservó a 4°C (nunca se excedieron los 3 meses de almacenamiento). El rendimiento de la columna fue de aproximadamente 2 mg de EgAgB por ml de gel, del mismo orden que el obtenido en un estudio preliminar por la Lic. Alvez³⁶⁸. Consideramos se trata de un rendimiento muy bajo sobre la base de la capacidad teórica de la columna y considerando una relación 1:1 entre la unión del el VHH y el EgAgB.

2.4.2.2. Expresión y purificación de rEgAgB8/1 en la línea celular S2 de D. melanogaster

Esta actividad se realizó en el Laboratorio de Inmunovirología del Instituto Pasteur, en colaboración con los Dres. Otto Pritsch, Martín Fló y el MSc. Federico Carrión.

2.4.2.2.1. Clonado de EgAgB8/1

Se utilizó un vector diseñado por Correa y colaboradores³⁶⁹ en base a modificaciones del vector pMT/BiP/V5-His (Figura S2.2), utilizado frecuentemente para la expresión en D. melanogaster, esquematizado en la Figura 2.2 A. Las modificaciones en este vector incluyeron la incorporación de un tándem de dos secuencias con afinidad por la estreptavidina (Strep-Tagx2) y de dos fragmentos de ADN, o cebadores genéricos flangueando la secuencia correspondiente al gen inserto (en este vector este gen correspondió a una proteasa del virus de la leucosis bovina, BLVp, Figura 2.2). El uso de cebadores genéricos permite transferir el gen inserto en este sitio a otro vector de expresión circular con estos cebadores, sin importar cuál sea el gen de interés y sin necesidad de usar enzimas de restricción (esta estrategia se conoce como restriction free (RF)-cloninq³⁷⁰). Además, el vector posee la secuencia de secreción BiP correspondiente al péptido señal de la proteína de estrés término HSP72 (del inglés, heat shock protein) de D. melanogaster que permite conducir las proteínas a la vía secretoria. El péptido codificado por la secuencia BiP conduce las proteínas a la vía secretoria, por lo que la proteína recombinante se obtiene en el sobrenadante de cultivo, lo que facilita su purificación. La secuencia BiP es cortada por la maguinaria celular antes que la proteína sea secretada³⁷¹. En el sistema utilizado, la proteína recombinante se expresa bajo el control del promotor de la metalotioneína, lo que permite inducir la expresión por agregado de CdCl₂³⁷².

Primero se seleccionó la secuencia nucleotídica de EgAgB8/1 (EGR_06805, https://parasite.wormbase.org, https://www.uniprot.org, Figura 2.2 B) y se optimizó para su expresión en D. melanogaster con el programa de GenScript. Se diseñó entonces la construcción para el clonado y expresión del EgAgB8/1 adicionando a esta secuencia en sus extremos las secuencias de los cebadores genéricos directo (CD) y reverso (CR) que hibridizan con los cebadores genéricos en el vector de destino pMT/BiP/V5-His modificado (Figura 2.2 A). Además, al final de la secuencia correspondiente al CD se ubicó un sitio de corte de la proteasa TEV que permite separar a la proteína EgAgB8/1 del tag mediante corte con esta proteasa (en caso de ser necesario). Por otra parte, en el extremo 3' del cebador genérico reverso se agregó el codón de terminación o stop "TAA" para indicar el fin de la traducción, inmediatamente después de la secuencia de EqAqB8/1. La construcción diseñada se muestra en la Figura 2.2 B fue proporcionada por el laboratorio GenScript.

Para el clonado por RF cloning se llevó a cabo una primera PCR buscando amplificar la construcción de GenScript conteniendo la secuencia codificante de *EgAgB1* acoplada a los cebadores genéricos. La mezcla de reacción se preparó con MgCl₂ 50 mM, dNTPs 200 nM, cebador directo 0.5 µM y cebador reverso 0.5 µM, ADN polimerasa Taq 20 U/mL y entre 20 ng de molde, en amortiguador *Phusion HF*. El ciclo de amplificación consistió en una separación inicial de las hebras de ADN a 98°C durante 30 minutos, luego de lo cual se realizaron 30 ciclos de: desnaturalización de 10 segundos a 98°C, hibridación durante 30 segundos a 65°C y extensión o replicación durante 1 minuto a 72°C. Para la replicación final se mantuvo la temperatura a 72°C durante 5 minutos. El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa 1% p/v. La electroforesis se realizó en una cuba horizontal HE 99x (Amersham Biosciences), a 150 V, en amortiguador TAE (Tris-base 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM, pH 7.5) y a temperatura ambiente. Las muestras se prepararon con solución amortiguadora muestra 6X y el ADN se tiñó con bromuro de etidio. Una vez finalizada la corrida el gel se visualizó en un transiluminador UV (Gel Logic). Se estimó el tamaño molecular de los productos obtenidos comparando con un marcador (rango 100

a 2000 pares de bases), que se corrió junto a las muestras. A partir de este gel se purificó el fragmento de ADN amplificado (amplicón).



(D)

Producto proteico rEgAgB8/1₅₂ (en base a la secuencia U6JQF4_ECHGR) SMRFCLLLALALVSFVVVTQADDGLTSTSRSVMKMFGEVKYFFERDPLGQKVVDLLKELEEVFQLLRKKLRMALRSHLRGLIAEGE

Figura 2.2. (A) Representación esquemática de la construcción pMT/BiP/V5-His modificada empleada para la expresión de EgAgB8/1 en *D. melanogaster*. BiP: péptido señal para la exportación fuera de la célula; Strep-Tagx2: péptido con afinidad por la estreptavidina; BLVp: proteasa del virus de la leucosis bovina, CD y CR: cebadores genéricos directo y reverso, respectivamente. (B) Secuencia nucleotídica correspondiente a la construcción utilizada para el clonado del EgAgB8/1. Se utilizaron los colores verde y naranja para los CD y CR, respectivamente, y negro para la secuencia del EgAgB8/1 (EGR_06805, <u>https://parasite.wormbase.org, https://www.uniprot.org</u>). Además, se indican en rojo los nucleótidos agregados: TCC correspondiente al residuo de serina que forma parte del CD y queda en la proteína tras el corte con la proteasa TEV y TAA correspondiente al codón *stop*. Se representa esquemática esta construcción. (C) Esquema explicativo de las reacciones de PCR para el clonado por *RF-cloning*. (D) Secuencia aminoacídica del EgAgB8/1 (UGJQF4_ECHGR, <u>https://www.uniprot.org</u>) correspondiente al producto expresado por el vector diseñado, luego del corte con la TEV.

Posteriormente, se realizó la segunda PCR (en iguales condiciones que la primera pero con 4 minutos de extensión a 72°C) en la cual el amplicón obtenido en la primera PCR, correspondiente a *EgAgB8/1* y los cebadores genéricos, se utilizó como cebador (megacebador) y el vector de expresión, donde se quería insertar la secuencia de *EgAgB8/1*, se usó como molde. De esta manera se buscó obtener como producto el vector para la expresión de la subunidad EgAgB8/1. El producto de la PCR se incubó con Dpnl (Thermo) por 1.5 horas a 37°C para degradar el vector parental metilado y posteriormente por 20 minutos a 80°C para su inactivación.

Con el producto del *RF-cloning* (segunda PCR) se transformaron bacterias *E. coli* XL1 y se sembraron en medio LB agar con ampicilina. Dado que el vector de expresión confiere resistencia a la ampicilina, en presencia de este antibiótico se esperaba que sólo crecieran bacterias transformadas. A continuación, se corroboró qué colonias estaban efectivamente transformadas con el vector de expresión que contenía *EgAgB8/1* mediante PCR (en iguales condiciones que para la primer PCR), utilizando los cebadores genéricos y colonias únicas como molde y se verificó el tamaño del producto obtenido por electroforesis en un gel de agarosa (Figura 5.5 A). Finalmente se amplificaron colonias transformadas con el vector para la expresión en *D. melanogaster* (8 en total) en 50 mL de medio líquido LB ampicilina toda la noche y se extrajo el ADN plasmídico mediante una *midiprep* (se verificó su obtención en la Figura 5.5 B), utilizando el *QIAfilter Plasmid Midi Kit* (Qiagen). Se determinó la concentración de los vectores de expresión obtenidos por triplicado en un espectrofotómetro de gotas, a partir de la medida de la absorbancia a 260 nm (Abs₂₆₀). Se verificó la secuencia por secuenciación (Macrogen, Korea).

2.4.2.2.2. Expresión y purificación de rEgAgB8/1 en células de D. melanogaster

Las células S2 de D. melanogaster (disponibles en el laboratorio de Inmunovirología) se descongelaron a temperatura ambiente y se realizaron dos lavados con 10 mL de PBS cada uno. Luego se resuspendieron en medio Schneider completo e incubaron en estufa a 28°C, sin utilizar atmósfera de CO2 (las condiciones de incubación se mantuvieron durante todo el cultivo). Una vez que las células se recuperaron, el cultivo se llevó a una concentración de entre 1.0x106 y 2.5x106 células/mL, y se procedió a la transfección. Las células se transfectaron con 2 µg del vector de expresión para EgAgB8/1 y 0.1 µg del plásmido de selección pCoPURO (Invitrogen), que confiere resistencia a la puromicina, utilizando el kit para transfección de células eucariotas Effectene Transfection Reagent (Qiagen) y siguiendo el protocolo proporcionado por la empresa. Luego de la transfección, se procedió a adaptar el cultivo a la ausencia de suero aumentando gradualmente la dosis de medio XPress (sin SFB) y disminuyendo la concentración de medio Schneider completo

(con SFB 10%). En paralelo se enriqueció el cultivo en las células transfectadas mediante el agregado de puromicina, antibiótico de selección. El cultivo se expandió por pasajes 1:2 o 1:3 cada tres o cuatro días y luego de cuatro semanas desde la transfección, se verificó que las células efectivamente se hubieran transfectado. Para esto se tomaron 2 mL del cultivo, se cosecharon las células por centrifugación a 350 g durante 10 minutos y se verificó en el pellet la presencia del vector por PCR utilizando los cebadores genéricos. Se realizó también una reacción control en la que se empleó como molde el sobrenadante de centrifugación, a fin de verificar que se estuviera amplificando vector efectivamente incorporado a las células, y no vector todavía presente en el medio de cultivo. Además, se hizo una reacción de control positivo en la que se empleó como molde el vector de expresión para EgAgB8/1 (Figura 5.6). Una vez que se verificó que las células se transfectaron con el vector, se pasó el cultivo a un matraz, llevando la concentración de células a 3.5x106 células/mL y se incubó a una velocidad de agitación de entre 20 y 40 rpm, durante 10 días, en los cuales se expandió el cultivo por agregado de medio XPress completo, cada 2 o 3 días. Pasados los 10 días, el cultivo se llevó a 7x10⁶ células/mL y se indujo la expresión de la proteína con 5 μ M de CdCl2. Se estudió la expresión a tiempos de 4, 7 o 12 días. En todos los casos al tercer y quinto día luego de la inducción se agregaron 50 mL de medio XPress conteniendo 5 µM CdCl2. Al tiempo final se centrifugó la suspensión de células durante 20 minutos a 6000 g, se separó el sobrenadante y se ajustó su pH a 8.0 utilizando el amortiguador Tris 1 M pH 9.6 (1 mL cada 120 mL de sobrenadante). El sobrenadante se almacenó a 4°C durante toda la noche y al día siguiente se centrifugó durante 20 minutos a 6000 g para eliminar componentes no proteicos del medio de cultivo que precipitan al aumentar el pH. El sobrenadante clarificado se filtró por 0.45 y 0.22 micras. Se realizó un primer paso de purificación de la proteína recombinante por cromatografía de afinidad utilizando una columna de agarosa Strep-Tactin XT de 5 mL (IBA Life Sciences), equilibrada con la solución amortiguadora Tris 100 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, BHT 20 μ M, AbAm 1%, pH 8.0. La proteína se eluyó con 10 mL de biotina 25 mM en la solución amortiguadora. La fracción obtenida (rEgAgB8/1S2) se sometió a un paso final de cromatografía de inmunoafinidad utilizando la columna de Sefarosa acoplada a los VHH anti-EqAgB8/1, tal como se describió en la sección anterior. Finalmente, se realizó un cambio de la solución amortiguadora de disolución de la proteína por PBSE-B-AbAm utilizando una columna de desalado PD10 en cámara de flujo laminar. Para su conservación, el rEgAgB8/1S2 se gaseó bajo corriente de N2 (g) para evitar la oxidación de los lípidos y conservó a 4°C (nunca se excedieron los 3 meses de almacenamiento).

2.4.3. Control de concentración y calidad de las preparaciones de EgAgB

2.4.3.1. Determinación de la concentración

La determinación de la concentración de proteínas en las preparaciones se realizó mediante el kit comercial Micro BSA (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se dispuso 150 µl de diferentes diluciones de las muestras (1/40, 1/80 y 1/300 de las preparaciones de EgAgB nativo o rEgAgB8/1) del estándar (BSA, 2 a 40 µg/mL) en placa de microtitulación y se le agregó 150 µl de la mezcla de reactivos A, B y C en la relación 50:48:2. Se incubó la placa en baño húmedo a 37°C por 2 horas y posteriormente se midió la absorbancia a 560 nm (Abs₅₆₀) en un espectrofotómetro de placas. La concentración de proteína del EgAgB se determinó por interpolación en la curva de la calibración generada con los datos del estándar (Abs₅₆₀ vs concentración). Por otro lado, la estimación de la concentración proteica del LH y de sus fracciones
obtenidas durante la purificación del EgAgB (FT_{QS} , QS_f , Ld_f y Ld_f) se realizó mediante la medida de la Abs₂₈₀ en el equipo NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

2.4.3.2. Electroforesis de proteínas por SDS-PAGE y Western Blot

Las muestras se fraccionaron por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes con SDS (SDS-PAGE) siguiendo el protocolo de Laemmli³⁷³. Brevemente, se utilizaron geles concentradores y separadores de acrilamida de 1.5 mm de espesor al 4% (m/v) y al 15% (m/v), respectivamente. Las muestras se diluyeron en tampón de carga 6x (Tris-HCl 0.35 M pH 6.8, SDS 10%, glicerol 10%, conteniendo azul de bromofenol) en condiciones reductoras (DTT 40 μ M), y se calentaron por 10 minutos a 90°C previo a ser sembradas. La corrida se realizó usando una solución tampón de corrida (Tris 0.3% (m/v), glicina 1.44% (m/v), SDS 0.1% (m/v)) en el sistema Mini Protean 3 (Bio-Rad), aplicando entre 25-35 mA durante toda la corrida (~45 minutos). Se estimó el peso molecular de los componentes de las muestras comparando con el marcador de peso molecular de rango 6.5 a 200 KDa (Sigma, #S8445) o el marcador pre-teñido de rango 10 a 180 KDa (Thermo, #26616), que se corrió junto a las muestras. Para la visualización de las proteínas, los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250 por inmersión en una solución del colorante (0.1% p/v en solución fijadora: metanol 40% v/v, ácido acético 10% v/v) durante toda la noche y se destiñeron con una solución de ácido acético 7% v/v y etanol 5% v/v, durante todo el día. Para analizar por Western Blot la presencia del EgAgB, las proteínas separadas en el gel de poliacrilamida se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore-Merck, EEUU), utilizando el sistema de electro transferencia húmeda (Bio-Rad) y una solución tampón de transferencia (Trisbase 50 mM, glicina 380 mM, SDS 0.1 % (m/v), metanol 20% (v/v) durante toda la noche a voltaje constante de 56 V y 4°C. Las membranas se bloquearon con PBS-BSA 0.2% y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el Mo-EB7 anti-EgAgB. Luego de tres lavados con PBS conteniendo Tween 0,05% (PBS-T), se incubaron con el anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (1:2000, Calbiochem). Finalmente se realizaron 3 lavados con PBS-T y se procedió al revelado utilizando el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Thermo Fischer Scientific) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Para su registro se fotografiaron las membranas con un sistema de imagen (G:BOX, Syngene, India).

2.4.3.3. Electroforesis en geles nativos de poliacrilamida

Las muestras de EgAgB_{IP} y EgAgB_{S2} se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida nativos utilizando un gradiente de densidad 4-20% y el sistema Mini-PROTEAN TGX[™], (servicio ofrecido por el IRHSCSP en el marco de la colaboración con el Dr. Julve). Su realización en el IRHSCSP fue ventajosa porque posibilitó el análisis en paralelo plasma humano y murino, HDL humana (HDL-2 y HDL-3) y LDL humanas, toda purificadas mediante ultracentrifugación secuencial a partir de un pool de plasma. Esto hizo posible la comparación de la distribución de tamaño de las preparaciones de EgAgB con el de las lipoproteínas de dimensiones conocidas. Los geles se pre-tiñeron con negro Sudán para analizar la abundancia de lípidos y posteriormente se tiñeron con azul de Coomassie para el análisis de la abundancia proteica. La movilidad relativa de las lipoproteínas se evaluó con un Densitómetro ChemiDoc 2000 utilizando el software Quantity One (Bio-Rad Laboratories SA, Life Science Group).

2.4.3.4. Determinación del radio hidrodinámico del EgAgB por análisis de dispersión dinámica de la luz (DLS)

Se determinó el radio hidrodinámico (R_H) de las partículas de EgAgB obtenidas por DLS (del inglés, *Dynamic Light Scattering*) con la colaboración del MSc. Federico Carrión de la Unidad de Biofísica de Proteínas del Instituto Pasteur de Montevideo. Se colocaron 70 µl de EgAgB (nativo ó rEgAgB8/1) a una concentración de 1 mg/mL en cubeta descartable UVette y se realizaron tres medidas consecutivas a 25°C en el equipo Zetasizer NanoS (MALVERN, España). Este equipo determina la dispersión de la luz dinámica; mide la difusión de partículas en movimiento browniano, y convierte estos valores a una distribución de tamaños utilizando la relación de Stokes-Einstein. Además, mediante diferentes algoritmos se obtienen datos de la distribución de tamaños de la muestra tomando en cuenta sólo la intensidad de dispersión de la luz o corrigiendo esta intensidad por el volumen (ya que las partículas grandes dispersan luz con una intensidad mucho mayor). Las preparaciones de EgAgB obtenidas se analizaron periódicamente durante su vida útil (2-3 meses) para descartar la formación de agregados, derivados de la oxidación de la lipoproteína, que podrían afectar el tipo de interacciones que establece el EgAgB con las células. Adicionalmente, explorando una posible interacción entre el EgAgB y el LPS se realizaron medidas del radio hidrodinámico del LPS y mezclas de LPS y EgAgB en distintas proporciones.

2.4.3.5. Detección de endotoxinas bacterianas mediante el ensayo del lisado de amebocitos de *Limulus polyphemus* (LAL)

Se determinó la presencia de endotoxinas bacterianas en las preparaciones de EgAgB mediante el ensayo del LAL, realizado por el laboratorio Beltrán Zunino (Montevideo, Uruguay). En el formato comercial disponible, se obtienen resultados de presencia o ausencia en base a un valor de corte o umbral correspondiente a 0.03 unidades de endotoxina (UE)/mL, que equivalen a 0.003 ng/mL. Las preparaciones de EgAgB (nativo y recombinante) se analizaron en varias diluciones que permitieran establecer si, a la concentración utilizada en el ensayo, las muestras aportarían una concentración mayor que 0.01 ng/mL de LPS, que es un umbral 10 veces menor que la concentración reportada como suficiente para inducir una respuesta de citoquinas pro-inflamatorias en varios tipos de células mieloides³⁷⁴. Este umbral coincide con el hecho que el SBF certificado, que se comercializa como producto de calidad por su bajo nivel de endotoxina y se utiliza usualmente al 10%, contiene como máximo 1 UE/mL).

2.5. Identificación de las variantes apolipoproteicas y los ligandos hidrofóbicos del EgAgB nativo presente en diferentes estructuras y especies del metacestodo

2.5.1. Proteómica de la fracción QS_f

2.5.1.1. Identificación de las subunidades proteicas del EgAgB por electroforesis bidimensional y MALDI-TOF/TOF

Estos estudios se llevaron a cabo en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica del Instituto Pasteur de Montevideo. Se procedió tal y como se describe en el trabajo de Obal y colaboradores³⁷⁵ pero, para poder detectar las subunidades menos representadas, se sembraron 150 µg de proteína de la fracción QS_f en los geles bidimensionales. Las proteínas se identificaron en función de su valor m/z en los modos de adquisición MS y MS/MS utilizando MASCOT como

motor de búsqueda (Matrix Science, http://www.matrixscience.com) y el modo "Sequence Query". Para la identificación de las subunidades de EgAgB se realizó la búsqueda en la base de datos NCBInr (Abril 2016) y en una base de datos de *Echinococcus* creada por nuestro grupo tomando los siguientes parámetros: tolerancia de masa monoisotópica de 0.05 Da, tolerancia de fragmento de masa de 0.2 Da, carbamidometilación en cisteínas y oxidación de metioninas como modificaciones variables, tolerancia de la ausencia de hasta un corte tríptico y p < 0.05 para la estimación de un puntaje significativo. Además, las subunidades de EgAgB se identificaron en base a la presencia de al menos dos péptidos únicos con puntaje significativo (p < 0.05). La base de datos de Echinococcus creada por el grupo tomó en cuenta todas las secuencias de E. canadensis (genotipo G7, publicado http://parasite.wormbase.org en como echinococcus_canadensis.PRJEB8992.WBPS5.protein) y de E. granulosus s.s. (genotipo G1, publicado en www.genedb.org como EGU_proteins_29042013_products.fa) sumado a un total de 102 secuencias que incluían variantes polimórficas a nivel de los productos maduros así como productos ortólogos de otras especies de Echinococcus (disponibles en NCBInr). Adicionalmente, para poder estudiar la presencia de AgB8/2 en E. canadensis, se tuvo en cuenta la caracterización previa realizada a nivel de ADN y ARN para este gen¹², y se agregaron a la base de datos aquellas posibles proteínas generadas como consecuencia del corte y empalme (splicing) no-canónico de secuencias relacionadas con AgB8/2 de E. canadensis: EgB2G6v15 a EgB2G6v17, EgB2G7v15, EgB2G7v18 y EgB2G7v19, así como para el gen ECANG7_10984 (en todos los marcos abiertos de lectura, material suplementario S2.4).

2.5.1.2. Identificación de las subunidades proteicas del EgAgB por LC-MS/MS

El análisis de las fracciones QS_f por LC-MS/MS se inició en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica del Instituto Pasteur de Montevideo utilizando el equipo LTQ-Velos. Sin embargo, se obtuvieron datos preliminares porque, debido a averías en el equipo, se pudo realizar un único análisis de las muestras bQS_f y sQS_f careciendo de réplicas analíticas que le dieran solidez a los resultados. De todos modos la información generada se presenta en la sección 3.2.2.1, en base al índice de abundancia relativa denominado emPAI. Para completar el análisis de la fracción QS_f por LC-MS/MS se consiguió una pasantía en el Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, Center of Toxins, Immune-Response and Cell Signaling -CeTICS-, del Instituto Butantan en São Paulo, Brazil. En esta instancia se lograron realizar 5 réplicas analíticas para cada muestra.

Las proteínas se sometieron a reducción y carbamidometilación y posteriormente se digirieron con tripsina (Promega, apta para secuenciación, a una relación enzima/proteína total de 1:50) en una solución amortiguadora con bicarbonato de amonio 70 mM pH 8.0 conteniendo clorhidrato de guanidina 2 M por 12 horas a 37°C. Luego, la solución obtenida se concentró y desaló utilizando una micro-columna de fase reversa C18 (OMIX Pipette tips, Varian) y eluyendo los péptidos con ácido trifluoroacético (TFA) 0.1% en acetonitrilo:H₂O (60:40, v/v). Las mezclas de péptidos se secaron y resuspendieron en ácido fórmico 0,1% en acetonitrilo:H2O (5:95, v/v, solvente B). Se analizaron 5 µg de cada muestra por cromatografía líquida utilizando un EASY-nLC II nanoflow (Thermo Fischer Scientific, USA) acoplado a un espectrómetro de masa LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, USA). Las muestras se inyectaron en una columna trampa (I.D. 100 µm x O.D. 360 µm x 50 mm) empacada con beads Jupiter C18 10 µm (Phenomenex Inc., USA) para el desalado con 100% del solvente A (ácido fórmico 0.1%). Luego se fraccionaron los péptidos en una columna analítica (I.D. 75 µm x O.D. 360 µm x 100 mm) empacada con beads Aqua C-18 5 µm (Phenomenex Inc., USA) a un flujo de 200 nL/minuto utilizando un gradiente lineal de 60 minutos

conteniendo 5 a 35% del solvente B (ácido fórmico 0.1% en acetonitrilo). A continuación se aplicó un gradiente de 35 a 85% del solvente B para asegurar una elución completa. El nano-electospray se ajustó a un voltaje de 2.3 kV y una temperatura de la fuente de 250°C y el espectrómetro de masa operó en el modo de adquisición "data-dependent" donde se seleccionaron los diez iones precursores principales en cada ciclo para el evento de fragmentación. El tiempo de inyección de iones en la trampa fue de 1000 ms y el tiempo de inyección de FT-MS fue de 1000 ms con una resolución de 60000 en m/z 300-1800. Para los escaneos en la trampa de iones la fragmentación se realizó sobre iones por encima de un umbral de 200 conteos y se permitió la exclusión dinámica con un tamaño de exclusión de 500 durante 90 segundos, una duración de repetición de 30 segundos y un recuento de repeticiones de 1. El análisis de los archivos con los datos masivos sin procesar (.raw) se realizó con el programa MaxQuant (v.1.5.5.1) y su motor de búsqueda integrado Andromeda. Se identificaron las proteínas parasitarias y del hospedero mediante la búsqueda de datos de MS y MS/MS en una base fusionada que comprendía la base de datos de Echinococcus (creada como se mencionó anteriormente) y la base de datos de Bos Taurus/Sus scrofa (obtenida desde UniProt, Abril 2016). Se estableció la especificidad enzimática para la tripsina permitiendo un máximo de hasta 2 cortes faltantes, una tolerancia de 10 ppm para los iones precursores y de 0.5 Da para la masa de los iones fragmentados. En los espectros de MS/MS se incorporó la carbamidometilación de las cisteínas como modificación fija, y la oxidación de metioninas y la acetilación N-terminal de proteínas como modificaciones variables. La tasa máxima para falsos péptidos y proteínas se ajustó en 0.01 y se eliminaron aquellas proteínas que pareaban en forma inversa con la base de datos. El análisis estadístico para la identificación de proteínas se realizó utilizando el programa Perseus (v.1.4.0.11) en base a las intensidades de MS para péptidos únicos, la presencia de 2 péptidos únicos como mínimo y un PEP (probabilidad posterior de error) < 0.01. La abundancia relativa de cada subunidad proteica del EgAgB se cuantificó en base a la intensidad absoluta (iBAQ), un método que brinda el programa MaxQuant y resulta útil para cuantificar proteínas sin marca. En este algoritmo, la suma de todas las intensidades de los péptidos identificados se divide por el número teórico de péptidos trípticos y los valores se expresan en base log₂. Esta operación transforma una medida que se espera sea proporcional a la masa (intensidad) en una medida proporcional a la cantidad molar (iBAQ). Para determinar la abundancia relativa de cada subunidad del EgAgB se dividió el iBAQ correspondiente a cada subunidad por la suma de los valores de iBAQ obtenidos para todas las subunidades y la relación se expresó como porcentaje. Los resultados de las réplicas analíticas se unieron utilizando Perseus. Los valores de iBAQ, score y porcentaje de cobertura (%CO) para los distintos péptidos identificados se expresan como la media de 5 corridas (n=5). El número total de péptidos identificados para una proteína (PSM) también se estimó en base a la suma de las 5 corridas. Sólo se consideraron como identificadas aquellas proteínas que estuvieron presentes en al menos 3 de las 5 réplicas analíticas.

2.5.1.3. Detección de grupos carbonilo

La presencia de grupos carbonilo asociados a las subunidades de EgAgB se realizó utilizando el kit de detección de oxidación de proteínas $OxyBlot^{TM}$ (S7150, Millipore) con las modificaciones descritas anteriormente por³⁷⁶. Brevemente, las proteínas presentes en QS_f se electroenfocaron en un gradiente de pH de 3-10 (como se describe en³⁷⁵). A continuación, los grupos carbonilo de las cadenas laterales de las proteínas se derivatizaron a 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNPhidrazona) mediante la reacción con 2,4-dinitrofenilhidrazina. Posteriormente, las proteínas derivatizadas se

separaron mediante electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida SDS-PAGE (15%), seguido de Western Blot, utilizando anticuerpos específicos para DNP. Las imágenes se obtuvieron utilizando un equipo Image Scanner (GE Healthcare).

2.5.2. Estudio de los ligandos hidrofóbicos del EgAgB

2.5.2.1. Extracción de lípidos

La extracción de lípidos se realizó utilizando la técnica descripta por Folch²⁰⁵ con algunas adaptaciones. Este procedimiento se aplica ampliamente al análisis de lipoproteínas y tiene la ventaja de solubilizar todas las principales clases de lípidos utilizando una única mezcla de disolventes, aunque no permite recuperar el componente proteico. Brevemente, 2 mL de cada muestra se homogenizaron vigorosamente en tubos de vidrio con 10 mL de solución de Folch (cloroformo:metanol, 2:1, v/v) y se filtraron por gravedad sobre tubos de vidrio conteniendo 500 µL de NaCl 0.5 M para favorecer la separación de la fases orgánica y acuosa. La completa separación de fases se logró mediante centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos (Sigma 3.18KS). La fase superior o acuosa se descartó delicadamente por aspiración, mientras que la fase orgánica o inferior se transfirió a un tubo de vidrio limpio y se secó completamente bajo corriente de N2 (g). La masa obtenida se determinó utilizando una balanza analítica. Los lípidos obtenidos se disolvieron en cloroformo, se transfirieron a viales de vidrio, se gasearon con N₂ (g) para prevenir su oxidación y se conservaron a -20°C.

2.5.2.2. Análisis de lípidos por cromatografía en capa fina de alta resolución

Los lípidos extraídos empleando la técnica descripta anteriormente se analizaron mediante cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC), siguiendo un protocolo descripto previamente para el análisis de los lípidos nativos del EgAgB11. Para ello, se utilizaron las placas de HPTLC de gel de sílice TLC Silica gel 60 (Merck) de 20 x 20 cm pre-activadas a 100°C durante 30 minutos. Una vez que la placa se enfrió, los lípidos disueltos en cloroformo se sembraron cuidadosamente utilizando una microjeringa de 10 μL (Hamilton Company) a una distancia de 1 cm del borde inferior de la placa. La resolución de los lípidos se realizó empleando la técnica de doble desarrollo, que consistió, en una primera instancia, en dejar ascender la mezcla de solventes para resolver los lípidos polares hasta la mitad de la placa, permitiendo que los lípidos polares se separen, mientras que los lípidos neutros migran con el frente de corrida en la parte superior. En una segunda instancia, se dejó ascender la mezcla de solventes para resolver los lípidos neutros a través de la placa seca hasta una distancia de 1 cm del borde superior. En este caso los lípidos polares separados en la primera mitad de la placa no migran, mientras que en la otra mitad de la placa se logra la resolución de los lípidos neutros. Para la resolución de los lípidos polares se utilizó como fase móvil la mezcla de solventes acetato de metilo:isopropanol:cloroformo:metanol:KCl 0.25% (25:25:25:10:9, v/v/v/v/v), mientras que para la resolución de los lípidos neutros se utilizó hexano:éter etílico:ácido acético (80:20:1, v/v/v). Para una mejor resolución de los lípidos se utilizaron dos cubas de TLC, cada una saturada con la mezcla de solventes correspondiente a lípidos polares o neutros durante 30 minutos previos a la cromatografía. La detección de las especies lipídicas se realizó colocando la placa en una cuba saturada con vapores de yodo. La identificación de las distintas especies se basó en la comparación con una mezcla de estándares analizados en paralelo. Las imágenes de las placas se digitalizaron mediante un escáner convencional.

2.5.2.3. Lipidómica del EgAgB

Para profundizar en la composición lipídica las preparaciones de EgAgB nativo y rEgAgB8/1 se enviaron al laboratorio del Dr. David Watson (Strathclyde University, Glasgow-Reino Unido) para su análisis por HPLC-MS/MS. Para esto, se extrajeron los lípidos siguiendo el procedimiento descripto en 2.3.2.1 de las siguientes muestras:

- tres preparaciones de EgAgB nativo purificadas a partir de pooles de LH fértil por cromatografía sobre Q-Sefarosa seguida de ultracentrifugación; una muestra se obtuvo luego de la primera ultracentrifugación (EgAgBf-1^{ra} UC) y otra luego de dos rondas (EgAgB_F-2^{da} UC),
- una preparación obtenida a partir de LH no fértil por cromatografía sobre Q-Sefarosa seguida de ultracentrifugación (EgAgB_{NF}-2^{da} UC),
- una preparación de EgAgB nativo inmunopurificado (EgAgB_{IP}), sumando la cromatografía de inmunoafinidad a partir de la fracción enriquecida por la cromatografía sobre Q-Sefarosa, buscando evaluar si las metodologías afectan la composición de la partícula que se obtiene,
- una preparación de rEgAgB8/1_{S2}.

En una etapa inicial y exploratoria, para el análisis de las muestras de EgAgB_F y EgAgB_{NF} se utilizó una columna de gel de sílice ACE (3 mm, 6150 mm, 63 mm, HiChrom Reading U.K.) en la cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC). Se empleó como disolvente A 2-propanol 20% (IPA) en formiato de amonio 20 mM (v/v) y como disolvente B 20% IPA en acetonitrilo. Se aplicó a un volumen de inyección de 10 ml a un caudal de 300 µl/min, y los siguientes escalones y gradientes lineales: 90% B (0-5 minutos), a 70% B (9 minutos), a 65% B (13 minutos), a 60% B (23 minutos) a 55% B (28-30 minutos), a 90% B durante 31-40 minutos.

Para el análisis del segundo conjunto de muestras, EgAgB_F-1^{ra} UC, EgAgB_F-2^{da} UC, EgAgB_{IP} y rEgAgB8/1_{S2} se utilizaron dos métodos. Los lípidos polares se analizaron utilizando una columna af ZICpHILIC (150 x 4,6 mm, tamaño de partícula de 5 µm, Hichrom Reading, U.K) con una fase móvil de carbonato de amonio 20 mM en agua de grado HPLC (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B), a un caudal de 0,3 mL/minuto. El gradiente de elución se realizó con una relación A:B de 20:80 a los 0 minutos, 80:20 a los 30 minutos, 92:8 a los 30 minutos, 92:8 a los 35 minutos, 20:80 a los 36 minutos y 20:80 a los 45 minutos. Para estimar los ácidos grasos insaturados se utilizó una columna ACE C4. La fase móvil para la elución de esta columna fue ácido acético 1 mM en agua (A) y ácido acético 1 mM en acetonitrilo (B) a un caudal de 0,4 mL/minuto. El gradiente de elución en relación A:B fue 60:40 a los 0 minutos, 0:100 a los 30 minutos, 0:100 a los 36 minutos, 60:40 a los 37 minutos y 60:40 a los 41 minutos.

El sistema LC-MS constó de una bomba HPLC Dionex 3000 interconectada con un espectrómetro de masas Orbitrap Exactive utilizado en modo de conmutación positivo/negativo. El instrumento se calibró de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se operó a una resolución de 50.000. El voltaje de la aguja era de 4,5 kV en modo positivo y de 4 kV en modo de iones negativos, la temperatura del capilar calentado fue de 320°C y los gases de cubierta y auxiliares de 50 y 17 unidades arbitrarias respectivamente. Los datos se adquirieron usando Xcalibur 2.0 y los conjuntos de datos se extrajeron y alinearon usando m/z Mine 2.14.2 y se buscaron en una base de datos interna de metabolitos. Todos los metabolitos estaban dentro de las 5 ppm de sus masas exactas.

Cada muestra se analizó por triplicado. El procesamiento posterior de los datos se llevó a cabo utilizando Metaboanalyst 4.

A los efectos de visualizar los datos se promedió la intensidad (área del pico) de los metabolitos identificados en cada réplica analítica de cada muestra. Los metabolitos se ordenaron de mayor a menor en función de la intensidad, que guarda relación directa con la abundancia relativa dentro de cada muestra. Finalmente, los datos se presentan en formato de tablas, conteniendo los 50 metabolitos más abundantes para cada muestra junto con la relación m/z, tiempo de retención y fórmula molecular así como la relación de abundancia comparativa entre muestras. Adicionalmente, los resultados se representan separadamente para los ácidos grasos y fosfolípidos utilizando "mapas de calor" (conocidos como *heatmap*, en inglés), y realizados en la plataforma <u>www.heatmapper.ca</u>, a los efectos de visualizar similitudes y diferencias en el perfil lipídico entre las muestras según la escala de colores indicada.

2.6. Estudio de la interacción del EgAgB nativo con monocitos, macrófagos y hepatocitos

Para estos ensayos se utilizaron monocitos o macrófagos THP-1 2.2.2, y hepatocitos HepG2 preparados como se describió en las secciones 2.2.2 y 2.2.4, respectivamente, siguiendo un protocolo basado en trabajos anteriores³⁷⁷ pero con algunas modificaciones. En el caso de los monocitos las células se contaron directamente a partir de los frascos de cultivo empleando una cámara de Neubauer y se distribuyeron en una placa de 96 pozos de fondo cónico (deltalab, #900012.1, utilizando 0.5×10^6 células en un volumen final de 100 µL por pozo. En el caso de los macrófagos se partió de 0.75x10⁶ células diferenciadas con PMA por 72 horas. Transcurrido este tiempo los macrófagos se despegaron con PBS conteniendo EDTA 1 mM en frío, aspirando y dispensando 500 µL de la solución con micropipeta y tratando de producir el menor daño posible a las mismas. Se repitió este paso por lo menos dos veces y el despegado de los macrófagos se confirmó observando la placa al microscopio óptico. Los macrófagos obtenidos (aproximadamente 0.5x 10⁶) se mantuvieron en frío, se contaron y se transfirieron a una placa en las mismas condiciones que los monocitos. Así, la diferencia en el número de monocitos y macrófagos plaqueados inicialmente permite obtener al final suspensiones de similar concentración ya que aproximadamente la tercera parte de los macrófagos THP-1 se pierde debido al proceso de despegado de la placa.

Para los ensayos con hepatocitos HepG2, se despegaron del frasco de cultivo por incubación con Accutase (Thermo, #A1110501, por 10 minutos a 37°C), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se contaron y se transfirieron 0.5x10⁶ células a las placas en fondo cónico.

2.6.1. Análisis de la capacidad de unión del EgAgB nativo a monocitos y macrófagos THP-1 utilizando Mo-EB7

Una vez plaqueadas las células, se centrifugaron a 350 g y 4°C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en PBS conteniendo SFB 1% y NaN₃ 0.1% (PBS_{SFB-NaN3}). Se adicionaron diferentes concentraciones EgAgB nativo (0, 1, 5 y 10 µg/mL) e incubó durante 1 hora a 4°C. El agregado de azida de sodio y la incubación a 4°C se realizó para evitar la internalización de las proteínas; estas condiciones se mantuvieron durante todo el procedimiento. Luego las células se lavaron dos veces

con 150 µL de PBS_{SFB-NaN3} (centrifugando para decantar las células luego de cada lavado y resuspendiendo en el tampón), y se incubaron con 100 µL de una solución 10 µg/mL del Mo-EB7 o con un anticuerpo (IgG1, kappa) que reconoce un epítope irrelevante (isotipo control) durante 45 minutos a 4°C. Posteriormente, las células se lavaron tal como se detalló anteriormente y se incubaron con un anticuerpo anti-IgG/IgM de ratón conjugado a FITC (dilución 1/50, BD Biosciences) durante 45 minutos a 4°C. Adicionalmente, la unión directa del tándem Mo-EB7/conjugado se controló repitiendo todo el proceso pero omitiendo el agregado de EgAgB en el primer paso. Finalmente, las células se lavaron dos veces con PBS (centrifugando por 5 min a 350g, descartando el sobrenadante y resuspendiendo en PBS) y se analizaron mediante citometría de flujo (FacsCalibur, BD). Los valores de voltaje de los distintos detectores del citómetro se ajustaron para cada tipo celular (monocitos o macrófagos) y se mantuvieron constantes en todos los experimentos. Se definió el área correspondiente a las células vivas en el gráfico dispersión lateral (SSC) versus dispersión frontal (FSC) y se contaron entre 5000 y 10000 células vivas por experimento. En cada experimento todas las condiciones se analizaron por duplicado. La unión del EqAgB a las células se expresó como el índice de unión, calculado como el cociente entre las intensidades de fluorescencia (IF, media geométrica) de las células incubadas con el EgAgB y las células control (sin EgAgB).

2.6.2. Análisis de la capacidad de unión del EgAgB nativo conjugado a biotina/FITC a monocitos y macrófagos THP-1 y hepatocitos HepG2

2.6.2.1. Marcado del EgAgB nativo con biotina o FITC

El EgAgB nativo, purificado como se describió en 2.2.1, se acopló covalentemente a biotina o a FITC (utilizando los reactivos NHS-biotina o NHS-FITC, Pierce, Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó una concentración de proteína de 1 mg/mL en una solución amortiguadora NaHCO₃ 0.1 M, pH 9.0 a la que se le agregó NHS-biotina o FITC (1 mg/mL en DMSO). Las muestras se incubaron durante 4 horas a temperatura ambiente con agitación y en oscuridad. A continuación se intercambió la solución amortiguadora realizando una diálisis contra PBS a 4°C durante toda la noche, obteniéndose EgAgB conjugado a biotina (EgAgB-B) o a FITC (EgAgB-F). Para utilizar como control también se marcó la OVA (OVA-B) o BSA (BSA-B) empleando las mismas condiciones que para el EgAgB nativo.

Para verificar la conjugación a biotina, se sensibilizaron placas de ELISA de 96 pozos con las proteínas obtenidas luego del marcado (8 diluciones seriadas al 1:2 partiendo de una concentración 1 µg/mL, 100 µL/pozo) por incubación durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se bloquearon los sitios del plástico que hubieran quedado libres por incubación con PBS, SFB 0.05%, Tween 0.05%, durante 1 hora a temperatura ambiente, y se incubó con estreptavidina-PO (100 µL/pozo, dilución 1/20000) por 1 hora a 37°C en cámara húmeda. El revelado se llevó a cabo utilizando una solución conteniendo H_2O_2 0.03% (v/v) 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) 0.1 mg/mL en fosfato/citrato, pH 5.0. La reacción se detuvo luego de 15-30 minutos con H_2SO_4 2 N y se midió la absorbancia a 450 nm (Abs₄₅₀), corrigiéndola por la absorbancia a 560 nm (Abs₅₆₀) en un espectrofotómetro para microplacas Labsystems Multiskan (Thermo Fisher Scientific). Los resultados sobre la conjugación del EgAgB nativo y OVA a biotina se muestran en la Figura S2.2). Todas las preparaciones de EgAgB biotiniladas que se utilizaron en este trabajo se controlaron respecto a una preparación de OVA biotinilada en paralelo.

2.6.2.2. Ensayos de unión de EgAgB-B a monocitos y macrófagos THP-1 y hepatocitos HepG2

Se emplearon monocitos y macrófagos THP-1 y hepatocitos HepG2 distribuidos en placas de 96 pozos de fondo cónico, en un volumen final de 100 μ L por pozo. Para la diferenciación a macrófagos los pre-monocitos THP-1 se estimularon con 50 ng/mL de PMA en RPMI-5% SFB por 72 horas (como se indica en la sección 2.2.2). Las células se incubaron con EgAgB-B (20-350 μ g/mL) durante 1 hora a 4°C en PBS_{SFB-NaN3}. Posteriormente se lavaron dos veces con 150 μ L de PBS_{SFB-NaN3} (centrifugando para decantar las células luego de cada lavado y resuspendiendo en el tampón) y se incubaron con estreptavidina conjugada a FITC (estreptavidina-FITC, BD Biosciences) en una dilución 1/800, durante 45 minutos a 4°C.

Se realizaron varios controles de unión. Por un lado, una alícuota de las células se incubó sólo con PBS_{SFB-NaN3} y el conjugado estreptavidina-FITC, como control de la unión directa del conjugado. Además, los monocitos se incubaron en paralelo con OVA-B, para controlar el pegado de la estreptavidina-FITC a las células luego de su interacción con una proteína marcada con biotina a la misma concentración que el EgAgB. Alternativamente, los macrófagos THP-1 humanos se incubaron con IgG de ratón conjugada a biotina comercial (BD Biosciences), dado que en nuestra experiencia no observamos unión de esta IgG a los receptores de Fc humanos. Finalmente, las células se lavaron dos veces, se resuspendieron en 500 µL de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo. La unión de las subunidades de EgAgB a las células se expresó como el índice de unión, calculado como el cociente entre la IF (media geométrica) de las células incubadas con el EgAgB-B y con PBS_{SFB-NaN3}.

2.6.2.3. Ensayos de unión del EgAgB-B a células inflamatorias de ratón

Se utilizaron ratones C57BL/6 en los cuales se generó una respuesta inflamatoria aguda en el peritoneo por inyección de 100 µL de adyuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich Corporation) por 48 horas. Transcurrido este tiempo, se practicó la eutanasia de los animales por dislocación cervical y se realizó el lavado peritoneal empleando 15 mL de PBS conteniendo EDTA 2 mM y SFB 0.2%. Las células obtenidas se controlaron por citometría de flujo y se mantuvieron en frío hasta la incubación con las muestras. Como ya se comentó toda la manipulación con los ratones se realizó siguiendo protocolos aprobados por la CHEA-UdelaR.

En los ensayos de unión, para mantener la misma relación EgAgB/número de macrófagos que en los ensayos basados en líneas celulares, se utilizaron 1.0x10⁶ células/pozo, dado que los macrófagos constituyen aproximadamente el 50% de la población celular obtenida mediante el lavado de la cavidad peritoneal de ratón. Las células se incubaron con 20, 50 y 100 µg/mL de EgAgB-B u OVA-B (control) en PBS_{SFB-NaN3} durante 1 hora a 4°C. Posteriormente, las células se lavaron dos veces y se incubaron durante 45 minutos a 4°C con estreptavidina-FITC (1/800) y con el anti-F4/80-PE de ratón, éste último para identificar la población de macrófagos peritoneales ya que el F4/80 es una proteína de membrana característica de los macrófagos de ratón³⁷⁸. En paralelo, se incubaron células con PBS_{SFB-NaN3} como control de unión inespecífica de los anticuerpos y se realizaron marcados simples (para FITC y PE) para poder compensar/corregir las emisiones de los fluorocromos que contaminan otros detectores. Además, se preparó un control del marcado con el anticuerpo anti-F4/80-PE, empleando un anticuerpo isotipo control conjugado a PE (anticuerpo del mismo isotipo y especie que el anticuerpo anti-F4/80 conjugado a PE).

Finalmente las células se lavaron dos veces con PBS y se analizaron mediante citometría de flujo (FACSCalibur, BD Bioscience) Los valores del voltaje de los distintos detectores del citómetro que se ajustaron para estos ensayos con células peritoneales se mantuvieron constantes en todos los experimentos. El análisis de la unión de las proteínas marcadas con biotina se realizó sobre los monocitos/macrófagos, definidos como F4/80 positivos (F4/80+) y dentro de las células F4/80 negativas (F4/80⁻) sobre las poblaciones definidas como no-linfoide y linfoide de acuerdo a los valores de FSC y SSC. La unión de las subunidades de EgAgB a las células se expresó como el índice de unión de cada muestra, calculado como se detalló en la sección 2.6.1.

2.6.3. Estudio de la contribución de las subunidades proteicas y de la fosfatidilcolina del EgAgB a la unión a monocitos y macrófagos

Para estudiar la contribución del componente proteico del EgAgB se dispuso de las subunidades recombinantes delipidadas EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3, producidas por la Dra. Valeria Silva (producción en *E.coli*, tesis de doctorado en Ciencias Biológicas). Todas las subunidades se biotinilaron tal como se describió en la sección 2.6.2.1 para el EgAgB nativo. Los resultados sobre la conjugación de las subunidades rEgAgB8 se muestran en la Figura S2.4. Por otra parte, tomando en cuenta la estructura de las partículas lipoproteicas descriptas en vertebrados e invertebrados, es lógico suponer que los fosfolípidos que constituyen los principales lípidos anfipáticos expuestos al solvente puedan contribuir a las interacciones con sus blancos. Como la fosfatidilcolina (PC) es el fosfolípido más abundante en el EgAgB, se comparó la capacidad de unión a monocitos y macrófagos del EgAgB nativo, tratado o sin tratar con fosfolipasa D (EgAgB_{PLD+} o EgAgB_{PLD-}), enzima que hidroliza la PC.

2.6.3.1. Tratamiento de EgAgB nativo con fosfolipasa D (PLD)

Se incubó el EgAgB con PLD (EgAgB_{PLD+}) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se utilizaron 10 unidades de PLD por mg de EgAgB y la reacción se llevó a cabo en Tris-HCl 30 mM, CaCl₂ 2 mM, NaCl 100 mM, pH 8.0 durante 24 horas a 37°C. Como control, se incubó en paralelo el EgAgB en las mismas condiciones pero sin agregado de PLD (EgAgB_{PLD-}). Posteriormente, la PLD se removió por ultracentrifugación como se describió en el la sección 2.2.1. La eficiencia del tratamiento con PLD se evaluó analizando por HPTLC la composición lipídica de EgAgB_{PLD+} y de EgAgB_{PLD-}, tal como se describió en 2.5.2.1 y 2.5.2.2.

2.6.3.2. Ensayos de unión de las subunidades proteicas del EgAgB y del EgAgB $_{PLD+}$ a monocitos y macrófagos THP-1

Para este análisis se utilizaron monocitos y macrófagos derivados de la línea celular THP-1 y los protocolos ajustados para el análisis del EgAgB nativo. La unión a las células de las subunidades del EgAgB delipidadas y biotiniladas (EgAgB8/1-B, EgAgB8/2.B y EgAgB8/3-B) se ensayó a una concentración de 50 y 100 µg/mL y se utilizó igual concentración de OVA-B o el IgG de conejobiotina (BD Bioscience) como control. Luego de la incubación, las células se procesaron tal como se describió en 2.6.2.2 revelando la unión con estreptavidina-FITC, adquiriendo las células en el citómetro de flujo y analizando la unión de las subunidades del EgAgB a través de la determinación del índice de unión tal como se detalló para el a las células se expresó como el índice de unión.

La unión de EgAgB_{PLD+} y EgAgB_{PLD-} se ensayó a una concentración de 10 μ g/mL, en paralelo con la del EgAgB nativo (sin tratar). Se reveló la unión con el anticuerpo Mo-EB7, seguido del conjugado anti-IgG/IgM-FITC, siguiendo todos los pasos del protocolo descripto en el la sección 2.6.1. La unión se expresó como porcentaje de unión tomando con 100% el valor del índice de unión obtenido para el EgAgB nativo.

2.6.3.3. Preparación de vesículas unilamelares grandes (LUVs)

Como aproximación alternativa para evaluar si los fosfolípidos participan directamente en la unión del EgAgB a monocitos, se diseñaron ensayos de competencia con vesículas unilamelares grandes (LUVs) compuestas por PC o PC/PS. Para la preparación se utilizaron los fosfolípidos naturales PC y PS y se prepararon dos tipos de vesículas: conteniendo 100% de PC o PC/PS en una relación 50:50 molar. Para la obtención de las vesículas, los fosfolípidos puros disueltos en cloroformo se mezclaron de acuerdo a la concentración final, se secaron completamente bajo corriente de N₂ (g) y se hidrataron en TBS para formar las vesículas multilamelares. A continuación, esta se estrujó esta suspensión empleando un filtro de policarbonato 0.1 µm en un equipo *Avanti Mini-Extruder* (Avanti Polar Lipids), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las LUVs obtenidas se conservaron a 4°C en frascos color caramelo y gaseadas bajo corriente de N₂ (g) para evitar la oxidación de los lípidos.

2.6.3.4. Ensayos de competencia empleando vesículas de fosfatidilcolina y fosfatidilcolina/fosfatidilserina

Para estos ensayos se utilizaron las LUVs de PC y PC/PS preparadas como se describió en la sección 2.6.3.3. Se emplearon monocitos THP-1 distribuidos en placas de 96 pozos de fondo cónico, en un volumen final de 100 µL por pozo, tal como se detalló en la sección 2.6. Las células se pre-incubaron con las LUVs de PC o de PC/PS (500 µg/mL) en PBS_{SFB-NaN3} durante 30 minutos a 4°C. A continuación se lavaron una vez y se incubaron durante 1 hora a 4°C con el EgAgB nativo marcado con biotina a una concentración de 100 µg/mL en PBS_{SFB-NaN3} (obtenido según se describió en 2.6.2.1). El revelado de la unión se realizó empleando estreptavidina-FITC, y siguiendo el protocolo descripto en la sección 2.6.2.2. Al finalizar el revelado, las células se resuspendieron en 500 µL de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo. La unión del EgAgB a las células pre-incubadas con LUVs de PC o PC/PS se expresó como el índice de unión calculado tal como se describió en 2.6.1.

2.6.4. Posibles receptores celulares involucrados en el reconocimiento del EgAgB

2.6.4.1. Purificación de lipoproteínas plasmáticas: HDL y LDL

Las lipoproteínas plasmáticas HDL y LDL se purificaron a partir de plasma humano de donantes voluntarios sanos empleando un método de ultracentrifugación basado en el descripto por Bejta³⁶⁶. El plasma se obtuvo a partir de muestras de sangre fresca, adicionada con EDTA 10 mM como anticoagulante, incubada a 4°C durante 1 hora y centrifugada a 2000 rpm durante 8 minutos (Sigma 3.18K). A continuación se realizó un gradiente de densidad, tal como se describió en la sección 2.4.1 para la obtención de EgAgB pero utilizando tubos más grandes (25 mL). Brevemente, a 5 mL de plasma se le agregó KBr a una concentración final de 0.49 g/mL y se utilizó NaCl 0.15 M, KBr 0.05 g/mL para completar el volumen a 25 mL. Las muestras se ultracentrifugaron en una ultracentrífuga *L7-65* (Beckman Coulter) a una velocidad de 55000 rpm durante 4 horas a 4°C. Luego de la ultracentrifugación, la banda correspondiente a la LDL (banda superior de color

naranja) y la banda correspondiente a la HDL (banda inferior de color amarillo) se aspiraron cuidadosamente y transfirieron a tubos de vidrio. Para la purificación de la HDL se realizó una segunda ultracentrifugación, para lo cual a la fracción obtenida inicialmente se le agregó KBr hasta saturación, se completó el tubo con la solución de NaCl 0.15 M, KBr 0.05 g/mL y se ultracentrifugó nuevamente a 55000 rpm durante 4 horas a 4°C. El KBr de las fracciones de LDL y HDL purificadas se eliminó mediante diálisis en solución amortiguadora PBS_{E-B-AbAm} durante 24 horas. Finalmente, se transfirieron a tubos de vidrio color caramelo, se gasearon bajo corriente de N₂ (g) para evitar la oxidación de los lípidos y conservaron a 4°C.

2.6.4.2. Ensayos de competencia empleando lipoproteínas plasmáticas y otros ligandos de receptores celulares de superficie

Con el fin de evaluar posibles receptores celulares involucrados en la interacción con el EgAgB se realizaron ensayos de competencia entre el EgAgB nativo con varios ligandos conocidos para distintos receptores de superficie: las lipoproteínas plasmáticas LDL y HDL (unen a varios receptores para lipoproteínas), la lactoferrina (receptor LRP-1) y el ácido poli-inosínico (receptor SR-A). Para estos ensayos se utilizaron LDL y HDL preparadas como se describió en la sección anterior y lactoferrina y ácido poli-inosínico comerciales. Se emplearon monocitos distribuidos en placas de 96 pozos de fondo cónico, en un volumen final de 100 µL por pozo, tal como se detalló en el ítem 2.4.1. Las células se pre-incubaron con LDL o HDL (500 µg/mL), lactoferrina/ácido poli-inosínico (5, 100 y 1000 µg/mL) o BSA (1000 µg/mL) o PBS como control en PBS_{SFB-NaN3} durante 30 minutos a 4°C. A continuación se lavaron una vez y se incubaron con el EgAgB nativo marcado con biotina, a una concentración de 100 µg/mL en PBS_{SFB-NaN3} durante 1 hora a 4°C. El revelado de la unión se realizó empleando estreptavidina-FITC, siguiendo el protocolo descripto en la sección 2.4.2.2. Al finalizar el revelado, las células se resuspendieron en 500 µL de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo. La unión del EgAgB a las células pre-incubadas con las lipoproteínas se expresó como el índice de unión de cada muestra.

2.6.5. Ensayos de competencia por la unión a macrófagos entre el EgAgB nativo y el LPS

En estos ensayos se plaquearon 0.2x10⁶ macrófagos THP-1 en placas de fondo cónico y se utilizó LPS comercial conjugado al fluorocromo Alexa-488 (LPS*, Molecular Probes. Primero se evaluó la unión del LPS* a macrófagos ensayando distintas dosis en un amplio rango de concentraciones (entre 0,01 y 10 µg/mL). El LPS* se incubó con las células por 30 minutos a 37° C y finalizada la incubación las células se lavaron dos veces con una solución amortiguadora de tinción para citometría de flujo (FACS, PBS conteniendo BSA 0.1% m/v, EDTA 2 mM, pH 7.1) y se analizaron por citometría de flujo (FACSCalibur). La unión del LPS* a los macrófagos se expresó como la IF promedio (media geométrica). Luego se realizaron ensayos de competencia por la unión a las células entre el LPS* (5 μg/mL) γ el EgAgB nativo, utilizando OVA como una proteína control. En este caso, el LPS* se pre-, co- o post-incubó con EgAgB (1-200 μg/mL), OVA (200 μg/mL) o PBS_{F-B-} AbAm (control de vehículo) mediante el agregado de las preparaciones sobre la suspensión celular. En los experimentos de pre y post incubación, las células se incubaron con la primera preparación por 30 minutos a 37° C y posteriormente se adicionó la segunda preparación incubando en las mismas condiciones de tiempo y temperatura. En general el agregado de la segunda preparación se realizó sin centrifugar la placa ni eliminar el sobrenadante entre etapas, salvo para un experimento preliminar en el cual se centrifugó la placa, eliminó el sobrenadante y finalmente se agregó la segunda preparación (Figura 5.20 C de la sección 5.5 de Resultados). Al finalizar la

incubación, las células se lavaron dos veces con PBS y se analizaron mediante citometría de flujo (FacsCalibur). La unión del LPS* a las células en las diferentes condiciones de competencia se expresó como el % de unión promedio, relativo a la unión del LPS* en presencia del vehículo.

2.7. Análisis de los efectos EgAgB sobre macrófagos: efectos *per se* y efectos moduladores de las repuestas inducidas por agonistas de TLRs

Se obtuvo EgAgB nativo a partir de LH y rEgAgB8/1 siguiendo las metodologías descritas en 2.4.1 y 2.4.2.2, respectivamente. Ambas preparaciones se sometieron a un paso final de cromatografía de inmunoafinidad utilizando los VHH anti-EgAgB8/1 inmovilizados sobre CNBr como se describe en 2.4.2.1. Los efectos del EgAgB sobre las propiedades biológicas de las células se examinaron determinando su viabilidad (indirectamente por medida de la actividad metabólica, sección 2.7.3), la producción de óxido nítrico (a través de la medición de nitrito, sección 2.7.4), la expresión de moléculas de superficie (sección 2.7.5), y la capacidad de inducir o interferir con la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1β, IL-6 e IL-12 (sección 2.7.6).

2.7.1. Efectos del EgAgB nativo y su fracción lipídica sobre macrófagos THP-1

Se plaquearon 0.2x10⁶ células THP-1 por pozo en placas de 96 pocillos. Se diferenciaron con 50 ng/mL de PMA en RPMI-5% SFB por 48 horas y posteriormente se realizó un cambio de medio, dejando a las células en RPMI completo (5% SFB) por 24 horas adicionales (como se describió en la sección 2.2.2). Se seleccionaron distintos agonistas de TLRs: LPS, zymosán, Pam3CSK4 y Poly (I:C). En primer lugar se realizaron ensayos para determinar las curvas de dosis-respuesta generadas por los distintos estímulos en base a la inducción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1β e IL-6 durante 24 horas. Se analizaron rangos de concentración entre: 0,1-1000 ng/mL para el LPS, 0,01-1 mg/mL para el zymosán, 1-500 ng/mL γ 1-500 μg/mL para el Poly (I:C). Una vez establecido el rango de concentraciones de trabajo para estos agonistas se llevaron a cabo experimentos de estimulación de macrófagos con EgAgB nativo o rEgAgB8/1 (1 y 10 μg/mL) en presencia/ausencia de una concentración fija del agonista que generara una respuesta clara pero no saturada, de forma de poder evaluar su eventual regulación positiva o negativa. Con este criterio se utilizó LPS 10 ng/mL, zymosán 1 µg/mL, Pam3CSK4 50 ng/mL y Poly (I:C) 100 µg/mL. Como control del vehículo se utilizó PBSE-B-AbAm, tampón empleado para la conservación de todas las preparaciones obtenidas, el cual se ensayó sólo o en conjunto con el LPS. Cabe aclarar que el EgAgB, tanto nativo como recombinante, y los agonistas de TLR se adicionaron a los pozos en forma separada, para evitar posibles interacciones entre ellos previo al contacto con las células. Luego de 24 horas de cultivo se analizó la actividad mitocondrial en las células y en los sobrenadantes se cuantificaron citoquinas y nitrito.

Adicionalmente, se realizaron ensayos similares utilizando LPS como estímulo pero en presencia de la fracción lipídica del EgAgB nativo, obtenida tal como se describió en la sección 2.5.2.1. Las fracciones lipídicas se ensayaron a 10 y 20 µg/mL y se sumó el control del vehículo correspondiente (DMSO).

2.7.2. Efectos del EgAgB sobre macrófagos murinos derivados de médula ósea (BMDM)

Los BMDM, obtenidos según se describió en la sección 2.2.5 se centrifugaron por 10 minutos a 350 g y 18°C y se resuspendieron en 10 ml de DMEM. Se plaquearon 0.5x10⁶ células por pozo en placas de 48 pozos con 0.5 mL de DMEM conteniendo SFB 1% (v/v). A las 24 horas se descartó el sobrenadante y se agregaron los estímulos. Se llevaron a cabo experimentos de estimulación de macrófagos con EgAgB nativo o rEgAgB8/1 (1 y 10 µg/mL) en presencia/ausencia de LPS (10 ng/mL). Como control del vehículo se utilizó PBS_{E-B-AbAm}, el cual se ensayó sólo o en conjunto con el LPS. Los estímulos se adicionaron a los pozos en forma separada. Luego de 24 horas de cultivo, los sobrenadantes y las células se analizaron en cuanto a la respuesta de citoquinas y nitrito, la actividad metabólica celular (tomada como medida de la viabilidad celular) y la expresión de moléculas de superficie en las células según se describe a continuación.

2.7.3. Determinación de la actividad metabólica celular

Como medida de la viabilidad celular se determinó la actividad metabólica celular utilizando el ensayo de MTT³⁷⁹ (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2- ilo)-2,5-difeniltetrazol, Bio Basic Inc., Canadá). Este ensayo colorimétrico permite cuantificar el formazán que se genera como consecuencia de la reducción enzimática del MTT por la succinato deshidrogenasa mitocondrial, por lo que sólo ocurre en células viables. Por tanto, se puede relacionar la viabilidad con la cantidad de formazán generado. Las células se cultivaron en presencia de 200 µg/ml de MTT en PBS con 0.1 % glucosa por 3 horas a 37°C y 5% CO₂. Luego se lavaron con PBS y el formazán generado se disolvió en DMSO y se cuantificó midiendo la Abs a 560 nm en un espectrofotómetro para microplacas.

2.7.4. Determinación de nitritos por el método de Greiss

Se determinaron los niveles de NO₂₋ acumulados en los sobrenadantes de cultivo para evaluar la producción de óxido nítrico por las células. Este método se basa en la reacción de diazotización de Greiss que utiliza sulfanilamida y N-(1-Naftil) etilenamina diclorhidrato (NED) bajo condiciones ácidas. Brevemente, se dispensaron 50 μ L de muestra en placas de microtitulación de 96 pozos y se les agregaron 50 μ L del reactivo de Greiss (H₃PO₄ 2.9 mL, sulfanilamida 0.5 g, naftilendiamina 0.05 g, completando a 50 mL con agua destilada). En paralelo se realizó una curva estándar a partir de diluciones de una solución de nitrito de sodio de concentración conocida en el rango de 0 a 50 μ M. La placa se incubó a temperatura ambiente por 5-10 minutos en oscuridad y se midió la Abs₅₆₀ en un lector de microplacas.

2.7.5. Determinación del nivel de expresión de moléculas de superficie por citometría de flujo

Los macrófagos BMDM se despegaron vertiendo 500 µL por pozo de una solución de PBS conteniendo EDTA 1 mM y 0.2% de glucosa a 4°C. Esta solución se aspiró y dispensó diez veces con una micropipeta para despegar las células. Dicho proceso se repitió por lo menos dos veces y el despegado se confirmó observando la placa al microscopio óptico. Se procedió con el marcado de los macrófagos obtenidos con distintos anticuerpos para su análisis por citometría de flujo, manteniéndolos siempre en frío y protegiéndolos de la luz (a menos que se indique lo contrario). Se transfirieron a una placa de 96 pocillos de fondo en V y se lavaron con 100 µL de PBS; el lavado incluyó la centrifugación a 350 g durante 5 minutos, el descarte del sobrenadante por inversión de la placa y el disgregado de las células por pasaje de la placa por un agitador tipo vórtice. Para medir la viabilidad las células se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con 10 µL

de una solución 1/500 en PBS de la sonda comercial Live/dead-Aqua, conjugada a V500 (Thermo Fischer). En las células muertas, cuya integridad de membrana se encuentra comprometida, la sonda se une covalentemente a las poliaminas intracelulares además de las presente en la superficie, por lo que les confiere mayor intensidad de fluorescencia. Luego, se agregaron 15 µL de solución amortiguadora de tinción para citometría de flujo (FACS, PBS conteniendo BSA 0.1% m/v, EDTA 2 mM, pH 7.1) por pocillo conteniendo suero normal de rata 15% v/v durante 20 minutos para bloquear los receptores Fc presentes en las células y los motivos expuestos en la superficie celular que puedan promover interacciones inespecíficas. Posteriormente, las células se incubaron con 25 µL de una mezcla de anticuerpos conjugados a fluorocromos específicos para los receptores celulares de interés diluidos en FACS, durante 30 minutos. Se llevó a cabo la tinción con anticuerpos específicos que se detallan en la Tabla 2.1: F4/80 (anti-F4/80-PECy7) para identificar a los macrófagos, Ly6C (anti-Ly6C-eF450) para eliminar posibles monocitos (en caso de haber alguno) y CD40 (anti-CD40-FITC), CD86 (anti-CD86-PE) y MHC-II (anti-MHC-II-APC) para las moléculas de superficie.

Tabla 2.1. Anticuerpos utilizados para la identificación de BMDM y para la determinación de los niveles de moléculas en la superficie celular. Se lista cada anticuerpo utilizado en los ensayos con BMDM junto con el fluorocromo asociado, antígeno que reconoce, clona de la cual deriva, dilución de uso y marca y número de catálogo correspondiente al producto.

Fluorocromo	Antígeno	Clona	Dilución final	Marca	# Catálogo	
FITC	CD40	3/23	200	BD	553790	
PE	PE CD86		100	BD	553692	
PECy7	F4/80	BM8	200	eBioscience	25-4801-82	
APC	MHC-II (IA/IE)	M5/114.15.2	200	eBioscience	17-5321-82	
eFluor 450 Ly6C		HK1.4	200	eBioscience	48-5932-82	

Finalmente, las células se lavaron 2 veces con 150 µL de FACS y se resuspendieron en 100 µL de PBS para su adquisición en el citómetro. Como controles de la tinción se realizaron los marcados simples, correspondientes a la incubación con un único anticuerpo, que permite corregir el ruido generado por el solapamiento entre los espectros de emisión de los fluorocromos a través de la herramienta de compensación del programa de análisis. En paralelo se realizó un control FMO (del inglés, fluorescence minus one) para cada uno de los marcadores, incubando las células con todo el mix de anticuerpos salvo aquel para el que se busca realizar el control. El FMO determina la fluorescencia que llega a un detector producto de la autofluorescencia basal y de la emisión no deseada proveniente del resto de los fluorocromos presentes en la mezcla (no corregible mediante compensación), siendo el umbral para definir las células positivas para el marcador. Para el análisis se utilizó un citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences) de ocho detectores. Cada muestra se tomó durante 1 min y se grabaron al menos 20000 eventos. El análisis posterior se realizó utilizando el software FlowJo v7.6 (TreeStar). Desafortunadamente no funcionó el marcador de viabilidad que se había comprado para el análisis (live/dead-Aqua V500 y el disponible emitía florescencia en el mismo canal que alguno de los anticuerpos de interés (FITC) por lo cual no se pudo eliminar el ruido generado por células muertas. La estrategia de análisis de las células implicó

varios pasos secuenciales de selección de las poblaciones según su marcado fluorescente que llamamos estrategia de clasificación o de *gating* (por la creación de regiones o *gates* que contienen las células seleccionadas). En primer lugar, se seleccionaron aquellos eventos considerados células íntegras, que dejaron por fuera los eventos de menor tamaño y granularidad, correspondientes usualmente a deshechos celulares (Figura 2.3 A). Dentro de la región de células íntegras se seleccionaron los singuletes (graficando FSC-A y FSC-H, Figura 2.3 B), descartando aquellos eventos asociados a la señal generada por grupos de dos o más células que atraviesan a la vez el haz de luz. A continuación, tomando en cuenta los umbrales obtenidos para cada fluorocromo con los controles FMO, se seleccionaron los macrófagos como aquellas células F4/80⁺⁺Ly6C⁻ (Figura 2.3 C) y sobre esta población se analizó el nivel de expresión de CD40, CD86 y MHC-II (Figura 2.3 D). Los resultados se informan como el nivel de expresión del marcador en estudio, estimado tomando la media geométrica de la IF corregida por el correspondiente valor del FMO.



Figura 2.3. Estrategia de *gating* **para la definición de BMDM**. Los BMDM se tiñeron con los anticuerpos anti-F4/80-PECy7, anti-Ly6C-eF450, anti-CD40-FITC, anti-CD86-PE y anti-MHC-II-APC y se analizaron mediante citometría de flujo tal como se describe en 2.7.5. Se esquematiza la estrategia de *gating* de los macrófagos (MF) utilizada para el análisis, que consistió en seleccionar primero las células íntegras (A), dentro de éstas los singuletes (B) y dentro de estos últimos identificar y seleccionar los eventos F4/80⁺⁺Ly6C⁻ (C) en base a los umbrales generados con los controles FMO. Sobre la población de macrófagos se evaluaron los niveles de expresión de CD40, CD86 y MHC-II en superficie (en función de la media geométrica de la IF detectada, D).

2.7.6. Cuantificación de citoquinas por enzimoinmunoensayo

La concentración de citoquinas en el sobrenadante de cultivo se analizó por ELISA (del inglés, enzyme-linked immunosorbent assay) utilizando pares de anticuerpos comerciales (BD OptEIA,

Tabla 2.2) y siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante. Se utilizaron placas de 96 pozos con alta capacidad de unión (Maxisorp, Nunc). En forma general, se incubó la placa con una dilución apropiada del anticuerpo de captura en la solución amortiguadora correspondiente, durante toda la noche a 4°C. Luego, se bloqueó con una solución de PBS conteniendo SFB 10% durante al menos 1 hora a temperatura ambiente, para cubrir los sitios de unión en la placa no ocupados por el anticuerpo de captura. A continuación se sembró la muestra o una dilución seriada del estándar y se incubó durante 2 horas a 37°C. Pasado este tiempo, se agregó una dilución apropiada del anticuerpo de detección conjugado a biotina en la solución amortiguadora correspondiente y se coincubó o posteriormente incubó (este paso es varía entre kits) con estreptavidina conjugada a la enzima peroxidasa. Después de cada incubación se realizaron entre tres y cinco lavados con PBS 0.05% m/v Tween-20, excepto antes del revelado que se realizaron 7 lavados. Se reveló agregando 100 µL de fosfato-citrato conteniendo TMB y H₂O₂ y se detuvo la reacción mediante el uso de H₂SO₄ 1 M. Finalmente se midió la Abs₄₅₀ en un lector de microplacas. Se determinó la concentración de las citoquinas en la muestra en base a la curva del estándar que se obtuvo a partir del ajuste lineal de la curva Abs_{450} vs la concentración de la citoquina utilizando el programa Excel.

Tabla 2.2. Kits de anticuerpos comerciales utilizados para la determinación de citoquinas en el sobrenadante de cultivo y el lavado peritoneal por ELISA de captura. Se lista cada kit de BD indicando la especie e interleuquina que permite cuantificar así como el número de catálogo correspondiente. * Subunidad compartida con la IL-23 (IL-12/IL-23p40).

Especie	Interleuquina	# Catálogo		
Humana	IL-1β	557953		
Humano	IL-6	555220		
	IL-1β	559603		
Datán	IL-6	555240		
Raton	IL-10	555252		
	IL-12p40 *	555165		

2.8. Análisis de la capacidad del EgAgB de promover el eflujo de colesterol en macrófagos

Estos ensayos se realizaron en el Laboratorio del Grupo de Bases Metabólicas del Riesgo Cardiovascular perteneciente al Instituto de Recerca del l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, ubicado en Barcelona (España) en el marco de una pasantía de la Dra. Ferreira realizada en 2019 que permitió establecer una colaboración con el Dr. Josep Julve. Lamentablemente debido a la pandemia, fue imposible concretar una estancia en la que pudiera completar estos estudios. Por tanto, realicé el análisis de los datos obtenidos por la Dra. Ferreira que permitió alcanzar resultados preliminares.

Las líneas de macrófagos THP-1 y J774 se mantuvieron en cultivo como se describió en las secciones 2.2.2 y 2.2.3, respectivamente. En el caso de los macrófagos THP-1, se distribuyeron en

placas de 6 pozos, 1x10⁶ de la línea THP-1 en 1 mL de medio RPMI conteniendo SFB 5%, se adicionaron 50 ng/mL de PMA y se cultivaron por 72 horas para promover su diferenciación a macrófagos, lo cual anula su proliferación. En el caso de la línea J774, se sembró en placas de 6 pozos una alícuota de 2x10⁵ células por pozo y se cultivaron hasta que alcanzaron un 80-90% de confluencia. Una vez obtenidos los cultivos de macrófagos, se adicionó 1 µC de colesterol tritiado en RPMI - 5% SFB y se permitió su incorporación a las células durante 48 horas. Pasado este tiempo se retiró el sobrenadante y se equilibraron las células por 18 horas en 0,2% de BSA libre de ácidos grasos en RPMI para quelar el posible colesterol marcado en el medio de cultivo que no haya sido incorporado a las células). A los macrófagos J774 también se les adicionó AMP cíclico 0,3 mM para inducir la expresión de la molécula ABCA-1, transportador de colesterol en los macrófagos. Luego se procedió a incubar las células con 25 y/o 50 µg/mL de EgAgB o rEgAgB8/1, HDL₃ (aceptor conocido de colesterol celular, control positivo del eflujo) y el control de vehículo (blanco, conteniendo PBS_{E-B-AbAm}). A las 4 horas se colectó el sobrenadante (centrifugando para eliminar posibles restos celulares), se lisaron las células con NaOH 0,5 M y se sonicaron (2 veces por 30 minutos a temperatura ambiente). Se mezclaron 200 μ L de sobrenadante y 500 μ L del lisado celular con 4 mL de líquido de centelleo y se realizó el conteo de la marca radiactiva en un contador de centelleo. Finalmente, se determinó el eflujo de colesterol que promovió cada preparación como la relación entre la actividad radioactiva presente en el sobrenadante y la total (sobrenadante y células).

2.9. Análisis de datos

Todos los experimentos utilizando células en cultivo se realizaron al menos 3 veces (n = 3, a menos que se indique lo contrario), con duplicados o triplicados analíticos (según se detalle en la presentación de los resultados). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software GraphPad Prism (version 6, GraphPad Software, EEUU, www.graphpad.com). Para el análisis comparativo se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía con la prueba de Dunn, o de dos vías (considerando cada experimento como otra variable) con la prueba de Tukey, ambos con un p < 0.05, según se describe en la sección Resultados para cada experimento.

2.10. Análisis in vivo de los efectos del EgAgB sobre las células presentes en el peritoneo de ratón

Se evaluó si el EgAgB nativo/rEgAgB8/1 induce *per se* y/o altera la respuesta inflamatoria innata inducida por el estímulo inflamatorio LPS en las células presentes en el peritoneo de ratones. Se eligió este modelo ya que el peritoneo es un lugar anatómico ampliamente utilizado para el estudio de células innatas incluyendo a los monocitos y macrófagos, células en las que se centraron los estudios *in vitro*. Los experimentos *in vivo* se realizaron con ratones Balb/c, hembras de entre 8 y 12 semanas de edad; como ya se comentó siguiendo el protocolo 542 (Exp. N° 101900-000972-17) avalado por la CHEA-UdelaR. Se analizaron las poblaciones presentes en la cavidad peritoneal y las citoquinas producidas a dos tiempos de una respuesta inmune innata aguda, 4 y 24 horas. Se utilizó el LPS como estímulo inflamatorio dado el conocimiento generado sobre los efectos del EgAgB nativo en los estudios *in vitro* antes descriptos.

2.10.1. Estimulación intraperitoneal con EgAgB nativo/rEgAgB8/1 y LPS

Para cada experimento se utilizaron 4 grupos de ratones: EgAgB/rEgAgB8/1, LPS, LPS + EgAgB/rEgAgB8/1 y grupo control. Todos recibieron dos inyecciones por vía intraperitoneal (i.p.) de 100 μ L, una inicial conteniendo 50 μ g de EgAgB o PBS_{E-B-AbAm} (vehículo) en suero fisiológico estéril (SF) y otra, separada en el tiempo (10 minutos) conteniendo 15 μ g de LPS o SF (vehículo) según correspondiera. La administración por separado y unos minutos antes del antígeno pretendió evitar que sus efectos se debieran a una eventual interacción con el LPS en la mezcla inyectada.

Se utilizó una dosis de 50µg/ratón de EgAgB/rEgAgB8/1, dosis escogida apuntando a mantener una relación µg EgAgB (proteína)/célula del orden de la utilizada en los estudios *in vitro* (~5 µg para 0.5x10⁶ macrófagos), considerando que, en estado basal, la cavidad peritoneal de los ratones Balb/c puede contener entre 2 y 4x10⁶ células y que localmente la dosis será menor (dado que el peritoneo es un sitio ampliamente vascularizado y con gran capacidad absortiva por lo cual se espera que una proporción del EgAgB soluble inyectado difunda rápidamente y alcance la sangre).

2.10.2. Lavado peritoneal

Se practicó la eutanasia de los animales utilizando una sobredosis del anestésico inhalatorio isofluorano a las 4 o 24 horas post-estimulación (p.e.). La obtención de células peritoneales de ratón se llevó a cabo mediante lavado peritoneal. Se retiró la piel del abdomen efectuando un corte superficial para luego separar la piel cuidadosamente, sin perforar la cavidad. Para obtener una muestra concentrada, que permitiera evaluar niveles de citoquinas, se inyectó 1 mL de la solución de lavado fría (RPMI, SFB 0,2%, EDTA 2 mM) en la cavidad peritoneal y luego de 1 minuto, durante el cual se balanceó el cuerpo del ratón para que la solución tomara contacto con toda la cavidad, se recuperaron al menos 500 µL. A continuación se realizaron 2 lavados con 4,5 mL cada uno para recuperar la mayor cantidad de células posible. Se centrifugó el lavado durante 5 minutos a 350 g. El sobrenadante de la muestra concentrada se reservó para cuantificar citoquinas por ELISA. Los pellet de células de ambas extracciones se mezclaron (*pool*) y se contaron en un contador de células (Cellometer, Nexcelom Bioscience, USA) utilizando el marcador de viabilidad (AOPI).

2.10.3. Caracterización de las poblaciones celulares recuperadas de cavidad peritoneal por citometría de flujo

Para el análisis celular por citometría de flujo se marcaron las células con anticuerpos fluorescentes siguiendo los pasos y condiciones del protocolo descripto en 2.7.5. El detalle sobre las características y el origen de los anticuerpos fluorescentes que se utilizaron se muestra en la Tabla 2.3. Primero se llevó a cabo la tinción de viabilidad y luego de los marcadores de superficie y de activación celular. En paralelo se realizaron los marcados simples (para todos los anticuerpos) y los FMO (solamente para los anticuerpos utilizados para evaluar los niveles de expresión de los marcadores de interés). Las células se lavaron con FACS y se fijaron con 100 µl de una solución de 4% de paraformaldehído en PBS, pH 7.4 durante 20 minutos a 4°C. Finalmente se realizaron dos lavados con FACS y las células se resuspendieron en 100 µl de FACS y mantuvieron a 4°C hasta su análisis por citometría de flujo. Cada muestra se tomó durante 1 minuto (totalmente) y se grabaron al menos 50000 eventos. Se diseñaron estrategias de selección para analizar la presencia de las diferentes poblaciones recuperadas de la cavidad peritoneal (descriptas en sección 2.8.3.1).

Tabla 2.3. Anticuerpos utilizados para la identificación de poblaciones y para la determinación de los niveles de moléculas en la superficie celular. Se lista cada anticuerpo utilizado en los ensayos *in vivo* junto con el fluorocromo asociado, antígeno que reconoce, clona de la cual deriva, dilución de uso y marca y número de catálogo correspondiente al producto.

Fluorocromo	rocromo Antígeno Clona Dilución final		Marca	# Catálogo	
	Gr-1 (Ly6C, Ly6G)	RB6-8C5	200	BD	553127
FITC	CD40	3/23	200	BD	553790
	CD5	53-7.3	200	BD	553020
	Siglec F (CD170)	1B1	200	eBioscience	553846
PE	CD86	GL-1	100 BD		553692
	CD11b	M1/70	200	BioLegend	101208
PerCP	MHC-II (IA/IE)	M5/114.15.2	200	BioLegend	107624
PECy5	CD86	GL-1	100	Biolegend	105016
DECVZ	CD11c	N418	200	eBioscience	25-0114-82
PECy/	F4/80	BM8	200	eBioscience	25-4801-82
ADC	MHC-II (IA/IE)	M5/114.15.2	200	eBioscience	17-5321-82
APC	CD40	3/23	200	BD	558695
APC-Cy7	CD19	1D3	200	BD	557655
eFluor 450	Ly6C	HK1.4	200	eBioscience	48-5932-82

2.10.3.1. Estrategia de gating para caracterizar las células peritoneales

Se buscó realizar un análisis global de la respuesta inflamatoria, por lo cual se analizaron las principales poblaciones residentes/reclutadas en el peritoneo y los niveles de expresión de algunas moléculas de superficie relevantes, como MHC-II y receptores co-estimulatorios (CD40 y CD86). Para cada experimento se realizaron 3 tinciones independientes que se describen en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Paneles de anticuerpos utilizados para el análisis de células peritoneales por citometría de flujo. Se listan las moléculas identificadas en las tres tinciones junto con el fluorocromo al que se asocia el anticuerpo que se empleó para su respectivo reconocimiento (la información de cada anticuerpo se presenta en la Tabla 2.3 de la sección 2.10.3) con el fin de evaluar las poblaciones presentes en el peritoneo (se aclara en base a qué molécula) y la expresión de MHC-II, CD86 y CD40 en los distintos lotes experimentales. DCs: células dendríticas; LB: Linfocitos B; MC: monocitos; MF: macrófagos.

Fluorocromo	TINC	IÓN 1		TINCIÓN 2			TINCIÓN 3	
FITC	Gr-1	Neutrófilos		CD40			CD5	B1a
PE	Siglec-F	Eosinófilos		CD86			CD86	
PerCP	-	-		MHC-II				
PECy5	CD86		_	-	-		CD11b	B1/B1a
PECy7	CD11c	DCs		F4/80	MF		F4/80	MF
APC	MHC-II			MHC-II/CD40			MHC-II	
APCCy7	CD19/F4/80	LB/MF		CD19	LB		CD19	LB
eF450	Ly6C	MC		Ly6C	MC		-	
V500	L/D			L/D			L/D	

A continuación se describe la estrategia de selección utilizada para analizar la presencia de las diferentes poblaciones recuperadas de la cavidad peritoneal. Desafortunadamente como no funcionó el marcador de viabilidad que se había comprado para el análisis (live/dead-Aqua V500, aun cuando se ensayó a concentraciones mayores que las recomendadas por el fabricante, Thermo Fisher) y el disponible emitía florescencia en el mismo canal que alguno de los anticuerpos de interés (FITC), no se pudo eliminar el ruido generado por células muertas. Así, en primer lugar, para todas las tinciones se seleccionaron aquellos eventos considerados células íntegras, que dejaron por fuera los eventos de menor tamaño y granularidad que son usualmente restos celulares (Figuras 2.4-2.6 A). Luego, como dentro de la región de células íntegras se seleccionaron los singuletes (Figuras 2.6-2.6 B), que como ya se explicó descarta aquellos eventos asociados a la señal generada por grupos de dos o más células que atraviesan a la vez el haz de luz.

En la tinción 1 se incluyeron anticuerpos específicos para identificar células dendríticas y los neutrófilos y eosinófilos reclutados a cavidad peritoneal (Figura 2.4). Dentro de las células íntegras y los singuletes se definieron las células dendríticas (DCs) como aquellas que expresan altos niveles de CD11c y MHC-II (CD11c⁺⁺MHC-II⁺⁺, Figura 2.4 C). A partir de las células negativas para estos marcadores, CD11c⁻MHC-II⁻ (DCs⁻), se identificó la población CD19⁻F4/80⁻ para eliminar a los linfocitos B (LB) y macrófagos (MF), respectivamente (Figura 2.4 D). Finalmente, para determinar las poblaciones inflamatorias reclutadas, se definieron los neutrófilos como Gr-1⁺⁺SiglecF⁻ y los eosinófilos como Gr-1⁻SiglecF⁺ (Figura 2.4 E).



Figura 2.4. Estrategia de *gating* para definir las DCs y las poblaciones de granulocitos, neutrófilos y eosinófilos, reclutados de la sangre a la cavidad peritoneal de ratón. A las 4 y 24 horas p.e. se obtuvieron las células de cavidad peritoneal y se tiñeron con anticuerpos específicos para definir células dendríticas y las poblaciones de neutrófilos y eosinófilos reclutados tal como se detalló en la secciones 2.10.1-3. Se ilustra la estrategia de *gating* utilizada a partir del lavado peritoneal de un ratón estimulado con EgAgB nativo,

mostrando la selección en forma secuencial. Se identificaron las células íntegras (A), dentro de estas últimas los singuletes (B) y a continuación las DCs como CD11c⁺⁺MHCII⁺⁺ (C). Para las células CD11c⁻MHCII⁻ (DCs⁻) se identificaron las CD19⁻F4/80⁻ (LB⁻, MF⁻, respectivamente, D). Finalmente se definieron los neutrófilos como Gr-1⁺SiglecF⁻ y los eosinófilos como Gr-1⁻SiglecF⁺ (E).

Con la tinción 2 se buscó profundizar en los efectos *in vivo* del EgAgB sobre monocitos y macrófagos. Esta estrategia permitió evaluar aspectos cuantitativos y cualitativos de estas poblaciones. Dentro de las células íntegras y singuletes (Figura 2.5 A y B, respectivamente) se seleccionaron aquellas CD19⁻ para descartar a los linfocitos B (LB⁻, Figura 2.5 C). Luego, se determinaron las poblaciones de LPM seleccionando las células F4/80⁺⁺Ly6C⁻. El resto de las células F4/80^{-/+}Ly6C^{-/+}, que no serían macrófagos LPM (MF LPM⁻), se analizaron en función de FSC y SSC para eliminar los eosinófilos que aparecen como una nube con bajo tamaño y mayor complejidad intracelular, obteniendo la región indicada como EOS⁻ en la Figura 2.5 E. Finalmente se definieron las poblaciones de monocitos en base a la expresión de Ly6C y MHC-II: los monocitos recientemente reclutados a cavidad peritoneal corresponden a la población Ly6C⁺⁺MHC-II⁻, pero se observaron además monocitos con varios fenotipos que corresponderían a formas de transición a macrófagos que clasificamos como Ly6C⁺MHC-II⁺, Ly6C⁻MHC-II⁺ y los macrófagos SPM Ly6C⁺MHC-II⁺ (F).



Figura 2.5. Estrategia de *gating* **para identificar los monocitos y macrófagos recuperados de cavidad peritoneal de ratón.** A las 4 y 24 horas p.e. se obtuvieron células de cavidad peritoneal y se tiñeron con anticuerpos específicos para definir las poblaciones de MC y MF, tal como se detalló en la secciones 2.10.1-3. Se ilustra la estrategia de *gating* utilizada a partir del lavado peritoneal de un ratón estimulado con EgAgB nativo, mostrando la selección en forma secuencial. Se identificaron las células íntegras (A), singuletes (B) y las células CD19⁻ (LB⁻, C). Dentro de la población LB⁻ se identificaron los MF LPM como F4/80⁺⁺Ly6C⁻ (D) y sobre el resto de las células (MF LPM⁻) se descartaron los eosinófilos (células con FSC bajo y SSC alto y variable) En este último paso se utilizó el marcador F4/80 en el eje Y del gráfico de puntos, que permitió una mejor

separación entre las poblaciones de LB y MF. Finalmente se definieron los monocitos como Ly6C^{alto}F4/80⁻ y los macrófagos como F4/80^{alto}Ly6C⁻ (D).

Por último, en la tinción 3 se pretendió evaluar los efectos del EgAgB sobre la población residente de LB, más específicamente sobre los LB1a. Se ha reportado que la población de linfocitos B1a podría reconocer a la fosfatidilcolina¹⁶, uno de los componentes que se exponen en la partícula de EgAgB. Siguiendo la estrategia inicial ya descripta, se seleccionaron los singuletes dentro de las células íntegras (Figura 2.6 A y B) y se determinó la población total de LB (CD19⁺F4/80⁻, Figura 2.6 C). Como estrategia final se utilizaron los marcadores CD11b y CD5 (Figura 2.6 D), buscando subdividir la población de linfocitos B en linfocitos LB1 (CD11b⁺) y dentro de éstos últimos los LB1a (CD11b⁺CD5⁺).



Figura 2.6. Estrategia de *gating* **para definir poblaciones de linfocitos B recuperados de cavidad peritoneal de ratón.** A las 4 y 24 horas post-estimulación se obtuvieron las células de la cavidad peritoneal de ratón siguiendo y se tiñeron con anticuerpos específicos para definir las poblaciones de linfocitos B tal como se detalló en la secciones 2.10.1-3. Se ilustra la estrategia de *gating* utilizada a partir del lavado peritoneal de un ratón estimulado con EgAgB nativo, mostrando la selección en forma secuencial. Se identificaron las células íntegras (A), singuletes (B) y LB como aquellas células CD19⁺F4/80⁻ (utilizando el marcador F4/80 en el eje Y del gráfico de puntos que permitió una mejor separación entre las poblaciones de LB y MF, C) Finalmente se definieron las subpoblaciones LB1 (CD11b⁺) y LB1a (CD11b⁺CD5⁺) dentro del total de los LB (D).

2.10.4. Análisis de datos

Todos los experimentos *in vivo* se realizaron entre 2 y 3 veces, dependiendo de la disponibilidad de EgAgB nativo y rEgAgB8/1. Los resultados referentes a las poblaciones celulares identificadas se presentan como número de células ya que el porcentaje en relación al total puede ser un parámetro confuso debido al reclutamiento y migración celular que ocurren como producto del proceso inflamatorio. El nivel de expresión de MHC-II, CD40 y CD86 para las poblaciones de DCs, LB y MC/MQ se informan como la media geométrica de la IF corregida por el correspondiente valor del FMO. Para la representación gráfica se utilizaron los valores de la mediana de cada experimento y de los experimentos en conjunto.

El análisis estadístico de los experimentos *in vivo* se realizó mediante la prueba exacta, libre de distribución (no paramétrica), de Mack y Skillings para un diseño de dos vías con números iguales de réplicas para cada lote experimental, seguida de una prueba basada en el test T de Student (empleando los rankings de los datos), con la corrección de Benjamini y Hochberg para comparaciones múltiples Los niveles de significancia se indican en cada figura.

CAPÍTULO 3

Purificación y caracterización de la composición del EgAgB nativo presente en el líquido hidático

CAPÍTULO 3: Purificación y caracterización de la composición del EgAgB nativo presente en el líquido hidático

En este capítulo se describen los resultados referentes a la caracterización de la composición química del EgAgB nativo presente en el LH (objetivo específico 1), lo cual implicó su purificación a partir de hidátides de origen bovino y suino (materiales disponibles en el laboratorio de Inmunología, Facultad de Química y Facultad de Ciencias, UdelaR) y el análisis de sus componentes proteico y lipídico. Esta caracterización resultó importante como punto de partida dado que el EgAgB es una lipoproteína compleja cuya composición podría variar en función de diversos factores, incluyendo el genotipo, la edad y el grado de adaptación del parásito al hospedero.

3.1. Puesta a punto de una nueva metodología para la purificación del EgAgB nativo a partir de LH

Como se mencionó en el capítulo introductorio, el LH es una mezcla compleja de glicoproteínas, lipoproteínas, hidratos de carbono y sales minerales derivadas tanto del parásito como del hospedero³⁸⁰. El EgAgB, a pesar de ser uno de los componentes parasitarios más abundante en este fluido, se encuentra en baja concentración, lo cual se comprueba en el perfil proteico obtenido del análisis del LH por SDS-PAGE (Figura 3.1 A, carril LH). Allí se observan como componentes predominantes proteínas de tamaño molecular compatibles con la albúmina (~65 kDa) y las inmunoglobulinas (~50 y 25 kDa, cadenas pesada y liviana respectivamente) del hospedero, y no se detecta el patrón de bandas del EgAgB (~8, 16 y 24 kDa).

Hasta el momento de iniciarse el presente trabajo la forma de obtener EgAgB en el laboratorio consistía en someter el LH a un paso inicial de cromatografía de intercambio aniónico sobre Q-Sefarosa seguido de un paso final de cromatografía de inmunoafinidad utilizando el Mo-EB7¹⁹³. Desafortunadamente no se dispuso más ni de la columna de afinidad ni del anticuerpo que se utilizó para prepararla (luego de varios intentos ninguna de las alícuotas del hibridoma creció y/o secretó el monoclonal correspondiente). Así, este trabajo de tesis comenzó con el diseño de un nuevo método de purificación del EgAgB nativo a partir de LH que buscó obtener la totalidad de las partículas lipoproteicas del EgAgB presentes en el LH, evitando el sesgo introducido por el uso del Mo-EB7 (que reconoce sólo la subunidad EgAgB8/1). Para esto, se mantuvo el paso inicial de cromatografía de intercambio aniónico sobre Q-Sefarosa, dado que resulta útil como estrategia inicial para disminuir gran parte de la albúmina e inmunoglobulinas del hospedero del LH de. La fracción eluída por cambio en la fuerza iónica, denominada QS_f, presentó un color amarillo característico de la presencia de EgAgB (asociado a algunos de sus lípidos constituyentes). Luego, tomando ventaja de la naturaleza lipoproteica del EgAgB, se sumó un paso de ultracentrifugación en gradiente de KBr, metodología comúnmente utilizada para la obtención de lipoproteínas plasmáticas³⁸¹. Como resultado de la ultracentrifugación de la QS_f, el EgAgB apareció como una banda de color amarillo/anaranjado de baja densidad de acuerdo a su posición en el tubo (denominada Ld_f, del inglés low density fraction; Figura 3.1 B). Se recuperó esta banda y se repitió el procedimiento de ultracentrifugación. La fracción Ld_f obtenida se preservó en PBS con EDTA y BHT

y en una atmósfera de nitrógeno a 4°C hasta su utilización, buscando evitar su posible oxidación y consecuente agregación.



Figura 3.1. Purificación del EgAgB nativo a partir de LH. (A) Análisis por SDS-PAGE de las fracciones obtenidas a lo largo del protocolo de purificación del EgAgB a partir de LH, utilizando cromatografía de intercambio aniónico sobre Q-Sefarosa seguido de ultracentrifugación en gradiente de KBr. Las fracciones (entre 20 y 25 µg) se separaron en geles de poliacrilamida (15%) bajo condiciones reductoras (6mM de DTT) y visualizaron por tinción con azul de Coomassie. Las flechas indican las formas monoméricas y oligoméricas que adquiere el EgAgB. La figura es representativa de la purificación de 3 lotes de LH. MPM, marcador de peso molecular; LH, líquido hidático; FT, fracción no retenida por la Q-Sefarosa (del inglés, *flow through fraction*); QS_f, fracción retenida por la Q-Sefarosa; UC, ultracentrifugación (dos rondas sucesivas 1^{ra} y 2^{da}); Hd_f, fracción de alta densidad obtenida por ultracentrifugación, Ld_f: fracción de DS_f en gradiente de KBr. La fracción QS_f se sometió a ultracentrifugación en gradiente de densidad de KBr durante 5 horas. Transcurrido este tiempo, se obtuvo una banda definida de menor densidad y de color amarillo/anaranjado correspondiente a la fracción Ld_f. Se recuperó también la fracción Hd_f no coloreada ubicada en el fondo del tubo.

Las distintas fracciones obtenidas durante el protocolo de purificación del EgAgB a partir de hidátides bovinas se analizaron por SDS-PAGE (Figura 3.1 A). La mayoría de la albúmina (banda de ~65 kDa) e inmunoglobulinas (bandas de ~50 y 25 kDa) del hospedero presentes en el LH no se retuvieron en la columna de Q-Sefarosa y aparecieron en la fracción que denominamos FT (del inglés, *flow through fraction*). En el carril correspondiente al LH se observó una banda tenue de PM aparente 8 kDa (conteniendo seguramente subunidades de EgAgB) que no llegó a detectarse en FT pero sí se hizo evidente en QS_f. En dicha fracción también se esbozó el patrón característico que adopta el EgAgB, con bandas espaciadas regularmente de PM aparente 8, 16 y 24 kDa. Luego del proceso de ultracentrifugación de QS_f la fracción de baja densidad (Ld_f) se enriqueció en los componentes correspondientes al EgAgB y la de alta densidad (Hd_f, del inglés *high density fraction*) en el resto de las proteínas del LH (que se concentraron en el fondo del tubo de ultracentrifugación). Se requirieron, al menos, dos rondas sucesivas de ultracentrifugación (ver 1^{ra} y

2^{da} UC) para lograr preparaciones de EgAgB de buena calidad (aproximadamente 98% en pureza según estimación por densitometría en base a las bandas del monómero, dímero y trímero).

A partir de la cuantificación de proteínas en el LH y las fracciones obtenidas (Tabla 3.1, en base a 1 litro de LH) surge que sólo una pequeña fracción del LH se retuvo en la Q-Sefarosa, la cual representa aproximadamente el 1.2% de su contenido proteico (entre 14 y 20 mg). Tras el paso de ultracentrifugación la mayor parte de las proteínas de QS_f aparecieron en Hd_f y representaron un 1% del contenido proteico del LH. Respecto al rendimiento de la metodología, existieron diferencias según el pool de LH de partida, probablemente asociadas al estado de fertilidad de las hidátides. Se obtuvieron entre 2.5 y 3.5 mg de Ld_f por litro de LH fértil, y entre 1.0 y 1.8 mg/L para los pooles de LH no fértiles. De acuerdo con estos datos y su predominancia en la fracción Ld_f, el EgAgB nativo representaría aproximadamente un 0.2% del total de la proteína presente en el LH.

Tabla 3.1. Purificación de EgAgB a partir de LH bovino: contenido proteico recuperado en las fracciones obtenidas y rendimiento de la nueva metodología. Se muestra la cantidad de proteína obtenida en las diferentes fracciones en base a 1 litro de LH. La determinación de proteínas se realizó mediante el kit Micro BCA (ver sección 2.2.3.1). Se estimó el % de rendimiento para cada fracción en función del total de proteína presente en el pool de LH. Los valores corresponden al rango de valores obtenidos a partir de 4 purificaciones independientes de LH fértil.

Muestra	Proteína (mg)	Rendimiento (%)		
Pool LH	1140 - 1760	100		
FT	1120 - 1740	~ 98.8		
QS _f	14 - 20	~ 1.2		
Hd _f	10 - 18	~ 1.0		
Ldf	2,5 - 3,5	~ 0.2		

Se examinó el tamaño del EgAgB nativo por dispersión dinámica de la luz (DLS, ver sección 2.4.3.4) lo cual permitió determinar el radio hidrodinámico promedio (R_H) y la distribución de tamaños de la población de partículas lipoproteicas presentes en la muestra. El análisis de Ld_f mostró un perfil polidisperso presentando 2 poblaciones mayoritarias definidas según la intensidad, con valores promedio de R_H =6.2 ± 0.3nm y R_H =112 ± 37 nm (n=4). Sin embargo, más del 98% del volumen de la muestra con capacidad de dispersar luz en el rango detectado correspondió a un pico mayoritario cuyo valor promedio fue R_H =5.8±0.3nm, indicando que la preparación es muy homogénea en su composición y apoyando las observaciones previas resultantes del análisis por SDS-PAGE. La Figura 3.2 muestra el perfil obtenido del análisis por DLS para una preparación de Ld_f representativa de las 4 preparaciones analizadas.



Figura 3.2. Análisis por DLS del tamaño de las partículas lipoproteicas presentes en Ld_f. Se grafica la distribución de las poblaciones de partículas presentes en Ld_f de acuerdo al tamaño estimado (R_H promedio) determinado según la medida de la luz dispersada por intensidad (A) y su valor ajustado por el volumen (B). Los valores corresponden al promedio de 3 determinaciones analíticas de la muestra, realizadas en forma consecutiva. Los gráficos son representativos del análisis de la fracción Ld_f obtenida a partir de 4 purificaciones independientes.

La composición de las preparaciones QS_f y Ld_f se analizó por electroforesis bi-dimensional (2Delectroforesis) acoplada a espectrometría de masas (Figura 3.3). Este trabajo se desarrolló en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica del Instituto Pasteur de Montevideo, con la colaboración de Analía Lima, Magdalena Gil y Madelón Portela. La electroforesis se realizó en condiciones reductoras siguiendo la metodología previamente ajustada por nuestro grupo de investigación⁴⁵ con las modificaciones descriptas en la sección 2.5.1.1. En la Figura 3.3 A se observa que los componentes que se separan como bandas regularmente espaciadas de 8, 16 y 24 kDa en el SDS-PAGE (Figura 3.1) dan origen a múltiples puntos (*spots*) con punto isoeléctrico (pl) entre 5 y 9 en la electroforesis bidimensional. Llamó la atención que si bien se logró una buena resolución de la muestra, en todos los ensayos realizados las proteínas no se visualizaron como spots perfectamente definidos, mostrando un aspecto difuso.

En una primera aproximación, que permitiera confirmar la identidad de los principales componentes proteicos de QS_f y Ld_f, se analizaron por espectrometría de masa (MALDI-TOF/TOF) los spots más intensos obtenidos en la 2D-electroforesis (Figura 3.3, spots 1 y 2) y algunos seleccionados al azar de diferente PM aparente que podrían corresponder a las formas oligoméricas del EgAgB. Se encontró que en ambas fracciones, QS_f (Figura 3.3 A) y Ld_f (Figura 3.3 B), el EgAgB fue el principal componente; sus subunidades se distribuyeron de forma escalonada, en concordancia con la presencia de las formas monomérica, dimérica y trimérica aún en condiciones reductoras. Se identificaron diversas subunidades del EgAgB con similar peso molecular pero distinto pl (Figura 3.3 A, rectángulo) y la presencia de oligómeros que correlacionó con componentes más ácidos. Las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/4 se encontraron en los spots 1 y 2, y en el resto de los spots correspondientes a los oligómeros se encontró principalmente el EgAgB8/1 (el EgAgB8/4 se identificó únicamente en un spot del dímero y en otro del trímero). El fraccionamiento de las proteínas mediante la aplicación del gradiente de pH permitió determinar la existencia de subunidades que se enfocaron en un amplio rango de pl, variando entre 5 y 9. Si bien el polimorfismo de los genes de EgAgB podría explicar que se

obtuvieran varios spots, el número de spots y la variación en el pl no parecerían atribuibles sólo al polimorfismo. Además, se identificaron las mismas isoformas polimórficas recorriendo el gradiente de pl, en particular para EgAgB8/1. Una hipótesis para explicar el patrón mostrado por el EgAgB en la 2D-electroforesis es que las subunidades se encuentren modificadas a nivel post-traduccional. Dentro de estas modificaciones sería posible que, en un ambiente inflamatorio y por diferentes mecanismos de oxidación, se generaran o introdujeran grupos carbonilos que podrían disminuir el pl teórico de las subunidades y facilitar la generación de oligómeros. Para examinar esta posibilidad, el EgAgB se analizó por electroforesis bidimensional y los spots proteicos se transfirieron a una membrana para evaluar la presencia de grupos carbonilos utilizando el kit comercial Oxyblot[™] (Millipore, ver sección 2.5.1.3). Los resultados mostraron una marcada presencia de grupos carbonilo asociada principalmente a la albúmina y componentes de alto PM, mientras que la oxidación fue muy modesta en los spots principales correspondientes al EgAgB8/1 y no se acentuó hacia pl menores, ni coincidió con el patrón de oligomerización (Figura 3.4). Esto indicaría que la presencia de carbonilos no explica el corrimiento en el pl observado para las variantes apolipoproteicas subunidades del EgAgB identificadas ni la formación de los oligómeros. Si bien en un análisis inicial se descartó a la fosforilación como otra posible modificación que pudiera explicar este comportamiento atípico, aún resta confirmar su ausencia así como explorar otras modificaciones post-traduccionales posibles (ver discusión).



Figura 3.3. Análisis por 2D-electroforesis de QS_f **y Ld**_f. Las fracciones QS_f (A) y Ld_f (obtenida luego de 2 ultracentrifugaciones sucesivas, B) se analizaron por 2D-electroforesis utilizando un gradiente 3-10 de pH lineal en la primera dimensión y SDS-PAGE en 15% de poliacrilamida en la segunda dimensión y realizando tinción con azul de Coomassie coloidal para visualizar las proteínas. Se analizó la presencia de componentes del parásito y del hospedero en los principales spots por espectrometría de masa (MALDI-TOF/TOF). En el panel A se señalan con flechas las regiones del gel donde se encontraron spots correspondientes al EgAgB (regularmente especiados con PM aparente 8, 16 y 24 kDa aproximadamente). Además, se marcan con un rectángulo variantes apolipoproteicas del EgAgB con similar peso molecular pero distinto pl. #1 y #2 son los principales spots correspondientes a las subunidades del EgAgB. A: albúmina del hospedero; Ag5: antígeno 5 de *Echinococcus*. En el panel B se señala el spot correspondiente a la Apo-Al co-purificada junto con el EgAgB. MPM: marcador de peso molecular. La figura es representativa de tres purificaciones independientes.

Además del EgAgB, el análisis proteómico permitió identificar otros componentes en las preparaciones analizadas. La fracción QS_f mostró contener el antígeno 5 del parásito (EgAg5) y albúmina (A en la Figura 3.3 A) e inmunoglobulinas (spots solapados con las formas triméricas del EgAgB) derivadas del hospedero, que logran minimizarse al realizar el paso de ultracentrifugación. Por otra parte, resultó interesante observar que la apolipoproteína AI bovina co-purificó con el EgAgB.

El análisis realizado mostró que el nuevo protocolo de purificación del EgAgB a partir de LH, combinando el intercambio aniónico sobre Q-Sefarosa con etapas sucesivas de ultracentrifugación en gradiente de densidad, resultó exitoso a los efectos de obtener preparaciones enriquecidas (QS_f) y con alta pureza (Ld_f, ~98%) en el EgAgB nativo, aptas para el análisis de su composición proteica y lipídica por espectrometría de masa.



Figura 3.4. Análisis de la presencia de grupos carbonilo en la fracción QS_f . Se utilizó el kit comercial OxyblotTM (Millipore). La fracción QS_f se analizó por electroforesis bidimensional sumando un paso de derivatización de los grupos carbonilo con dinitrofenilhidrazina luego del isoelectroenfoque de las proteínas. Finalmente se midió la dinitrofenilhidrazona generada mediante quimioluminiscencia. MPM, marcador de peso molecular. La figura es representativa del análisis de dos muestras independientes.

3.2. Identificación de las variantes apolipoproteicas y los ligandos hidrofóbicos del EgAgB nativo presente en el LH de origen bovino y porcino

3.2.1. Purificación del EgAgB a partir de distintos materiales parasitarios

Se purificó EgAgB a partir de LH bovino y porcino disponible en el laboratorio. Se partió siempre de pooles de LH buscando contar con muestras representativas de su composición (pooles de entre 0.7 y 2.5 litros provenientes de entre 5 y 25 hidátides). Se evaluó la existencia de variaciones en la composición del EgAgB según el estado de fertilidad de la hidátide, para lo cual se utilizó LH proveniente de hidátides fértiles y no fértiles. Para las hidátides fértiles se trabajó con material de origen bovino y suino. En base a la secuenciación de la COX1 se determinó, en colaboración con la

Dras. Mara Rosenzvit y Marcela Cucher (Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires - Buenos Aires, Argentina) que las muestras de LH utilizadas para la preparación de los pooles bovinos provenían principalmente de hidátides del genotipo G1 de *E. granulosus* s.s., y en menor medida de hidátides del genotipo G3 (*E. granulosus* s.s.) y G5 (*E. ortlepp*i). En el caso del LH suino, todas las hidátides pertenecieron al genotipo G7 de *Echinococcus canadensis*. Las fracciones QS_f y Ld_f obtenidas se utilizaron para el estudio detallado de la composición proteica y lipídica del EgAgB, respectivamente. Adicionalmente se prepararon extracciones de pooles de (PE) pulverizados con PBS, guanidina 2M y heparina 1M con el fin de analizar su composición proteica y compararla con la del LH.

3.2.2. Análisis proteómico de las preparaciones conteniendo EgAgB nativo

La caracterización Proteómica se realizó a partir de la fracción QS_f por espectrometría de masa. Se decidió utilizar esta fracción, y no la Ld_f, porque la suma de pasos sucesivos de purificación podría llevar a la pérdida de componentes poco representados. Se utilizaron dos aproximaciones experimentales: 2D-electroforesis acoplada а MALDI TOF/TOF y/o LC-MS/MS-LTQVelos/OrbitrapVelos (en colaboración con la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica del Instituto Pasteur de Montevideo y el Laboratorio Especial de Toxinologia Aplicada del Instituto Butantán, San Pablo, Brasil, respectivamente). Las búsquedas para la identificación de las proteínas se realizaron en bases de datos de los hospederos (Bos taurus y Sus scrofa, UniProt) y Echinococcus creada por nuestro equipo (Gene DB, incluyendo secuencias de polimorfismos del EgAgB de interés, ver sección 2.5.1).

3.2.2.1. Identificación proteica por 2D-electroforesis acoplada a MALDI TOF/TOF

Las fracciones QS_f provenientes de LH fértil de origen bovino (bQS_f) y suino (sQS_f) se analizaron por 2D-electroforesis y se seleccionaron 35 y 45 spots para su identificación proteica por MALDI TOF/TOF, respectivamente. En la Figura 3.5 se muestran los geles bidimensionales obtenidos indicando los spots correspondientes a las subunidades del EgAgB (paneles a la izquierda, círculos con borde grueso) y la forma oligomérica en la que se identificaron (paneles a la derecho, tabla). Los resultados obtenidos por esta técnica arrojaron similitudes y diferencias en la composición proteica del EgAgB entre los dos orígenes estudiados, bovino (genotipos G1/G3/G5) y porcino (G7). Se encontró que EqAqB8/1 y EqAqB8/4 serían las más abundantes en ambos genotipos. Sin embargo, EgAgB8/2 se identificó sólo en bQS_f (spots correspondientes al monómero) mientras que EgAgB8/3 únicamente en sQS_f (spots principales #1, #2). En la Tabla 3.2 se resumen estos resultados y se informan las isoformas polimórficas identificadas en bQSf y sQSf junto con los péptidos únicos que llevaron a la identificación de cada una. Además de las subunidades del EqAqB, se identificaron otros componentes a partir del análisis proteómico de los geles bidimensionales (Figura 3.5, círculos con borde fino en el panel izquierdo); el antígeno 5 del parásito, y varias proteínas del hospedero incluyendo la albúmina, cadenas livianas y pesadas de las inmunoglobulinas y la apolipoproteína A-I (ver Anexo 3.1 con proteínas identificadas en cada spot analizado para bQS_f y sQS_f).





Figura 3.5. Caracterización proteómica de bQS_f y sQS_f por 2D-electroforesis y MALDI-TOF/TOF. Se analizaron las fracciones bQS_f y sQS_f por 2D-electroforesis utilizando un gradiente 3-10 de pH lineal en la primera dimensión y SDS-PAGE en 15% de acrilamida en la segunda dimensión, realizando tinción con Coomassie coloidal para visualizar las proteínas. Se presentan las imágenes correspondientes a los geles bidimensionales obtenidos donde se marcaron todos los spots analizados por MALDI-TOF/TOF para la identificación proteica. Las tablas a la derecha de cada figura resumen las subunidades del EgAgB identificadas en las formas monomérica y oligomérica y los spots correspondientes (contorno en negrita). MPM: marcador de peso molecular. En el Anexo 3.1 se listan todas las proteínas identificadas en cada spot, incluyendo, además de las subunidades del EgAgB, otros componentes del parásito y del hospedero.

En cuanto a cómo afecta la fertilidad de la hidátide la composición proteica del EgAgB, se encontraron también similitudes y diferencias entre las preparaciones obtenidas de hidátides fértiles y no fértiles de origen bovino (Tabla 3.2). El EgAgB8/1 fue la principal subunidad identificada en QS_f independientemente de la fertilidad de la hidátide. Por otra parte y como ya se comentó, las subunidades EgAgB8/2 y EgAgB8/4 se encontraron en el EgAgB purificado de

hidátides fértiles pero en el caso de las hidátides no fértiles se identificó AgB8/2 en uno de los spots principales pero no AgB8/4.

Tabla 3.2. Subunidades del EgAgB y sus variantes polimórficas presentes en QS_f de hidátides bovinas (bQS_f), tanto fértiles como no fértiles, y suinas (sQS_f). Se listan las subunidades del EgAgB presentes en las distintas muestras; se detallan las isoformas polimórficas detectadas por 2D-gel electroforesis acoplada a MALDI-TOF/TOF, su masa molecular y pl (calculados utilizando herramientas de Expasy, http://web.expasy.org/compute_pi/), abundancia en función del número de spots en el/los que se identificadas en un único spot; ++: proteínas identificadas en 2 a 5 spots; +++: proteínas identificadas en más de 5 spots. d.n.c: detección no confirmada; se detectaron señales correspondientes a péptidos únicos pero la identidad de los péptidos no se pudo confirmar por fragmentación (MALDI-MS/MS).

				bQS _f		sQS _f			
				Genotipo G1/G3/G5		Genotipo G7			
Subunidades	Isoformas polimórficas (Uniprot)	Masa molecular (Da)	pI	LH no fértil	LH fértil	LH fértil	Péptidos únicos en algunas isoformas polimórficas	Péptidos únicos compartidos por todas las isoformas polimórficas	
B8/1	Q86BY8 ^b Q3YFQ5	7492.8 7518.8	9.11 9.11	-	-	+++	ELVAEGK	DDGLTSTSR, YFFER,	
EgAg	Q5EKQ4 Q9UA06 ^a	EKQ4 7589.9 8.31 JA06 ^a 7555.9 8.31 +++		+++	+++	-	MFGEVK	VVDLLK, ELEEVFQLLR	
EgAgB8/2	Q5EKP1 Q27275 ^c	7906.2 8193.5	9.42 9.37	+	+	-	-	MGQVVKK, RWGELR, DFFRNDPLGQR, NDPLGQR	
gB8/3	Q6VXZ8 ^e Q6VXZ9	7708.0 7709.0	8.80 6.79	-	-	+	HFFQSDPLGR, ELASVCQVVR, ELASVCQVVRK	-	
EgA	Q95NW6 ^d A0A068X006-1	7858.2 6712.8	8.02 6.78	-	d.n.c	-	HFFQSDPLGKK, DVACVCEMVR		
EgAgB8/4	Q6J0W7 ^h Q6Q0G2	8353,7	6,15	-	-	++	CLITR, KLSEVR, SDPLGQR, YVKDLLEEEEEEDDSK, DLLEEEEEEDDSK	DLTAICQK	
	Q6UZE2 ^f Q6UZD8 Q6UZE3 ^g	8199.6 8252.7 8171.6	6.78 7.96 6.78	-	++	-	KLGEIR , VHEVLKK , YVKDLLEEEDEDDLK, DLLEEEDEDDLK		

Las siguientes proteínas (código de acceso en Uniprot) generan productos maduros idénticos a aquellas que se indican con las letras superíndices: ^a U6JQF4 y Q5S577; ^b Q3YFQ4; ^c Q5EKN4, C1KBK4, Q6Q0H3 y Q6Q0I3; ^d Q5EKQ8, Q5EKR1, Q5EKR3 y Q95W92; ^e Q3YFP8; ^f Q6GYC5; ^g D1MH02; ^h Q6Q0G7.

3.2.2.1. Identificación proteica por LC-MS/MS

Para confirmar los resultados anteriores y obtener datos cuantitativos, se realizó el análisis de bQS_f y sQS_f obtenidas de hidátides fértiles por LC-MS/MS. Inicialmente, se utilizó el equipo LTQ-Velos (IPMon), pero lamentablemente estos estudios rindieron datos preliminares porque debido a averías en el equipo sólo se pudo realizar un único análisis de las muestras bQS_f y sQS_f, careciendo de réplicas analíticas que le den solidez a los resultados. De todas maneras, a nivel cualitativo, los resultados de este estudio coincidieron con la mayoría de los resultados descritos anteriormente, con la salvedad de que permitieron detectar la presencia del EgAgB8/3 en bQS_f, (no detectada por 2D-gel electroforesis seguido de MALDI-TOF-TOF). Por otra parte, a partir de los datos del índice emPAI se estimó la abundancia relativa de las proteínas del parásito y del hospedero presentes en las muestras, particularmente la correspondiente a las distintas subunidades del EgAgB. La Figura

3.6 ilustra estos resultados. El EgAgB representó un 49,1% y 25,9% del total de las proteínas presentes en bQS_f y sQS_f, respectivamente. Se identificaron EgAgB8/1, EgAgB8/3 y EgAgB8/4 en ambas preparaciones, mientras que EgAgB8/2 sólo se encontró en bQS_f. Se observó que si bien existen diferencias en la composición proteica de bQS_f y sQS_f, EgAgB8/1 es la subunidad mayoritaria en ambas fracciones (más del 80% del total del EgAgB). En relación a los componentes parasitarios, el antígeno 5 fue el segundo componente en abundancia en estas fracciones. Además, se identificaron péptidos correspondientes a proteínas del hospedero incluyendo la albúmina, proteínas plasmáticas relacionadas con el sistema inmune y con el citoesqueleto, enzimas y apolipoproteínas. Sólo una pequeña proporción de componentes no pudo ser identificada (6.6% en bQS_f y 0.9% sQS_f).



Figura 3.6. Composición proteica de bQS_f y sQS_f: análisis preliminar por LC-MS/MS con el equipo LTQ-Velos. Los resultados corresponden al análisis de cada muestra por LC-MS/MS empleando un EASY-nLC II nanoflow acoplado a un espectrómetro de masa LTQ-Orbitrap Velos. La identificación de las proteínas se realizó utilizando dos bases de datos, la base de datos pública NCBI (gráficos a la derecha) y la base de *Echinococcus* creada por nuestro grupo (gráficos a la izquierda). Se representan gráficamente los principales componentes del parásito y del hospedero en función de su abundancia relativa (emPAI). Los datos provienen de un único análisis de cada muestra. Como ya se comentó las averías en el equipo LTQ-Velos impidieron realizar réplicas analíticas y obtener datos cuantitativos confiables. Por tal motivo se contactó al Dr. Leo Iwai (Instituto Butantán, San Pablo, Brasil) quien colaboró en el análisis proteómico por espectrometría de masa utilizando, en este caso, un equipo Orbitrap-Velos que permitió realizar 5 réplicas analíticas para cada muestra. Asimismo se logró analizar el EgAgB purificado de hidátides no fértiles y un pool de material proveniente de 3 extracciones de PE pulverizados. Los resultados de las subunidades identificadas en cada muestra, incluyendo sus isoformas polimórficas, se muestran en las Tabla 3.3.

Los resultados proteómicos alcanzados apuntan a la existencia de diferencias en la expresión de subunidades entre bQSf y sQSf, particularmente a nivel del EgAgB8/2 que no se detectó en sQSf como sucedió en los análisis anteriores. Nuestro trabajo proteómico³⁸² apoya resultados obtenidos por otros autores que proponen que EqAqB8/2 es un pseudogen en el genotipo G7. Para las demás subunidades se observaron variaciones entre los distintos materiales analizados en cuanto a las isoformas polimórficas identificadas y su abundancia relativa dentro de la totalidad de las proteínas de EgAgB identificadas (riBAQ). De todas maneras, EgAgB8/1 fue ampliamente mayoritaria en todas las muestras, representando más del 90% y 70% en las hidátides bovinas (fértiles y no fértiles) y suinas, respectivamente. También se amplió la descripción inicial de las subunidades identificadas en el LH no fértil ya que no sólo se encuentran presentes EgAgB8/1 y EgAgB8/2, sino que también se lograron detectar y cuantificar EgAgB8/3, EgAgB8/4 y EgAgB8/5. Se procesó, además, un extracto derivado de un pool de PE de origen bovino (obtenido por solubilización de los PE con fuertes agentes disociantes), en el cual se identificaron las subunidades EgAgB8/1, 3 y 4. Sin embargo, no resultó sencillo comparar la composición de este extracto con la correspondiente a la fracción bQS_f ya que no se practicó ningún paso de purificación que pudiera ayudar a detectar componentes presentes en baja proporción. De hecho, este extracto contenía una mezcla heterogénea de componentes parasitarios, con una concentración proteica aproximadamente 4 veces superior a la de las muestras provenientes de LH, lo cual podría afectar la identificación de componentes minoritarios (como serían algunas variantes de las subunidades del EgAgB).

Además, resulta interesante resaltar la presencia en bQS_f y sQS_f de diversas apolipoproteínas derivadas de lipoproteínas del hospedero (LDL y HDL, ver Tabla 3.4). En particular se identificó la apo-AI, que se había detectado también por 2D-electroforesis tanto en la fracción QS_f como en la Ld_f (aumentada en la última). La existencia de estos componentes en el LH confirma la entrada de lipoproteínas del hospedero hacia el interior de la hidátide.
Tabla 3.3. Caracterización por LC-MS/MS de las subunidades proteicas presentes en el EgAgB de hidátides bovinas fértiles y no fértiles, hidátides suinas y PE. Se analizaron por LC-MS/MS las fracciones QS_f obtenidas a partir de los diferentes materiales parasitarios, utilizando un equipo Orbitrap-Velos. Se detallan las subunidades del EgAgB, sus isoformas polimórficas y la masa molecular y el pl de cada una (calculados utilizando herramientas de Expasy, http://web.expasy.org/compute_pi/). Se expresa la abundancia de cada isoforma en función de la intensidad total registrada por espectrometría de masa en base logarítmica (iBAQ, correspondiente al valor medio de quintuplicados con una desviación estándar relativa < 1.1%) y en función de la proporción (riBAQ, % del total de las isoformas polimórficas identificadas) junto con la cobertura de secuencia entre paréntesis (%CO, representa el porcentaje de cobertura de los péptidos identificados en base a la secuencia proteica total). Se describen los péptidos únicos utilizados para la identificación.

	səbsbinu	qns	τ/:	88 <u>6</u> 4 <u>6</u> 3		2\88 <u>6</u> 4 <u>6</u> 3	٤/	880A	63	₽/I	886A <u>6</u> 3		s/i	38 <u>6</u> Å	63	se cio
	Isoformas polimórfic as (Ilninert)		Q86BY 8 ^b Q3YFQ5	Q5EKQ4 Q9UA06ª	Q3YFP9	Q5EKP1 Q27275 ^c	Q6VXZ8 ^e Q6VXZ9	Q3YFP3	Q95NW6 ^d A0A068X006-1	Q6J0W 7 ^h Q6Q0G2	Q6UZE2 [′] Q6UZD8	Q6UZE3 ⁹	Q1EQ64	D1MH21 ¹	Q5EKP9	uientes nonteías (n
	Masa molecular (Da)	(80)	7492.8 7518.8	7589.9 7555.9	7476.7	7906.2 8193.5	7708.0 7709.0	7740.1	7858.2 6712.8	8353,7	8199.6 8252.7	8171.6	7455.7	7499.7	7889.3	uímem de adhe
	Id		9.1 9.1	8.3 8.3	9.1	9.4 9.4	8.8 6.8	8.8	8.0 6.8	6,1	6.8 8.0	6.8	8.1	8.1	9.2	seión de Ha
	LH no fértil			28.1 / 95.57 (53.5) *		19.5 / 0.25 (37.7) *	1		22.4 / 1.84 (33.9)	22.6 / 2.11 (27.3)	1		-		19.4 / 0.23 (14.7)	inmt) deneran productos m
bQS _f Genotipo G1/G3/G5	LH férti	IBAQ / riBA		29.1 / 92.11 (72.6) *	I	20.9 / 0.31 (60.6) *	·	22.5 / 0.95 (24.6) *	25.2 / 6.17 (50.2) *	20.6 / 0.25 (23.1)	18.4 / 0.06 (78.6) *	19.0 / 0.08 (76.8) *	-	18.7 / 0.07 (17.3)		adime idéntione a adialae
	Protoescólex	Q (%CO)		24.1 / 81.28 (26.9)			1	-	18.9 / 2.21 (15.2)	21.8 / 16.51 (14.3)	1	-	-		-	ate se indican mo las lat
sQS _f Genotipo G7	LH fértil		27.7 / 71.00 (55.0) *	ı			25.2 / 13.20 (49.2) *		ı	25.5 / 15.50 (42.2) *	1	-	19.8 / 0.30 (8.0)		-	v hallen
	Péptdos únicos en algunas isoformas polimórficas		•	SVMKMFGEVK, VVDLL KELEEVFQLLRKMFGE, VKYFFER, GLIAEGE	1	AHMGQV/K, AHMGQV/KK, DFFRUPLGQR, NDPLGQA, LVALGNDLTAICQK, YVKNLVEEK, YVKNLVEEKDDDSK, NLVEEKDDDSK	ELASVOQWR	ELASVOQVVRK	DDDDDEVTK, DVASVŒMVR, HFFQSDPLGK, HFFQSDPLGKK	DFFRSDPLGQR, YVKDLLEEEEEDDSK, DLLEEEEEEDDSK	SDPLGQKLVALGR	SDPLGQKLAAL GR			EVASVCQMVR	OCSST7. B OBVEON: COSEMNA CIVERNA DEDO
	P éptidos únicos co por todas las isoforma		DPLGQK/VDLLKELEEVFQLLR , ELEEVFQLLR, , ELEEVFQLLR,	WDLLKELEEVFQLLR, WDLLKELEEVFQLLR, VVDLLKELEEVFQLLRK			DDDDEVTK, HFFQSDPLGR, NILI DFAF				LGEIRDFFR, DFFRSDPLGQK, SDPLGQK, LQLKVHEVLK, VHEVLKK,	YVKDLLEEEDEDDLK, DLLEEEDEDDLK		,		H3 V DEODI3: ^d DEEKOR DEEK
	mpartidos s polmórficas			YFFERDPLGQK DPLGQK/VDLLK							DLTAIQCK			I		D1 OSEKD3 V

ich (sh 5 4, עפעטהט א עפעטנט; ך ל ţ, 5 . Ļ Q95W92; [@] Q3YFP8; ^f Q6GYC5; ^g D1MH02; ^h Q6Q0G7; ⁱ U6JQF8 y Q1EQ65

El set de péptidos únicos que permitió identificar EgAgB8/3 en bQS; sugiere que ambos genes, EgrG_000381600 y EgrG_000381700, podrían expresanse.

Según el genoma de E. caradensis (disponible en http://parasite.wombase.org) al que pertenece el genotipo G7, las proteínas identificadas como Q86BY8/Q3YFQ5, Q6Q0G7/Q6Q0C2 y Q1EQ64 son productos de los genes ECANG7_10738, ECANG7_09982 y ECANG7_10674, respectiviamente.

las	e	, la	
con	õ	nica	
das	idas	arítr	
fica	iona	log	
lenti	elac	ase	
as io	as r	en t	
teín	lleuf	sa	
Pro	y ac	Ш	
MS.	rias	ab e	
MS/	ritaı	etri	
-	nayc	rom	
por	as n	pect	
dos	iteín	r es	
nina	pro	od .	
tem	0-11	rada	
, de	as 1	egist	
õ	an	al re	
Sf y	e list	tot	
d	s. Se	idad	
o de	Velo	tens	IJ.
ídic	rap-	a in	ació
o lip)rbitı	no	ntific
olism	8	to to	a ide
tabc	equik	in	on la
me	nn	ado)	itier
os al	opu	olucr	erm
nad	lizar	invo	ne p
acio	r, uti	star	os q
/ rel	crofc	ía e	únic
SOL	us s	podr	dos
oritaı	S/SU	gB)épti
nayc	taur	EgA	de p
OS L	Bos	e	dad
oteic	s y	cua	canti
s pro	рос	n el	/ la (
ante	inocu	o (e	icia y
DOD	Ech	idic	cuer
mo	atos	o lip	e se(
4 . C	e d	lism	ra d(
la 3.	es d	abo	ertu
Tab	bas	met	cob

						bQSf			sQSf	
					Gen	otipo G1/G3/	65		Genotipo G7	
		Proteína	Entrada GeneDB	Masa (Da)	Intensidad	Cobertura de secuencia	Péptidos únicos	Intensidad	Cobertura de secuencia	Péptidos únicos
		Inhibidor de proteinasa I 25 cistatina	Egr.G_000849600.1	30819	24,267	46	6	25,2956	32	9
	sei	Alfa manosidasa lisosomal	Egr.G_000704400.1	118289	24,0914	17	15	25,3037	19	13
	ret	Catepsina d aspartil proteasa lisosomal	Egr.G_000970500.1	47109	24,255	19,3	7	25,5149	20,2	7
	ino	Laminina	Egr.G_001132400.1	395163	22,2183	12,2	10	26,425	13,8	37
9	λeι	Proteína de dominio egf	Egr.G_000255800.1	266890	21,3211	13,9	S	26,6317	14,5	25
sn:	u s	14-3-3 proteína beta: alfa	Egr G_000364000.1	27777	22,137	13,5	2	22,7798	22,3	<mark>۳</mark>
220	euj	Peroxidasina	Egr.G_000733600.1	149565	22,6091	6'6	10	27,5173	30,9	29
00	ote	Heparán sulfato específico de la membrana basal	Egr.G_000701800.1	96032	25,4676	24,5	15	27,6414	31,4	20
ON	ы	Heparán sulfato específico de la membrana basal	Egr.G_000575900.1	859886	27,4784	21,7	128	28,5333	17,4	105
ЕСНІ		Glycoproteína Antígeno 5	EgrG_000184900.1	54874	29,4673	66,3	25	29,7936	60,9	21
	0 W									
	eilo Doit	Proteína de unión a ligando hidrofóbico	Egr.G_000549200.1	9880	22,3571	18,3	2			
	det9M Dìqil	Proteína N terminal de transporte de lípidos	EgrG_000684200.1	344218	24,6588	11,3	23	22,7638	3,5	10
		Protrombina	THRB_BOVIN	70506	22,2317	18,2	9			,
		Alfa-actinina	ACTN4_BOVIN	104928	21,2752	10	ю	22,8011	16	4
		14-3-3 proteina epsilon	1433E_BOVIN / I 3LLI8_PIG	29173 / 26671	22,5915	32	S	21,5012	28	4
	sei	Región constante de cadena pesada de IgA	K7ZRK0_PIG	36614				27,3422	62,5	11
	iet	Proteina no caracterizada	I3LAQ0_PIG	13162				27,4367	45	7
	µo/	Actina citoplasmática 1/Actina citoplasmática 2	ACTB_BOVIN, ACTG_BOVIN	41736, 41792	23,448	31	4	25,7888	40	5
	€e u	Calmodulina	CALM_BOVIN	16837	24,7506	48,4	9	21,0891	32,7	m
C	u si	14-3-3 proteína zeta/delta	14332_BOVIN / F22558_PIG	27745 / 28078	22,574	34	5	23,3289	36	9
983	euj	Proteina no caracterizada	F1MYX5_BOVIN	70112	23,0593	35	4	•	•	•
D	ote	Vimentina	VIME_BOVIN	53727	24,5496	25,4	m	•	•	
Be	ч	Proteina no caracterizada	FISS24_PIG	272274				28,9071	37,1	17
so		Complemento C3	CO3_BOVIN / CO3_PIG	187253 / 186806	23,3298	22	19	29,1795	51	22
н		Región constante de cadena pesada de IgM	K7ZJP7_PIG	49282	•	•	•	29,5463	67,3	17
		Albúmina	ALBU_BOVIN / ALBU_PIG	69293 / 69692	28,3878	60	4	31,6512	62,4	32
	ou	Apolipoproteína A-I	APOA1_BOVIN / APOA1_PIG	30276 / 30325	22,6399	24,9	2	27,0344	41,9	7
	nsil 02	Apolipoproteína E	APOE_PIG	36599				24,1006	23,3	9
	o q	Apolipoproteína M	APOM_PIG	21241				21,5253	21,8	2
	etə Til	Apolipoproteína D	APOD_BOVIN	21401	21,9735	20,6	m	ŀ	•	
	м	Apolipoproteína B-100	Q29021_PIG	30005				21,7098	3,2	9

3.2.3. Identificación de los ligandos hidrofóbicos del EgAgB nativo en los distintos materiales parasitarios

Para completar la caracterización de la composición del EgAgB se analizaron sus ligandos hidrofóbicos. Los lípidos presentes en el EgAgB se obtuvieron por extracción con solventes orgánicos, y posteriormente se identificaron mediante cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC, de doble desarrollo para evaluar los componentes polares y neutros). Para esta instancia se utilizaron las fracciones de EgAgB con mayor grado de pureza (Ld_f) obtenidas por ultracentrifugaciones sucesivas de QS_f. De esta forma se buscó minimizar al aporte de lípidos por parte de otros componentes del LH. Se analizaron tres pooles provenientes de hidátides bovinas y uno de porcinas (bLd_f y sLd_f). En concordancia con resultados descritos anteriormente por nuestro grupo⁴⁵, el EgAgB de ambos orígenes contiene lípidos polares y neutros; se observa la presencia de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y esteroles (banda compatible con colesterol), ácidos grasos libres, triacilglicéridos, metil-ésteres de ácidos grasos y ésteres de esteroles, respectivamente. Si bien bLd_f y sLd_f no se diferencian en la composición del EgAgB a nivel de las clases lipídicas, las abundancias relativas entre ellas parecieron diferir en algunos casos. Particularmente la fosfatidilcolina y los triacilglicéridos parecen estar aumentados en sLd_f con respecto a bLd_f (Figura 3.7).



Figura 3.7. Caracterización por HPTLC de las clases lipídicas de bLd_f y sLd_f. Se extrajeron los componentes hidrofóbicos de las fracciones bLdf (tres réplicas biológicas) y sLd_f por extracción con solventes orgánicos, utilizando la técnica descripta por Folch²⁰⁵. Se sembraron las muestras y el estándar (~10 µg) en placas de HPTLC previamente activadas con calor. La resolución de los lípidos se realizó empleando la técnica de doble desarrollo que permitió la caracterización conjunta de las clases polares y neutras. Las bandas se visualizaron utilizando vapor de iodo y las imágenes de las placas se digitalizaron mediante un escáner convencional. Std: estándar conteniendo lípidos neutros y polares; PC: fosfatidilcolina; PS: fosfatidilserina; PI: fosfatidilinositol; CLP: cardiolipina; PE: fosfatidiletanolamina; CHO: colesterol, FA: ácidos grasos libres, TAG: triacilglicéridos; FAMEs: metil-esteres de ácidos grasos; SE: ésteres de esteroles. La figura es representativa de triplicados analíticos.

Buscando profundizar en la descripción de los ligandos hidrofóbicos que el EgAgB une fisiológicamente se llevó a cabo un análisis lipidómico por espectrometría de masa en colaboración con el Dr. David Watson (Strathclyde University, Glasgow-Reino Unido). Se analizaron las extracciones lipídicas obtenidas a partir de la fracción Ld_f proveniente de hidátides bovinas fértiles y no fértiles; desafortunadamente el material disponible de hidátides suinas no fue suficiente para realizar este análisis. En un primer estudio, se empleó una columna HILIC (del inglés, *hydrophilic interaction liquid chromatography*), utilizando el modo positivo para la identificación de lípidos polares (principalmente fosfolípidos) y el modo negativo para la de lípidos neutros (principalmente ácidos grasos), y realizando 2 réplicas analíticas por muestra. Los

resultados referentes al contenido de los 50 lípidos neutros y polares más abundantes se representan esquemáticamente como mapas de abundancia comparativa (*heatmaps*) en la Figura 3.8 y se listan en la Tabla S3.2.

Los resultados mostraron que la composición lipídica de la fracción Ld_f difirió entre hidátides fértiles y no fértiles principalmente a nivel de los lípidos neutros identificados. Los 5 principales ácidos grasos en Ld_f de hidátides fértiles fueron el ácido docosapentaenoico, eicosatetraenoico, octadecenoico, docosatetraenoico y oxo-octadecanoico. Diferencialmente, en Ld_f de hidátides no fértiles primaron los ácidos octadecanoico, oxo-nonanoico, docosapentaenoico, oxo-octanoico e hidroxi-nonanoico. Los componentes que mostraron una abundancia relativa superior a 10 en Ld_f proveniente del LH fértil (relación F/NF, Tabla S3.2) fueron los ácidos grasos docosapentaenoico, eicosateraenoico, docosahexaenoico, docosapentaenoico y octadecadienoico. Cabe señalar que las formas oxidadas de varios ácidos grasos se encontraron más representadas en el EgAgB derivado de hidátides no fértiles. Además llamó la atención que se encontró mucho más representado el quinurenato (1145 veces) en la muestra de Ld_f derivada de LH fértil (relación F/NF, Tabla S3.2), pero este resultado no fue reproducible (no se detectó en una réplica biológica ni en preparaciones de EgAgB de mayor pureza). La composición de los fosfolípidos fue relativamente similar entre Ld_f de hidátides fértiles y no fértiles.

Posteriormente, y para establecer posibles diferencias en la composición lipídica de Ld_f asociadas al proceso de ultracentrifugación sucesiva, se evaluó la fracción Ld_f (procedente de hidátides fértiles) tras una ronda y dos rondas de ultracentrifugación (1^{ra} UC y 2^{da} UC, respectivamente). El análisis se realizó mediante el uso de dos columnas, HILIC para lípidos polares y C4 para lípidos neutros, que permitieron mejorar la calidad de los resultados. Los resultados referentes al contenido de los 50 lípidos neutros (principalmente ácidos grasos, de triplicados analíticos) y polares (principalmente fosfolípidos, de duplicados analíticos) más abundantes se representan como *heatmaps* en la Figura 3.9 y se listan en la Tabla S3.3. Las muestras Ld_f derivadas de la 1^{ra} UC y 2^{da} UC mostraron una composición similar, sobre todo considerando los lípidos que predominan en cada preparación (Figura 3.9). De todas maneras, se observaron algunas diferencias en la abundancia relativa de los lípidos recuperados, sugiriendo que hubo enriquecimiento o pérdida de algún ácido graso o fosfolípido. En la Tabla S3.3 se lista la relación de abundancia relativa entre muestras (1^{ra} UC/2^{da} UC) de la cual se desprende que el enriquecimiento o pérdida de las especies lipídicas fue como máximo de alrededor de 4 veces.



Figura 3.8. Análisis comparativo de los componentes hidrofóbicos presentes en Ld_f derivado de hidátides fértiles y no fértiles. Los lípidos presentes en las preparaciones Ld_f provenientes de hidátides fértiles y no fértiles (según se indica) se extrajeron con solventes orgánicos utilizando el método de Folch y se analizaron por HPLC-MS/MS utilizando una columna HILIC (duplicados analíticos). Los resultados se representan separadamente para los lípidos neutros y polares utilizando *heatmaps* (GraphPad), a los efectos de visualizar similitudes y diferencias en el perfil lipídico entre las muestras. Los paneles muestran la abundancia relativa de las especies lipídicas normalizadas, según la escala de colores indicada.

En conjunto, la caracterización proteómica realizada a partir de distintos materiales parasitarios aportó información sobre la expresión de las subunidades del EgAgB y sus variantes polimórficas en el LH derivado de hidátides con distinta fertilidad y de distinto origen. La composición del EgAgB fue similar entre hidátides bovinas fértiles (*E. granulosus* s.s., principalmente) y no fértiles, conteniendo principalmente EgAgB8/1 pero también EgAgB8/2-5 aunque con variaciones en proporción. En el EgAgB derivado de hidátides suinas (*E. canadensis*, genotipo G7) también predominó EgAgB8/1 y se identificaron EgAgB8/3-5 pero no EgAgB8/2, lo que concuerda con que *EgAgB2* es un pseudogen en G7. En relación a la caracterización lipídica, se confirmó la compleja composición de lípidos polares y neutros que presenta el EgAgB nativo. Pudo determinarse que en la lipoproteína derivada de LH de hidátides bovinas predomina la PC dentro de los lípidos polares y hay más abundancia de algunos lípidos neutros en Ld_f obtenida de material fértil en relación al

no fértil. Finalmente, no se observaron cambios sustanciales en la composición del EgAgB asociados al proceso de ultracentrifugación sucesiva que permite a su purificación.



Figura 3.9. Análisis comparativo de los componentes hidrofóbicos presentes en Ld_f obtenido por una o dos rondas de ultracentrifugación en gradiente de KBr. Los lípidos presentes en las preparaciones Ld_f (proveniente de hidátides fértiles) sometida a una o dos rondas de ultracentrifugación (1^{ra} UC y 2^{da} UC) se extrajeron con solventes orgánicos utilizando el método de Folch y se analizaron por HPLC-MS/MS utilizando las columnas HILIC y C4 (duplicados y triplicados analíticos, respectivamente). Los resultados se representan separadamente para los lípidos neutros y polares utilizando *heatmaps* (GraphPad), a los efectos de visualizar similitudes y diferencias en el perfil lipídico entre las muestras. Los paneles muestran la abundancia relativa de las especies lipídicas normalizadas, según la escala de colores indicada.

CAPÍTULO 4

Estudio de la interacción del EgAgB con células del hospedero presentes en la interfaz hospedero-parásito

CAPÍTULO 4: Estudio de la interacción del EgAgB con células del hospedero presentes en la interfaz hospedero-parásito

En este capítulo se describen los estudios sobre la capacidad de unión del EgAgB nativo a blancos celulares relevantes que pudieran estar presentes en la interfaz hospedero-parásito, en particular a macrófagos y monocitos. Asimismo se estudió la contribución del componente proteico y lipídico a la unión, y se buscó avanzar en la identificación de los blancos moleculares ligados a las interacciones observada (objetivo específico 2). Para ésto se realizaron ensayos de unión, en base a una metodología ajustada previamente en nuestro laboratorio basada en el revelado de la unión a las células blanco por citometría de flujo³⁷⁷ (detallados en la sección 2.6). Se utilizaron varias preparaciones celulares, incluyendo la línea THP-1 y células primarias de ratón. En relación a la obtención de EgAgB, se purificó mayormente de pooles de LH no fértil debido al tipo de material parasitario disponible en ese momento en el laboratorio. Concretamente se utilizaron 6 preparaciones independientes de EgAgB, 5 derivadas de LH no fértil con las que se realizaron todos los ensayos que se muestran en las figuras de este capítulo, y 1 de LH fértil para aquellos ensayos en los que se indica.

4.1. Análisis de la capacidad de unión del EgAgB nativo a macrófagos y monocitos THP-1

Inicialmente se utilizó como modelo celular monocitos y macrófagos diferenciados a partir de la línea celular humana THP-1 y para el revelado de la unión el anticuerpo Mo-EB7 que reconoce el EgAgB8/1, principal subunidad de la partícula nativa de acuerdo con la caracterización proteómica realizada. Los resultados obtenidos para estos ensayos se resumen en la Figura 4.1, donde se observa que el EgAgB nativo se unió a ambos tipos celulares. En el panel A se muestra, a través de un histograma representativo, la distribución de la población de monocitos THP-1 de acuerdo a su fluorescencia. Se observó un aumento, dependiente de la dosis, de la fluorescencia de las células incubadas con EgAgB en relación con el nivel basal determinado con el control de vehículo (PBS_{E-B}, histograma en gris). Los datos compilados para cuatro experimentos independientes se representan en el gráfico de barras del panel B, dónde se observa un aumento significativo en el índice de unión del EgAgB nativo, que también reflejó la dependencia con la dosis utilizada en estos ensayos. Se obtuvieron gráficos similares para el caso de los macrófagos THP-1, como se ilustra en los paneles C y D. Los resultados indican que el EgAgB nativo es capaz de unirse a los monocitos y los macrófagos THP-1 confirmando los datos previamente obtenidos por³⁷⁷.

Estos resultados sugieren la presencia de uno o más receptores capaces de reconocer al EgAgB en los monocitos y macrófagos. Por otro lado, al comparar la unión entre ambos tipos celulares, se observa que el índice de unión fue mayor en el caso de los macrófagos para todas las concentraciones de EgAgB utilizadas, sugiriendo que el EgAgB nativo presenta una mayor interacción con los macrófagos. Esto podría deberse tanto a un mayor nivel de expresión del/los

receptor(es) que une el EgAgB o a la expresión de receptores adicionales o diferentes en los macrófagos.





Figura 4.1. Unión de EgAgB nativo a monocitos y macrófagos THP-1. Las células se incubaron con cantidades crecientes de EgAgB nativo (1, 5 y 10 µg/mL) y se reveló la unión por citometría de flujo, empleando para el revelado el anticuerpo monoclonal anti-EgAgB8/1 (Mo-EB7) seguido de un anticuerpo anti-IgG/IgM-FITC. (A) y (C) Histogramas correspondientes a los monocitos y macrófagos THP-1, respectivamente, incubados con el EgAgB o sus respectivos controles: vehículo (PBS_{E-B} en color gris), isotípico (línea rayada) o sin EB7 (s/EB7, línea punteada). Los resultados son representativos de tres experimentos independientes con triplicados analíticos. (B) y (D) Indice de unión de EgAgB para monocitos y macrófagos THP-1. Este índice se calculó como el cociente entre la intensidad de fluorescencia de cada muestra sobre la intensidad de fluorescencia del control correspondiente al vehículo; por esta razón la barra en gris del PBS corresponde a un índice de unión=1. Los resultados se expresaron como el promedio \pm SEM de cuatro experimentos independientes con duplicados analíticos. (*) sobre las barras indica diferencias significativas respecto al control (ANOVA de una vía y prueba de Dunnett, *p< 0.05, **p< 0.01) y (*) sobre corchetes indica diferencias significativas entre datos (ANOVA de una vía y prueba de Tukey, * p < 0.05; ** p < 0.01).

Adicionalmente se realizaron ensayos utilizando un amplio rango de concentraciones de EgAgB (20 a 350 µg/mL) y OVA como control para obtener las curvas de saturación de la unión del EgAgB a monocitos y macrófagos. En este caso se utilizó EgAgB purificado de LH no fértil y fértil. Debido a la escasa disponibilidad del Mo-EB7 fue necesario buscar una nueva estrategia para revelar la unión del EgAgB a las células. En este sentido, las preparaciones a evaluar se acoplaron covalentemente a biotina (EgAgB-B/OVA-B) en condiciones que permitieran generar un máximo de seis residuos de lisinas biotiniladas por molécula, intentando evitar una perturbación significativa de la estructura de la proteína. Se empleó esteptavidina-FITC para la detección y amplificación de la señal. El EgAgB nativo derivado de LH no fértil mostró curvas de unión a monocitos y macrófagos similares, donde existió una respuesta dependiente de la dosis con saturación a los 300 y 250 µg/mL, respectivamente (Figura 4.2 A y C). Con el objetivo de estimar la fuerza de unión se utilizaron diversos modelos de ajuste con el software GraphPad, encontrando que el que mejor ajustó los datos fue el de "saturación con unión a un sitio específico" (R²=0,992, Figura 4.2 B y D). A partir de este modelo se determinaron las constantes de disociación aparente (Kd) para la interacción con monocitos y macrófagos siendo de 83 \pm 5 y 79 \pm 4 μ g/ml, respectivamente, o sea valores en el entorno de 0,3 µM, considerando una masa molecular promedio para la lipoproteína nativa de 230 kDa⁴⁵. En cambio, la interacción de estas células con OVA-B, mostró un índice de unión significativamente menor (Figura 4.2 A y C) con una Kd de 193 \pm 22 y 323 \pm 62 µg/ml en su interacción con monocitos y macrófagos, respectivamente, lo cual corresponde a valores de 3,9 y 7,3 μ M, o sea un orden de magnitud mayor que para el EgAgB. Cabe mencionar que las preparaciones de EgAgB nativo contienen una mezcla heterogénea de partículas lipoproteicas, con masas moleculares que varían entre los 200 y los 400 kDa, por lo cual la estimación de la Kd de la unión corresponde a valores promedio. Como se muestra en la Figura S4.1, el índice de unión registrado para el EgAgB purificado de LH fértil fue similar al derivado de LH no fértil, mostrando saturación a 250 µg/mL y exhibiendo una Kd de 86 ± 3 µg/ml (siendo 367 \pm 64 µg/mL para la OVA).

Para evaluar la especificidad de la unión entre el EgAgB y los monocitos y macrófagos se realizaron ensayos de competencia utilizando la concentración mínima necesaria de EgAgB-B para alcanzar la saturación (250 µg/mL) y concentraciones crecientes de EgAgB sin marcar (alcanzando relaciones de 0,5:1 hasta 4:1 entre el EgAgB sin marcar y el EgAgB-B). En paralelo, se testeó la competencia entre el EgAgB-B/OVA-B y la OVA fría como control. El EgAgB sin marcar compitió con el EgAgB-B por la unión a monocitos y macrófagos (Figura 4.3 A y B, respectivamente). Por el contrario, no se observó competencia entre la OVA sin marcar y la OVA-B por la unión a dichas células, ni tampoco entre la OVA sin marcar y el EgAgB-B. En conjunto, los resultados indican que los monocitos y macrófagos son capeces de unir el EgAgB de forma específica, sugiriendo la presencia de al menos un receptor de superficie involucrado en la interacción.

Monocitos



Proteína biotinilada (µg/mL)



Proteína biotinilada (µg/mL)



Figura 4.3. Ensayos de competencia en la unión del EgAgB nativo a monocitos y macrófagos. Las células se incubaron con una concentración fija (250 μ g/mL) de EgAgB-B y se estableció la competencia mediante el agregado de concentraciones crecientes (125, 250, 500 y 1000 μ g/mL) de EgAgB sin marcar (barras naranjas) o de OVA sin marcar (sólo a 1000 μ g/mL, barras naranjas con patrón punteado en negro) como control. Por comparación, se realizó la competencia entre OVA-B y OVA sin marcar (barras grises). Se reveló la unión por citometría de flujo empleando estreptavidina-FITC. Se grafica el índice de unión para monocitos (A) y macrófagos (B) correspondiente al promedio \pm SEM de triplicados analíticos; las figuras son representativas de tres experimentos independientes. (*) y (#) Indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control con OVA-B (control de unión inespecífica) y respecto al EgAgB-B (control de máxima unión), respectivamente (ANOVA de una vía y prueba de Tukey, p < 0.05).

4.2. Análisis de la capacidad de unión del EgAgB nativo a células peritoneales de ratón

En un enfoque paralelo, que permitiera comparar la interacción del EgAgB entre monocitos y macrófagos y otros tipos celulares, se llevaron a cabo ensayos de unión empleando células primarias de ratón obtenidas a partir de una respuesta inflamatoria aguda en el peritoneo (48 horas post-estimulación con AIF, ver sección 2.6.2.3). Como control se empleó OVA-B en las mismas condiciones. Se analizó la unión de EgAgB nativo-B/OVA-B a poblaciones linfoides y no linfoides. Como se observa en los paneles superiores de la Figura 4.4, se diferenciaron las poblaciones considerando el conjunto de células seleccionado en A. Los monocitos/macrófagos se identificaron de acuerdo a la expresión en membrana de la proteína F4/80³⁷⁸. Dentro de las células F4/80⁺ encontramos células con baja expresión de este marcador derivadas del reclutamiento de monocitos al tejido (monocitos inflamatorios) y poblaciones de macrófagos con diferente morfología, origen y funcionalidad (SPM y LPM). En el conjunto de las células F4/80 negativas (F4/80⁻) se seleccionaron los linfocitos y aquellas células no linfoides de acuerdo a los valores de dispersión frontal (FSC) y dispersión lateral (SSC) de la luz (paneles B y C, respectivamente). En nuestra experiencia, la población F4/80⁻ no linfoide es heterogénea e incluye células inflamatorias, principalmente neutrófilos y monocitos, y células dendríticas. En el momento de realizar estos ensayos no se contó con un citómetro que permitiera el análisis de más de dos fluorocromos ni con anticuerpos específicos para diferenciar todas estas poblaciones.



Figura 4.4. Unión del EgAgB nativo a células peritoneales de ratón. La unión del EgAgB nativo a células peritoneales de ratón se evaluó empleando células recuperadas de un infiltrado inflamatorio peritoneal inducido por invección de AIF durante 48 horas. Los monocitos inflamatorios y macrófagos se seleccionaron mediante tinción con el anticuerpo anti-F4/80 conjugado a ficoeritrina (PE). (A) Gráfico de puntos de dispersión frontal (FSC) y dispersión lateral (SSC) de la luz. Se seleccionó el conjunto de células a analizar, eliminando los eventos de pequeño tamaño (FSC menor a 200). (B) Histograma de la población celular en función de la fluorescencia de PE. Para determinar el umbral de fluorescencia correspondiente a las células F4/80 negativas (F4/80) se midió la fluorescencia producida por la incubación con un anticuerpo isotipo control, IgG2a kappa de ratón conjugado a PE (sombreado en gris). En negro se muestra el histograma obtenido empleando el anti-F4/80-PE; se consideraron las células F4/80 positivas (F4/80 $^{+}$) como aquellas que presentaron fluorescencia mayor a la del isotipo control. (C) Gráfico de puntos FSC y SSC de la población de células F4/80⁻; se indican los linfocitos y el conjunto de células no linfoides. (D) Indice de unión del EgAgB nativo (naranja) y OVA (gris) a monocitos inflamatorios (infl.)/macrófagos (barras sin relleno), a células no linfoides (barras con cuadrillé negro) y a linfocitos (barras con líneas negras en diagonal). Se emplearon EgAgB nativo-B y OVA-B (20, 50 y 100 µg/mL) y la unión se reveló por citometría de flujo empleando estreptavidina-FITC. Los resultados se expresan como el promedio ± SEM de tres experimentos independientes con duplicados analíticos. (*) Indica diferencias estadísticamente significativas respecto al control con OVA (ANOVA de una vía y prueba de Dunnett, p<0,05). (#) Indica diferencias estadísticamente significativas entre la unión a monocitos/macrófagos y la unión a linfocitos (ANOVA de una vía y prueba de Tukey, p < 0,05).

Como se desprende de la Figura 4.4, el EgAgB nativo fue capaz de unirse a la población de monocitos/macrófagos inflamatorios murinos a todas las concentraciones ensayadas; el índice de unión a las células F4/80⁺ fue significativamente mayor al de la proteína control OVA para todos los casos. En el caso de las células no linfoides F4/80⁻ también se detectó unión del EgAgB, ya que

el índice fue mayor que el correspondiente a la OVA (a 50 y 100 µg/mL) pero de menor magnitud que el obtenido para los monocitos/macrófagos. En cuanto a la unión a los linfocitos, si bien las células incubadas con mayor concentración de EgAgB nativo muestran una tendencia a un nivel mayor de fluorescencia, no se detectaron diferencias significativas con las células incubadas con OVA. Estos resultados apoyan los obtenidos empleando los monocitos y macrófagos THP-1, indicando que el EgAgB nativo es capaz de unirse de forma preferencial a los monocitos y macrófagos. Cabe resaltar que los índices de unión del EgAgB a monocitos y macrógafos inflamatorios fueron ampliamente superiores a los obtenidos para la línea celular utilizando el mismo método de detección de la unión.

4.3. Estudio de la contribución del componente proteico y lipídico del EgAgB a la unión a monocitos y macrófagos

Los resultados hasta aquí descriptos muestran que el EgAgB nativo es capaz de unirse de forma selectiva a monocitos y macrófagos mediante una interacción específica con una Kd aproximada de 10⁻⁷ M. A continuación se describen ensayos que buscaron comprender qué estructuras de la partícula lipoproteica podrían estar involucradas en la interacción del EgAgB con dichas células.

4.3.1. Contribución de las subunidades proteicas del EgAgB a la unión a monocitos y macrófagos

El EgAgB nativo es una lipoproteína compleja compuesta por alrededor de una docena de subunidades de EgAgB8, que probablemente se exponen en la superficie exterior hidrofílica de la partícula⁴⁵ y podrían tomar contacto con posibles blancos. En base al estudio proteómico realizado, el EgAgB nativo de origen bovino está conformado mayoritariamente por EgAgB8/1, pero también presenta EgAgB8/2-4³⁸². Para analizar la participación de las subunidades proteicas en la unión del EgAgB a monocitos y macrófagos se biotinilaron las subunidades recombinantes EgAgB8/1-3 (rEgAgB8/1-3) libres de lípidos producidas por la Dra. Valeria Silva³⁸³. Dado que el rendimiento de los procedimientos de expresión y deslipidación de rEgAgB8/1 fue mucho menor en comparación con el obtenido para rEgAgB8/2 y rEgAgB8/3, algunos ensayos se realizaron sólo con estas últimas subunidades. Es relevante recalcar que tal como se mencionó en la introducción, la secuencia de aminoácidos de EgAgB8/3 es más similar a EgAgB8/1 que al EgAgB8/2¹⁸⁵, por lo tanto ensayando al menos las subunidades EgAgB8/3 y EgAgB8/3 y EgAgB8/2 tendríamos al menos representadas las dos subfamilias de apolipoproteínas presentes en el EgAgB nativo.

Se llevaron a cabo experimentos de unión con células de ratón obtenidas de una reacción inflamatoria aguda en el peritoneo (enfocándonos en las poblaciones de macrófagos y linfocitos), y con monocitos y macrófagos derivados de la línea THP-1, siguiendo las mismas condiciones que las utilizadas para los ensayos con el EgAgB nativo. Los resultados obtenidos para la unión de rEgAgB8/1-3 a dichas células se resumen en la Figura 4.5.



Figura 4.5 Unión de las subunidades recombinantes rEgAgB8/1-3 libres de lípidos a células peritoneales murinas y a monocitos y macrófagos humanos de la línea THP-1. (A) Indice de unión de las subunidades de rEgAgB8-B (20, 50 y 100 µg/ml) y OVA (100 µg/ml) a linfocitos y monocitos inflamatorios (infl.)/macrófagos (F4/80⁺) colectados del peritoneo de ratones estimulados con AIF por 48 horas. (B) y (C) Indice de unión de las subunidades de rEgAgB8 a monocitos y macrófagos THP-1, respectivamente. Para todos los gráficos, el índice de unión se expresa como el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes reailizados con duplicados analíticos. (*) Indica diferencias estadísticamente significativas respecto al control con OVA (ANOVA de una vía y prueba de Dunnett, p<0,05). (#) Indica diferencias estadísticamente significativas que y prueba de Tukey, p < 0,05).

En relación a la unión a células peritoneales de ratón (Figura 4.5 A), rEgAgB8/3 se comportó de manera similar al EgAgB nativo; mostró capacidad de unión preferencialmente a la población F4/80 (+) de monocitos inflamatorios/macrófagos y no a los linfocitos. El índice de unión a los monocitos inflamatorios/macrófagos aumentó significativamente en relación al de la OVA y de

manera dependiente de la dosis ensayada. Por otra parte, no se observó unión de rEgAgB8/2 a los monocitos inflamatorios/macrófagos; el índice de unión mostró una tendencia a aumentar de manera dosis-dependiente pero esta tendencia no alcanzó la significancia estadística. El comportamiento difererncial entre rEgAgB8/2 y rEgAgB8/3, en cuanto a la capacidad de interacción con macrófagos, también se encontró cuando se realizaron ensayos de unión en células THP-1 (Figura 4.5 B y C). Las subunidades rEgAgB8/1 y rEgAgB8/3 se unieron de forma dependiente de la dosis a los monocitos y macrófagos. Por el contrario, rEgAgB8/2 no se unió a los monocitos y mostró una pobre unión a los macrófagos. Teniendo en cuenta que todas las subunidades contaban con un grado de biotinilación similar (incluso un poco menor para rEgAgB8/3, ver ítem 2.6.2.1 de Materiales y Métodos), estos resultados muestran que rEgAgB8/2 tiene una menor capacidad para interactuar con monocitos y macrófagos que rEgAgB8/1 y EqAgB8/3, apoyando la existencia de diferencias en las propiedades biológicas de las subfamilias del EgAgB. Sin embargo, no puede descartarse que la biotinilación pueda haber afectado las propiedades de unión de rEgAgB8/2 en mayor medida que las de EgAgB8/1 y EgAgB8/3. Cabe mencionar que los resultados se reprodujeron con varios conjugados de EgAgB8/2-B preparados en forma independiente y en paralelo con los correspondientes del EgAgB8/1 y EgAgB8/3. Por otro lado, es interesante destacar que la unión de la subunidad EgAgB8/3 también fue significativamente mayor que la de la subunidad EgAgB8/1 para las dos concentraciones ensayadas y en ambos tipos celulares.

La capacidad de rEgAgB8/1 de unirse a monocitos y macrófagos THP-1 se confirmó utilizando el anticuerpo Mo-EB7. De esta forma, se obtuvieron gráficos análogos a los de la Figura 4.1 con el EgAgB nativo y que se muestran en la Figura 4.6. En este caso también se produjo un aumento de la fluorescencia al incubar las células con concentraciones crecientes de EgAgB8/1, mientras que en los controles no hubo aumento de fluorescencia (Figura 4.6 A y C). Los datos obtenidos a partir de tres experimentos independientes se representan en el gráfico de barras de los paneles B y D, dónde se observa un aumento significativo y dependiente de la dosis en el índice de unión del EgAgB8/1, tanto para los monocitos como para los macrófagos THP-1. Estos datos indican que la subunidad EgAgB8/1 libre de lípidos es capaz de unirse directamente a ambos tipos celulares. En este caso también se observó una mayor unión a los macrófagos en comparación con los monocitos, de forma similar a lo observado para el EgAgB nativo. Sin embargo, el EgAgB nativo parecería unirse con mayor afinidad que el EgAgB8/1, pero no que el EgAgB8/3, ya que fue necesario emplear mayores concentraciones de EgAgB8/1 para evidenciar la unión. Esto puede tener múltiples explicaciones, incluyendo el hecho de que el EgAgB expone probablemente un número mayor de sitios para la unión (al menos se estiman del orden de la decena de subunidades por partícula) que los presentes en las subunidades recombinantes delipidadas (oligómeros de entre 7 u 8 subunidades en el caso de EgAgB8/1¹⁹⁸). Además podrían existir diferencias en la fuerza de unión de las distintas subunidades (afinidad y grado de oligomerización) a los receptores celulares y en cómo los lípidos afectan su exposición en la partícula y la interacción con las células.



Intensidad de fluorescencia (FITC)

Figura 4.6. Unión de rEgAgB8/1 a monocitos y macrófagos THP-1. Los monocitos y macrófagos THP-1 se incubaron con cantidades crecientes de rEgAgB8/1 (10, 20 y 50 µg/mL) y se reveló la unión por citometría de flujo empleando el anticuerpo monoclonal anti-EgAgB8/1 (Mo-EB7) seguido de un anticuerpo anti-IgG/IgM-FITC. (A) y (C) Histogramas correspondientes a los monocitos y macrófagos THP-1 incubados con rEgAgB8/1 o sus respectivos controles: vehículo (PBS_{E-B} en color gris), sin EB7 (s/EB7, línea punteada), anticuerpo isotípo control (línea rayada). Los histogramas son representativos de tres experimentos independientes con duplicados analíticos. (B) y (D) Indice de unión de rEgAgB8/1 a monocitos y macrófagos THP-1, respectivamente. Este índice se calculó como el cociente entre la intensidad de fluorescencia de cada muestra sobre la intensidad de fluorescencia del control correspondiente al vehículo; por esta razón la barra en gris del PBS corresponde a un índice de unión=1. Los resultados se expresaron como el promedio \pm SEM de cuatro experimentos independientes con duplicados analíticos. (*) sobre las barras indica diferencias estadísticamente significativas respecto al control (ANOVA de una vía y prueba de Dunnett, *p<0.05, **p<0.01) y (*) sobre corchetes indica diferencias estadísticamente significativas entre datos (ANOVA de una vía y prueba de Tukey *p < 0.05; **p < 0.01, ***p < 0.001).

En conjunto, los resultados presentados sobre la contribución del componente proteico muestran que las sununidadess EgAgB8/1 y EgAgB8/3, y en menor grado EgAgB8/2, contribuirían directamente a la unión de EgAgB a las células observada *in vitro*. Las similitudes y diferencias observadas en la interacción entre las subunidades del EgAgB y las células están de acuerdo con el grado de identidad entre los miembros de la familia EgAgB; EgAgB8/1 y EgAgB8/3 son más similares entre sí que EgAgB8/2. Teniendo en cuenta que EgAgB8/1 fue la apolipoproteína predominante encontrada en el EgAgB nativo presente en el LH, nuestros resultados indican que los monocitos y los macrófagos pueden ser principalmente capaces de reconocer EgAgB nativo a través de EgAgB8/1. EgAgB8/3 también podría contribuir a este reconocimiento, aunque se trata de una subunidad pobremente representada en el EgAgB liberado desde el hidátide hacia los tejidos del huésped varíe durante la infección, así como también que varíe en diferentes estadios o genotipos del parásito.

4.3.2. Contribución de la fosfatidilcolina del EgAgB a la unión a monocitos y macrófagos

Debido a la compleja composición que presenta el EgAgB nativo, existe la posibilidad de que no sólo las subunidades proteicas participen en la interacción con las células. El alto porcentaje de lípidos que lo conforma hace lógico plantear que puedan establecer uniones para contribuir directamente a la interacción con los receptores celulares, o que medien la exposición de las subunidades proteicas hacia el medio hidrofílico, contribuyendo indirectamente a la unión. En este sentido, los lípidos polares, en particular la PC por ser el fosfolípido más abundante, tienen mayor importancia ya que se ubicarían en la superficie de la lipoproteína. Por tanto, para evaluar el papel que juega la PC en la interacción del EgAgB nativo con monocitos y macrófagos se trató la lipoproteína con fosfolipasa D (PLD). Esta enzima hidroliza la PC y deja en su lugar al ácido fosfatídico, liberando el grupo colina y modificando sustancialmente la cabeza polar de la PC expuesta en el EgAgB. Posteriormente, el EgAgB tratado con PLD (EgAgB_{PLD+}) se purificó por ultracentrifugación para recuperar la lipoproteína libre de la PLD y la colina, evitando interferencias en los ensayos de unión. Como control de este procedimiento se le aplicó el mismo tratamiento sin agregado de PLD (EgAgB_{PLD-}) a una fracción de EgAgB. Para verificar la efectividad del tratamiento, se extrajeron los componentes hidrofóbicos del EgAg B_{PLD+} y del EgAgB control y las fracciones lipídicas obtenidas se analizaron mediante HPTLC (ver sección 2.3.2. de Materiales y Métodos). En la Figura 4.7, panel A, se observa que el tratamiento con PLD resultó efectivo, dado que desapareció la banda correspondiente a PC (flecha llena) en la fracción lipídica del EgAgBPLD+ y no EgAgB_{PLD-}. Además, el perfil de bandas correspondiente a todos los fosfolípidos muestra alteración, con la aparición de una nueva banda única que migra más que la PC y que exhibió un patrón de migración compatible con el ácido fosfatídico (flecha punteada). Por tanto, el tratamiento con PLD permitió obtener una partícula de EgAgB con modificaciones en sus fosfolípidos, principalmente la desaparición de la PC, resultando útil para analizar la contribución de este fosfolípido a la unión del EgAgB a monocitos y macrófagos THP-1. En este caso la unión del EgAgB_{PLD+} y EgAgB_{PLD-}a las células se evaluó utilizando el anticuerpo Mo-EB7 seguido del conjugado anti-IgG/IgM-FITC para el revelado, como se muestra en los paneles B y C de la Figura 4.7.



Figura 4.7 Contribución de la PC en la unión del EgAgB a monocitos y macrófagos THP-1. El EgAgB nativo se incubó en presencia o ausencia de PLD (control) y posteriormente, se purificó por ultracentrifugación en gradiente de KBr, obteniéndose las preparaciones llamadas EgAgBPLD+, y EgAgBPLD-, respectivamente. (A) Análisis de la composición lipídica de EqAgB_{PLD+} y EqAgB_{PLD-} mediante HPTLC de doble desarrollo y visualización por tinción con vapores de iodo para verificar la efectividad del tratamiento con PLD. Como control adicional (contaminantes lipídicos) se realizó el mismo procedimiento para la solución de PBS (PBS_{E-B}) en la que se obtuvo el EgAgB nativo. Las especies lipídicas se identificaron por comparación con un estándar analizado en paralelo (STD); PC: fosfatidilcolina, C: cardiolipina, PE: fosfatidiletanolamina, DAG: diacilglicéridos, Cho: colesterol, FA: ácidos grasos, TAG: triacilglicéridos, SE: ésteres de esteroles. Se indica con una flecha llena la banda correspondiente a PC y con una flecha punteada la banda que correspondería al ácido fosfatídico. (B) y (C) Análisis de la unión de EgAgB_{PLD+} y EgAgB_{PLD-} a monocitos y macrófagos, respectivamente. Se analizó por citometría de flujo la capacidad unión de ambas preparaciones (100 µg/mL) y la interacción se reveló empleando el anticuerpo Mo-EB7 seguido del anticuerpo anti-IgG/IgM-FITC. Los resultados se expresan como el porcentaje de unión promedio (tomando como 100% la unión del EgAgB nativo sin tratamiento) ± SEM de tres experimentos independientes con duplicados analíticos. (*) Indica diferencias estadísticamente significativas respecto al EgAgB nativo (ANOVA de una vía y prueba de Dunnett, * p < 0.05).

El análisis de la unión de EgAgB_{PLD-} y EgAgB_{PLD+} a los monocitos y macrófagos THP-1 reveló diferencias en su capacidad de unión a monocitos y macrófagos; el EgAgB_{PLD-} mostró un porcentaje de unión a ambos tipos celulares similar al del EgAgB nativo, mientras que EgAgB_{PID+} perdió alrededor del 80% de esta capacidad (Figura 4.7 B y C). Este resultado sugiere que la PC influye en la unión del EgAgB a estas células. Esto puede deberse tanto a una participación directa de la PC en la unión como a una participación indirecta, en donde la PC modifique la forma en la que se exponen las subunidades de EgAgB en la partícula nativa afectando su interacción con las 127

células. Por otra parte, no se puede excluir que el tratamiento con PLD haya afectado la unión de la lipoproteína al modificar su carga superficial, ya que la generación del ácido fosfatídico aporta una importante carga negativa.

Como aproximación alternativa para evaluar si los fosfolípidos participan directamente en la unión del EgAgB a las células, se diseñaron ensayos de competencia con vesículas unilamelares grandes (LUVs) compuestas por PC o PC/PS (50:50 molar). Se pre-incubaron monocitos THP-1 con las vesículas y se evaluó la unión del EgAgB nativo-B, utilizando una relación de masa de 5:1 para LUVs/EqAqB, respectivamente. La unión se reveló con estreptavidina-FITC y los resultados se expresaron en relación al control del 100%, correspondiente a la unión del EgAgB nativo a las células pre-incubadas con PBS. Como se desprende de la Figura 4.8, la pre-incubación de los monocitos con LUVs de PC:PS no alteró la unión del EgAgB a las células. Sin embargo, las LUVs de PC causaron una reducción leve pero significativa, en el entorno del 10%, contrastando con la capacidad de unión ampliamente reducida que mostró el EgAgB_{PLD+} (80% menos que el control). Desafortunadamente, debido a su limitada disponibilidad, en estos ensayos no pudo revelarse la unión del EgAgB a los monocitos empleando el Mo-EB7, por lo cual las diferencias existentes a nivel de la estrategia experimental no permiten estrictamente la comparación de los porcentajes con los presentados en la Figura 4.7 B. De todos modos, los datos apuntan a que los fosfolípidos expuestos en la superficie de la partícula no tienen un papel primordial en la unión del EgAgB a los monocitos. Sin embargo, el contraste entre la fuerte reducción en la unión de la EgAg B_{PID+} y la modesta inhibición causada por LUVs de PC sugiere que las fuerzas electrostáticas generadas por el tratamiento con la PLD afectaron las interacciones entre el EgAgB y las células. Es posible que la PC participe en la exposición de las distintas subunidades de EgAgB en la partícula nativa y en la generación de un entorno favorable para la interacción con los receptores celulares, más que en una interacción directa con las células.



Figura 4.8 Competencia con LUVs de PC y PC/PS por la unión del EgAgB a monocitos THP-1. Análisis de la unión de EgAgB nativo-B (100 µg/mL) a monocitos THP-1 pre-incubados con LUVs de PC o PC/PS (500 µg/mL), revelando la interacción por citometría de flujo con estreptavidina-FITC. Los resultados se expresan como el porcentaje de unión tomando como 100% la unión del EgAgB nativo a monocitos pre-incubados con vehículo (PBS_{E-B}) como control. Los datos corresponden al promedio \pm SEM de tres experimentos independientes con duplicados analíticos. (*) Indica diferencias estadísticamente significativas respecto al control en ausencia de LUVs (ANOVA de una vía y prueba de Dunnett, * p < 0.05).

En resumen, los resultados presentados hasta el momento en relación a la contribución del componente proteico y lipídico del EgAgB a la unión a monocitos y macrófagos sugieren que: i) las subunidades proteicas que conforman el EgAgB nativo participan directamente de la unión, mostrando diferencias en su capacidad de interacción con dichas células (EgAgB8/1 y EgAgB8/3 >>> EgAgB8/2), y ii) la PC, principal fosfolípido posiblemente expuesto sobre la superficie del EgAgB, participaría principalmente en forma indirecta, contribuyendo a la exposición de las subunidades proteicas en un entorno adecuado para la interacción, donde la carga global puede ser un factor importante.

4.4. Evaluar la participación de los receptores para lipoproteínas plasmáticas (HDL y LDL) y otros receptores en la unión

Los resultados hasta aquí desarrollados sugieren la existencia de receptores en monocitos y macrófagos capaces de reconocer al EgAgB. Sabemos que el EgAgB nativo presenta estructura y propiedades fisicoquímicas similares a las lipoproteínas plasmáticas (particularmente a la HDL ^{45,384}). En base a esta observación realizamos ensayos de competencia con HDL y LDL (purificadas a partir de plasma humano) para evaluar si los receptores de lipoproteínas están implicados en las interacciones entre el EgAgB y las células. Los monocitos THP-1 se pre-incubaron con HDL y LDL y posteriormente con concentraciones crecientes de EgAgB-B (u OVA-B como control). La unión se reveló utilizando estreptavidina-FITC y los resultados se expresaron como el índice de unión (Figura 4.9), tal como fue descripto previamente. En las condiciones ensayadas, la OVA no mostró unión a los monocitos THP-1 (índice de unión fue cercano a 1) y para el EgAgB nativo el índice de unión aumentó conforme lo hizo su concentración. Tanto la HDL como LDL inhibieron, de forma parcial pero significativa la unión de EgAgB a los monocitos. La inhibición se observó para la máxima concentración de EgAgB utilizada, 250 µg/mL, y para el caso de la HDL también a 100 µg/mL. Estos resultados sugieren que la unión de EgAgB a monocitos y macrófagos está mediada, al menos parcialmente, por receptores compartidos con estas lipoproteínas plasmáticas.

Adicionalmente, se exploró la participación del receptor para la lipoproteína plasmática de baja densidad (LDLr) en la unión del EgAgB nativo a las células. Para este fin, se tomó ventaja de la metodología ajustada para estudiar la unión del EgAgB a monocitos y macrófagos peritoneales, y de la disponibilidad de ratones deficientes en el LDLr (LDLr-/-) y sus correspondientes controles (LDLr+/+). Se utilizó como proteína control BSA-B y se analizó la unión a la población de monocitos inflamatorios y macrófagos, definida como células F4/80+. Como se observa en la Figura 4.10, la unión del EgAgB nativo a estas células no mostró diferencias significativas entre células provenientes de los ratones LDLr-/- y LDLr+/+. En base a estos resultados, el LDLr no sería directamente responsable de la unión del EgAgB a los monocitos y macrófagos.



Figura 4.9. Competencia con HDL y LDL por la unión del EgAgB a monocitos THP-1. Análisis de la unión de EgAgB nativo-B (20, 50, 100 y 250 µg/mL) a monocitos THP-1 pre-incubados con PBS, HDL ó LDL (500 µg/mL), revelando por citometría de flujo con estreptavidina-FITC. Se grafica el índice de unión, calculado como el cociente entre la intensidad de fluorescencia de cada muestra sobre la intensidad de fluorescencia del vehículo (PBS_{E-B}). Los datos corresponenden al promedio \pm SEM de tres experimentos independientes con duplicados analíticos. (*) Indica diferencias estadísticamente significativas respecto al control de unión de EgAgB nativo a las células en ausencia de lipoproteínas (ANOVA seguido de la prueba de Dunnett, * p < 0.05).



Figura 4.10. Participación de rLDL en la unión de EgAgB a macrófagos inflamatorios peritoneales. Análisis de la unión de EgAgB nativo-B (100 µg/mL) a monocitos inflamatorios/macrófagos F4/80+ obtenidos a partir de un infiltrado inflamatorio en la cavidad peritoneal de ratones control (LDLr+/+, barras vacías) o LDLr-/- (barras con patrón). Se grafica el índice de unión promedio ± SEM de dos experimentos independientes con duplicados analíticos. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey.

Las células inmunes innatas presentan una amplia gama de receptores involucrados en el reconocimiento de lipoproteínas muchos de los cuales presentan una especificidad de ligando relativamente promiscua, como el LDLr y los receptores barrenderos^{385,386}. Si bien las subunidades del EgAgB8 no se asemejan a nivel de su secuencia de aminoácidos a las apolipoproteínas de la HDL y LDL, exhiben algunas características bioquímicas similares a las apolipoproteínas intercambiables que componen estas lipoproteínas plasmáticas^{387,388}, como la exposición de dominios con carga positiva y negativa³⁵. Se exploró entonces si el reconocimiento del EgAgB por los monocitos/macrófagos involucraba la participación de otros receptores de lipoproteínas que poseen dominios con afinidad por regiones cargadas positivamente (proteína relacionada con el receptor de LDL, LRP-1) o negativamente (receptor barrendero de clase A, SR-A). Para esto se realizaron ensayos de competencia por la unión del EgAgB a monocitos THP-1 utilizando un exceso de ligandos de alta afinidad para LRP-1 y SR-A, la lactoferrina y el ácido poli-inosínico, respectivamente. Como se muestra en la Figura 4.11 la presencia de estos ligandos no alteró la unión del EgAgB a los monocitos. Los valores del índice de unión mostraron pequeñas fluctuaciones que no alcanzaron la significancia estadística aun utilizando una concentración de los ligandos 10 veces mayor que la del EgAgB. Por tanto, estos resultados sugieren que los receptores LRP-1 y SR-A no están involucrados en la interacción EgAgB con monocitos.



Figura 4.11. Análisis de la participación de los receptores LRP-1 y SR-A en la unión del EgAgB nativo a monocitos THP-1. Se realizaron ensayos de competencia por la unión a monocitos THP-1 entre el EgAgB nativo-B y ligandos de los receptores LRP-1 (lactoferrina) y SR-A (acido poli-inosínico). Se incubó una concentración fija de EgAgB (100 µg/mL) con las células pre-incubadas con lactoferrina o ácido poli-inosínico (5, 100 y 1000 µg/mL), BSA (1000 µg/mL) o PBS como control. Se grafica el índice de unión promedio ± SEM de dos experimentos independientes con triplicados analíticos. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey.

4.5. Efecto de la temperatura y participación del citoesqueleto de actina en la unión del EgAgB a los macrófagos



Figura 4.12. Efecto de la temperatura y participación del citoesqueleto de actina en la unión del EgAgB a macrófagos THP-1. Se evaluó la unión de EgAgB nativo-FITC (250 µg/mL) a monocitos THP-1 pre-incubados con/sin citocalasina D (30 minutos a 10 µM) y en ausencia/presencia de N_aN₃ (0,1%). Como control se utilizó OVA-FITC. Se grafica el índice de unión promedio ± SEM de dos experimentos independientes con triplicados analíticos. (*) Indica diferencias estadísticamente significativas respecto al control con OVA (ANOVA de una vía y prueba de Dunnett (p < 0,05). (#) indica diferencias estadísticamente significativas presencia de N_aN₃ en la condición de incubación en presencia de N_aN₃ y ausencia de citocalasina D utilizada en los ensayos anteriores (de ANOVA de una vía y prueba de Tukey (p < 0,05).

Los ensayos de unión descriptos hasta el momento se desarrollaron bajo condiciones experimentales que evitaron la eventual internalización del EgAgB por las células (incubaciones de 1 hora a 4°C y en presencia de N_aN_3) ya que el revelado en dos pasos lo hizo necesario (ya sea con el Mo-EB7 o con estreptavidina-FITC). Como una primera aproximación para evaluar si la unión podría conducir a internalización del EgAgB se introdujeron modificaciones en este protocolo realizando experimentos con monocitos durante 1 hora a 37°C y en ausencia/presencia de NaN3 (desacoplado de membrana e inhibidor de la GTPasa mitocondrial) y citocalasina D (bloqueante del citoesqueleto de actina) (REF). Para este caso se trabajó con EgAgB nativo y OVA conjugados directamente a FITC (EgAgB-FITC y OVA-FITC). Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 4.12. Para todas las condiciones ensayadas, el aumento en la temperatura de incubación provocó una unión significativamente mayor del EgAgB a los macrófagos THP-1 en relación con la obtenida a 4°C, situación que se observa también para el control con OVA. Tomando como referencia la condición con N_aN_3 y sin citocalasina D (aplicada en todos los ensayos anteriores), para cada temperatura estudiada (4 y 37°C) se puede observar que la presencia de N_aN₃ diminuye el índice de unión de forma significativa (#) así como la presencia de citocalasina D. El mayor índice de unión reportado corresponde a la condición a 37°C en ausencia de fue N_3N_3 y citocalasina D y el

menor a la condición a 4°C en presencia de ambos inhibidores). El control con OVA no mostró cambios en este sentido. En base a las observaciones mencionadas, es posible que el EgAgB sea internalizado como consecuencia de su interacción con las células, ya que el proceso de endocitosis se favorece al aumentar la temperatura a 37°C (explicable por su efecto sobre el equilibrio químico entre ligando y receptor, entre otros) y al facilitar los eventos celulares que llevan a la internalización (actividad del citoesqueleto de actina en ausencia de N_aN₃ y citocalasina D).

4.6. Análisis de la capacidad de unión del EgAgB nativo a hepatocitos HepG2

En relación a la capacidad del EgAgB de interactuar con células presentes en la interfaz con el hospedero, los hepatocitos constituyen otro tipo celular de interés dado que la mayoría de las infecciones por el metacestodo de *E. granulosus* tienen localización hepática³⁸⁹. Debido a que contábamos en el laboratorio con la línea celular de hepatocitos humanos HepG2 en funcionamiento, se buscó evidencia acerca de la posible interacción entre el EgAgB con este tipo celular. En este sentido, se realizaron ensayos de unión del EgAgB nativo (purificado de LH fértil) a hepatocitos HepG2 utilizando la metodología descripta en 2.6.2.2. Como se observa en la Figura 4.13, y de forma similar a lo reportado para monocitos y macrófagos, el EgAgB nativo se unió de forma dependiente de la dosis a los hepatocitos (Figura 4.13 A) con una Kd aparente de 249.3 ± 39 µg/ml y la interacción mostró ser específica en ensayos de competencia con EgAgB sin marcar (Figura 4.13 B). En base a los datos obtenidos y considerando que el hígado es la principal localización de la hidátide, los hepatocitos constituyen un blanco celular de interés para profundizar en el posible rol del EgAgB en la infección hidática.



Figura 4.13. Ensayos de saturación y competencia de la unión de EgAgB nativo a hepatocitos HepG2. En este ensayo se utilizó EgAgB purificado a partir de LH fértil. (A) Ensayo de saturación. Las células se incubaron con cantidades crecientes de EgAgB nativo-B u OVA-B como control (20 a 350 µg/mL) y se reveló la unión por citometría de flujo empleando estreptavidina-FITC. Se grafica la intensidad de fluorescencia promedio \pm SEM en función de la concentración de EgAgB (•) y OVA (\blacktriangle) utilizando el mejor ajuste, obtenido con el modelo de "saturación con un unión a un sitio específico" (línea sólida con R2=0,968, Graph Pad Prism). (B) Ensayo de competencia. Las células se incubaron con una concentración fija (250 µg/mL) de EgAgB nativo-B y

se estableció la competencia mediante el agregado de concentraciones crecientes (125, 250, 500 y 1000 μ g/mL) de EgAgB nativo sin marcar (barras naranjas). En paralelo se realizó el control con OVA-B y OVA sin marcar (barras grises) y se evaluó la competencia entre EgAgB nativo-B y OVA sin marcar (1000 μ g/mL, barras naranjas con patrón negro). Se reveló la unión por citometría de flujo empleando estreptavidina-FITC. Se grafica el indice de unión promedio ± SEM. En cada panel se muestra una figura representativa de tres experimentos independientes con duplicados analíticos. (*) y (#) Indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control con OVA-B (control sin competencia) y respecto al control de máxima unión con EgAgB-B, respectivamente (ANOVA de una vía y prueba de Tukey, p < 0.05).

CAPÍTULO 5

Efectos moduladores del EgAgB sobre células del sistema inmune: aproximaciones *in vitro* e *in vivo*

CAPÍTULO 5: Efectos moduladores del EgAgB sobre células del sistema inmune: aproximaciones *in vitro* e *in vivo*

En este capítulo se exploraron las consecuencias a nivel funcional de la interacción del EgAgB con monocitos y macrófagos, células innatas con las cuales comprobamos que el EgAgB podría interactuar en la interfaz con el hospedero. En particular, buscamos analizar el potencial inmunomodulador del EgAgB nativo y su capacidad de remover colesterol de los macrófagos como posible indicador del potencial para adquirir lípidos de estas células. Para estos estudios se utilizaron distintas preparaciones de EgAgB nativo, todas purificadas a partir de LH fértil.

5.1. Evaluación de los efectos de las preparaciones de EgAgB en macrófagos

Para examinar los efectos del EgAgB sobre células inmunes innatas como monocitos y macrófagos resultó imprescindible disponer de preparaciones de la lipoproteína en su estado nativo y con alta pureza, particularmente conteniendo niveles de pirógenos que no afecten las propiedades de dichas células. Como se describió en el capítulo 3, desarrollé un método para purificar el EgAgB a partir de LH, basado en un paso de cromatografía de intercambio aniónico seguido de ultracentrifugación en gradiente de KBr, que permitió obtener EgAgB nativo (EgAgB_{UC}) de calidad aceptable para los estudios de caracterización de la composición y unión a células innatas que se describieron en las secciones anteriores. Para conocer si esta preparación podría utilizarse en estudios funcionales evaluamos si el EgAgB_{UC} reproducía los efectos inmunomoduladores del EgAgB inmunopurificado (EgAgB_{EB7}) descriptos en estudios preliminares³⁹⁰. Los resultados mostraron que la preparación EgAgB_{UC} indujo la secreción de IL-1β e IL-6 en macrófagos THP-1, y además, no mostró un efecto inmunomodulador de la respuesta de citoquinas (IL-1**β** e IL-6) inducida por LPS (Figura 5.1 A, B).



Figura 5.1. Análisis de los efectos de $EgAgB_{UC}$ sobre la producción de IL-1 β e IL-6 por macrófagos, en ausencia o presencia de LPS. Se diferenciaron 0.2×10^6 células THP-1 con PMA (50 ng/mL) por 72 horas. Los macrófagos obtenidos se incubaron con $EgAgB_{UC}$ (1 y 10 µg/mL) o PBS_{E-B} como control de vehículo, en ausencia o presencia de LPS (10 ng/mL). A las 24 horas de estimulación se colectó el sobrenadante y se midió

la concentración de IL-1 β (A) e IL-6 (B) por ELISA de captura. Se grafican los niveles promedio de IL-1 β e IL-6 (pg/mL) ± SEM correspondientes a un experimento con triplicados analíticos.

Las diferencias observadas con EqAgB_{FB7} sugirieron que la composición y/o calidad de EqAgB_{LIC} obtenida por el nuevo método de purificación era inadecuada, planteándose la posibilidad de que contuviera pirógenos. A partir de estos resultados extremamos aún más los cuidados durante toda la purificación del EgAgB nativo utilizando, en todos los pasos del fraccionamiento, soluciones preparadas con agua apirógena y filtradas por 0.22 µm y trabajando en cámara de flujo laminar en las etapas que lo permitieron (armado de los gradientes de KBr, colección de las fracciones de la ultracentrifugación, pasaje por columna de desalado PD10). Corresponde mencionar que en paralelo Sofía Lagos, en el marco de su tesina de grado, evaluó la utilidad de aplicar pasos iniciales de filtración del LH por membranas de tamaño de poro de 0.45 y 0.22 µm para reducir la presencia de agregados, o de adicionar AbAm en las soluciones a lo largo del protocolo de purificación para evitar contaminación (especialmente durante el primer paso de fraccionamiento sobre Q-Sefarosa que implica el manejo de un gran volumen de LH, lo cual alarga el tiempo de la cromatografía). Sus resultados mostraron que la filtración no modificó el tamaño de las partículas de EgAgB ni su capacidad de inducir *per se* la producción de IL-1ß e IL-6 o modificar la respuesta inducida por el LPS. Sin embargo, la adición de AbAm contribuyó al apagado de las propiedades pro-inflamatorias de las preparaciones de EgAgB generadas bajo el nuevo protocolo de purificación, aunque no disminuyó totalmente la inducción de IL-1β e IL-6 (Tesis Lic. Sofía Lagos). Basados en este resultado, se continuó utilizando AbAm en el pool de LH de partida así como en todas las soluciones necesarias para el proceso de purificación del EgAgB nativo. Tomando en cuenta esta información se preparó un nuevo lote de EgAgB (EgAgB_{AbAm}) y se caracterizó en términos del tamaño de sus partículas por DLS, de la capacidad de inducir per se la secreción de $IL-1\beta$ e IL-6 por macrófagos THP-1 y del contenido de endotoxinas (LPS). Los resultados se muestran en la Tabla 5.1. Se estimaron índices de actividad pro-inflamatoria en base al cociente entre los niveles de las citoquinas inducidos por la preparación *per se* (10 µg/mL) y por el LPS (10 ng/mL), para comparar la actividad de esta preparación de EgAgB, con anteriores y futuras preparaciones, independizándonos de variaciones en la magnitud de la respuesta entre experimentos. Por otro lado, se determinaron los niveles de LPS en las preparaciones utilizando el ensayo de determinación de endotoxinas LAL, a través del servicio prestado por el laboratorio Beltrán Zunino, tomando como umbral aceptable en las muestras 0.001 ng de LPS/µg de proteína, lo cual permitiría realizar ensayos hasta en concentraciones de 10 µg/ml del EgAgB. Como se observa en la Tabla 5.1, el EgAgB_{AbAm} mostró un menor índice de actividad pro-inflamatoria en relación a las preparaciones anteriores, pero se continuaron detectando niveles de LPS que podrían interferir en el trabajo con monocitos y macrófagos (ensayo LAL positivo). El hecho que la adición de AbAm disminuyó la actividad pro-inflamatoria sugirió que ésta probablemente se asociara con PAMPs contaminantes, incluyendo trazas de LPS de acuerdo con el resultado del ensayo LAL.

Como complemento de esta caracterización, examinamos si la actividad pro-inflamatoria detectada en el EgAgB_{AbAm} se inhibía en presencia de polimixina B (PB), un decapéptido cíclico y catiónico que se conoce bloquea la actividad del LPS³⁹¹. En la Figura 5.2 se observa que 10 µg/ml de PB inhibieron fuertemente la respuesta de IL-1 β inducida a una concentración de 10 ng/ml LPS. Sin embargo, la PB no modificó los niveles de IL-1 β secretados por macrófagos en respuesta a la

Tabla 5.1. Caracterización de las preparaciones EgAgB_{UC} y EgAgB_{AbAm}. Se muestran el radio hidrodinámico determinado por DLS, los niveles promedio de IL-1β e IL-6 secretados por macrófagos THP-1 en respuesta a la estimulación con EgAgB_{UC} y EgAgB_{AbAm} (10 µg/mL) o LPS (10 ng/ml) y los niveles de LPS de acuerdo al ensayo LAL. Se informan los índices de actividad medidos en término de la producción de las citoquinas normalizado por la respuesta del LPS (cociente de los niveles de cada citoquina inducidos por el EgAgB y por el LPS). (*) Concentración estimada a partir de la mínima concentración del estándar y corregida por la dilución ensayada de la muestra.

		Purificaciones de EgAgB				
_		EgAgB _{uc}	EgAgB _{AbAm}			
R _H (nm	ו) ± <u>SD</u>	5.77 ± 0.25	5.77 ± 0.21			
[]] 10] ng/ml	EgAgB 10 µg/mL	1561	193			
[IL-IB] pg/mL	LPS 10 ng/mL	2902	1368			
Indice IL-1β	EgAgB/LPS	0.538	0.141			
	EgAgB 10 µg/mL	3596	90 *			
	LPS 10 ng/mL	5377	5638			
Indice IL-6	EgAgB/LPS	0.669	< 0.016			
L	AL	+	+			



Figura 5.2. Efecto de la polimixina B sobre los niveles de IL-1 β inducidos por EgAgB_{AbAm} per se o sobre la respuesta de LPS en macrófagos THP-1. Se pre-incubaron 0.2x10⁶ macrófagos con polimixina B (PB, 10 µg/mL por 30 minutos) o medio (control de vehículo) y posteriormente se estimularon con EgAgB_{AbAm} (10 µg/mL) en ausencia o presencia de LPS (10 ng/mL). A las 24 horas se colectó el sobrenadante y se midió la concentración de IL-1 β por ELISA de captura. Se grafican los niveles promedio de IL-1 β (pg/mL) ± SEM correspondientes a dos experimentos independientes (Ensayo 1 y 2) con triplicados analíticos. Los datos para el LPS en ausencia y presencia de PB fueron muy similares entre el ensayo 1 y 2 por lo que se muestran como columnas únicas con la dispersión correspondiente a ambos ensayos.

estimulación por EgAgB_{AbAm} (dos ensayos independientes). Por otra parte, a diferencia de lo observado para EgAgB_{UC} y pese al resultado positivo obtenido por el ensayo LAL, el EgAgB_{AbAm} logró inhibir parcialmente los niveles de IL-1β inducidos por LPS, efecto modulador análogo al reportado para EgAgB_{EB7}. Este resultado mostró la presencia de actividades antagónicas en las preparaciones de EgAgB: por un lado, una actividad inductora de la secreción de citoquinas - posiblemente atribuible a la presencia de LPS- y por otro, una actividad moduladora de dicha producción inducida por LPS. Desafortunadamente, intentos por remover el LPS de las preparaciones mediante cromatografía de afinidad negativa sobre PB-agarosa (principal metodología utilizada para este fin en preparaciones de proteínas recombinantes) fueron infructuosos ya que el EgAgB se unió fuertemente a la matriz y no se eluyó al disminuir el pH (incluso a pH=1.5).

Por otra parte, se disponía de las proteínas rEgAgB8/2 y rEgAgB8/3 libres de lípidos producidas en bacterias (no se dispuso de rEgAgB8/1). Si bien estas muestras provenían de cultivos bacterianos, la metodología aplicada para la extracción de los lípidos implicó diversas etapas en las cuales sería esperable eliminar contaminantes derivados de las bacterias (cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa³⁹²). Además, el protocolo de producción y purificación usó material estéril y soluciones preparadas con agua apirógena, AbAm y filtradas por 0.22 µm en todas las etapas que resultó posible. Por tanto, consideramos lógico testear los efectos de las preparaciones rEgAgB8/2-3 delipidadas (1 y 10 µg/mL) sobre macrófagos THP-1. Como se muestra en la Figura 5.3, ambas proteínas promovieron *per se* la secreción de IL-1 β y su presencia aumentó la secreción de esta citoquina pro-inflamatoria en respuesta al LPS no reproduciendo los efectos inmunomoduladores observados para EgAgB_{FB7}. Una posibilidad sería que los lípidos fueran esenciales para la actividad moduladora, ya sea porque actúen directamente sobre las células o porque modifiquen como se exponen las subunidades proteicas en la partícula. Por otra parte, es posible que los pasos de purificación y delipidación no fueran suficientes para eliminar la presencia de PAMPs bacterianos y, de hecho, la mayoría de las preparaciones de proteínas recombinantes se purifican por afinidad sobre PB, método que no resultó aplicable. En cualquier caso, el uso de las proteínas recombinantes preparadas en bacterias (rEgAgB8/2-3) no ofreció una alternativa para estudiar los efectos biológicos del EgAgB sobre células inmunitarias.

Los resultados descriptos anteriormente mostraron que EgAgB_{AbAm} promovió una actividad proinflamatoria a pesar de todos los esfuerzos por evitar contaminación con LPS y otros PAMPs. En comparación, el EgAgB_{EB7} no mostró esta actividad, lo cual indicó que el paso de inmunoafinidad sería muy importante para lograr preparaciones de pureza adecuada. En este punto, nos propusimos mejorar la calidad de las preparaciones de EgAgB introduciendo este paso final de purificación. Además, buscando alternativas al modelo del EgAgB nativo, se decidió expresar la subunidad EgAgB8/1 en células de insecto.



Figura 5.3. Niveles de secreción de IL-1 β inducidos por las subunidades rEgAgB8/2 y rEgAgB8/3 delipidadas, *per se* y en presencia de LPS, en macrófagos. Se estimularon 0.2x10⁶ macrófagos THP-1 con rEgAgB8/2-3 (1 y 10 µg/mL) o con PBS_{E-B} (control de vehículo) en ausencia o presencia de LPS (10 ng/mL). A las 24 horas se colectó el sobrenadante y se midió la concentración de IL-1 β por ELISA de captura. Se grafican los niveles promedio de IL-1 β (pg/mL) ± SEM correspondientes a un experimento con triplicados analíticos.

5.2. Obtención de EgAgB nativo y EgAgB8/1 recombinante para estudios funcionales

En función de los antecedentes del grupo y la comprobación de que la subunidad EgAgB8/1 predomina en el EgAgB nativo derivado de LH³⁸², resultó razonable preparar anticuerpos anti-EgAgB8/1 que permitieran sumar un paso de inmunoafinidad al final del proceso de purificación desarrollado, reproduciendo el paso clave de inmunoafinidad basado en el uso del Mo-EB7³⁹³. Con este fin se abordó la producción de anticuerpos monodominio de llama (VHHs, conocidos como nanoanticuerpos³⁹⁴). Por otro lado, como una alternativa al uso del EgAgB nativo, se planteó producir la forma recombinante del EgAgB8/1 en células eucariotas (*Drosophila melanogaster*), evitando la contaminación con PAMPs inherente a la producción en bacterias. A continuación se describen los resultados en relación a ambas estrategias (la descripción detallada de la metodología se incluyó en la secciones 2.4.2.1 y 2.4.2.2).

5.2.1. Producción de anticuerpos monodominio de llama (dominios VHH) anti-EgAgB y su uso en la purificación del EgAgB nativo por cromatografía de inmunoafinidad

Esta actividad se realizó en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Gualberto González, que llevó adelante las principales fases para la producción de los VHH_s anti-EgAgB8/1 (generación de una biblioteca en fagos filamentosos y selección de aquellos que expresaban el VHH específico contra EgAgB8/1 tesina final de grado de Romina Alvez³⁶⁸).



Figura 5.4. Inmunopurificación de EgAgB_{AbAm} sobre Sefarosa-VHH anti-EgAgB8/1. (A) Imagen de la columna Sefarosa-VHH anti-EqAqB8/1 obtenida. (B) Análisis por SDS-PAGE de las fracciones colectadas a lo largo del protocolo de inmunopurificación del EgAgBAbAm sobre Sefarosa-VHH anti-EgAgB8/1. Las fracciones se separaron en geles al 15% de acrilamida, en condiciones reductoras (6mM de DTT); las proteínas se visualizaron por tinción con azul de Coomassie. MPM: marcador de peso molecular; FT: fracción no retenida por la columna; Lavados 1M: lavados con PBS conteniendo 1M de NaCl; Lavados PBS: lavados con PBS; EgAgB_{IP}: fracción eluída (inmunopurificada).

Luego de etapas de titulación, amplificación y clonado en el vector de expresión pINQ-H6HA, participé en la expresión y purificación de los anticuerpos con el asesoramiento del Dr. Andrés González y la co-participación de Sofía Lagos (detalle experimental en sección 2.4.2.1). Finalmente, se realizó una producción a gran escala que permitió obtener 30 mg del VHH anti-EgAgB8/1 a partir de un litro de cultivo. El mismo se inmovilizó sobre una matriz de Sefarosa logrando un 99% de rendimiento en el acoplamiento. La columna generada (Figura 5.4 A) se utilizó para aplicar un paso final de cromatografía de inmunoafinidad sobre la preparación EgAgB_{AbAm} (detalle experimental al final de la sección 2.4.2.1.1). Luego del pasaje de EgAgB_{AbAm} por la columna se aplicaron pasos de lavado, inicialmente con alta fuerza iónica (1M NaCl) y luego con PBS, con el objetivo de remover todo aquello que no presentara una fuerte interacción con la matriz. Posteriormente, se utilizó un pH ácido (2.5) para la elución de la lipoproteína, obteniendo una fracción coloreada, indicativa de la presencia de EgAgB, que denominamos EgAgB_{IP}. En la Figura 5.4 B se muestra el análisis por SDS-PAGE de distintas fracciones recuperadas mediante la cromatografía de inmunoafinidad. En la muestra de partida, EgAgB_{AbAm}, se puede observar el perfil característico del EgAgB que se preserva en la fracción eluída o EgAgB_{IP}. La fracción FT y la correspondiente al lavado 1M contienen una proporción menor de EgAgB que desaparece en el lavado con PBS. En base a las condiciones ensayadas la capacidad de unión de la columna conteniendo los VHH anti-EgAgB8/1 fue de ~1.75 mg/mL. El EgAgB_{IP} se conservó en PBS_{F-B-AbAm} bajo atmósfera de nitrógeno a 4°C, buscando evitar posible contaminación y oxidación de la

lipoproteína. Los controles de pureza, tamaño y agregación de la lipoproteína se describen en 5.2.3.

5.2.2. Producción de rEgAgB8/1 en la línea celular S2 de Drosohpila melanogaster

Se desarrolló un método para obtener la rEgAgB8/1 en la línea celular de *Drosophila melanogaster*³⁹⁵ (rEgAgB8/1_{S2}). Esta actividad se realizó en el Laboratorio de Inmunovirología del Instituto Pasteur, en colaboración con los Dres. Otto Pritsch y Martín Fló y el MSc. Federico Carrión. Se trabajó con células Schneider 2 (S2) de *D. melanogaster*. Las células S2 son una línea policional, derivada de embriones tardíos de *D. melanogaster*³⁹⁶, que integran múltiples copias de plásmidos en el genoma por un proceso mediado por P-transposones permitiendo altos niveles de expresión de la proteína recombinante^{397–399}.

Primero se diseñó una construcción que permitiera el clonado de EgAgB8/1 en el vector seleccionado para la expresión de la proteína. Se seleccionó la secuencia nucleotídica de EgAgB8/1 (U6JQF4_ECHGR de https://www.uniprot.org, Figura 2.2 A) y se optimizó para su expresión en D. melanogaster utilizando el programa GenScript. En los extremos de esta secuencia se adicionaron las secuencias correspondientes a los cebadores genéricos directo y reverso que hibridizan con los cebadores genéricos en el vector de destino. Además, al final de la secuencia correspondiente al cebador genérico directo se ubicó un sitio de corte para la proteasa TEV que permite separar a la proteína EgAgB8/1 de la proteína de fusión y/o del tag mediante el corte con esta proteasa (en caso de ser necesario). También, en el extremo 3' del cebador genérico reverso, se agregó el codón de terminación o stop "TAA" para indicar el fin de la traducción, inmediatamente después de la secuencia de EgAgB8/1. La construcción diseñada (Figura 2.2 C) se envió al laboratorio GenScript quien se encargó de sintetizarla y proveerla. La misma se utilizó para clonar EqAqB8/1 en el vector de expresión pMT/BiP/V5-His modificado, utilizado frecuentemente en el sistema de expresión de D. melanogaster³⁶⁹. El vector pMT/BiP/V5-His modificado permite la expresión de la proteína de interés fusionada a un dominio Strep-Tagx2 para su purificación, y a la secuencia de secreción BiP para obtenerla en el sobrenadante del cultivo (la secuencia BiP es cortada por la maguinaria celular antes que la proteína sea secretada³⁷¹). Al momento de utilizarlo, el vector contenía la secuencia codificante correspondiente a una proteasa del virus de leucosis bovina (BLVp, de ~400 pb), que se estaba expresando en ese momento en la laboratorio de Inmunovirología. La estrategia de clonado de la secuencia de EgAgB8/1 desde la construcción proporcionada por GenScript al vector de expresión pMT/BiP/V5-His modificado se realizó por RFcloning, a través de dos pasos de PCR (tal como se describió en la sección 2.4.2.2.1). La primer PCR utilizó cebadores genéricos para amplificar la secuencia de ADN de EgAgB8/1 acoplada a los cebadores genéricos, a partir de la construcción proporcionada por GenScript (Figura 2.2 E, panel izquierdo). Los productos de la PCR se corrieron en geles de agarosa a partir de los cuales se purificaron los fragmentos de ADN amplificados. Utilizando estos fragmentos purificados como cebadores y el vector de expresión como molde, se realizó una segunda PCR, en la cual la secuencia de EqAqB8/1 se insertó en el vector de expresión, reemplazando la secuencia que codificaba para BLVp (Figura 2.2 E, panel derecho).

A continuación, se transformaron bacterias *E. coli* XL1 con el producto del clonado por *RF-cloning* (segunda PCR) y se sembraron en medio LB agar con ampicilina. Dado que el vector de expresión confiere resistencia a la ampicilina, en presencia de este antibiótico se esperaba que solo crecieran bacterias transformadas. Mediante PCR de colonias únicas y utilizando los primers genéricos, se

determinó cuáles de ellas estaban transformadas con el vector de expresión conteniendo *EgAgB8/1* y no el gen para BLVp (inicialmente inserto en el vector de expresión). En la Figura 5.5 A se muestra que 8 (identificadas del 1 al 8) de las 16 colonias seleccionadas para el análisis por PCR se encontraban transformadas con el vector de expresión conteniendo *EgAgB8/1*, mostrando bandas coincidentes con el peso molecular de la secuencia de *EgAgB8/1* flanqueada de los cebadores genéricos (258 pb). Además, en este análisis se verifica también la presencia de bandas de entre 300 y 400 pb correspondientes a la secuencia de BLVp y los cebadores genéricos. Luego, las 8 colonias bacterianas transformadas con el vector conteniendo *EgAgB8/1* se expandieron y se extrajo el ADN plasmídico mediante *midiprep* (Figura 5.5 B, la existencia de más de una banda se explica por las conformaciones que puede adoptar este vector), permitiendo la obtención de 10 µg/mL para la expresión en *D. melanogaster*. La identidad de secuencia se verificó por secuenciación (en 5 de las 8 colonias positivas).



Figura 5.5. Análisis por electroforesis en agarosa 1% (p/v) del producto de PCR de colonias únicas transformadas con el producto de *RF-cloning* y purificación del vector de expresión conteniendo *EgAgB8/1* por *midiprep*. (A) Cada carril corresponde al producto de la PCR de una colonia de bacterias transformadas con el producto del clonado de EgAgB8/1 en el vector pMT/BiP/V5-His modificado por la técnica de *RF-cloning*. Se observan bandas que coinciden con el tamaño de la secuencia correspondiente al *EgAgB8/1* flanqueado por cebadores genéricos (258 pb, flecha) y bandas entre 300 y 400 compatibles con la presencia de BLVp, inicialmente presente en el vector de expresión. (B) Corresponde al vector de expresión purificado por *midiprep* a partir de las 8 colonias positivas seleccionadas en A. Se observan bandas con diferente tamaño que se asocian con las distintas conformaciones adoptadas por el vector cerrado.

Para la expresión en *D. melanogaster*, las células S2 se transfectaron con el vector de expresión conteniendo *EgAgB8/1* (metodología descripta en 2.4.2.2.2). Para verificar el éxito de la transfección se realizó una PCR utilizando cebadores genéricos y como molde las muestras del cultivo de células S2 transfectadas (pellet celular y sobrenadante). El análisis por electroforesis en gel de agarosa del producto de esta PCR (Figura 5.6) mostró la ausencia de bandas correspondientes a la secuencia de *EgAgB8/1* en el sobrenadante de cultivo y la presencia de una banda correspondiente a *EgAgB8/1* en las células S2. Esto aseguró que el resultado positivo no se debió a restos de plásmido en el cultivo luego de la transfección, y que efectivamente hubo incorporación del plásmido a las células.



Figura 5.6. Gel de agarosa 1% (p/v) correspondiente al producto de PCR de células S2 transfectadas con el vector de expresión conteniendo *EgAgB8/1***. Se utilizaron los cebadores genéricos y los siguientes moldes: C+: el vector de expresión de** *EgAgB8/1* **(control positivo y referencia), son: sobrenadante del cultivo de células S2 transfectadas (control negativo), cél: células S2 transfectadas con el vector de expresión de** *EgAgB8/1***; Se indica con una flecha la banda correspondiente a** *EgAgB8/1***. Las bandas de menor tamaño corresponden a los dímeros de primers.**

Luego de la obtención de las células transformadas, se comenzó a ajustar la producción de la proteína rEgAgB8/1_{s2}. Inicialmente se indujo su producción mediante la adición de CdCl₂ durante diferentes tiempos, para evaluar el rendimiento y calidad de la proteína obtenida y poder definir las condiciones de expresión óptimas. Los cultivos (Figura 5.7 A) se mantuvieron por 4, 7 o 12 días de inducción y se evaluó la expresión de rEgAgB8/1s2 en fracciones correspondientes al sobrenadante de cultivo y al pellet de células para los distintos tiempos (Figura 5.7 B). A los 4 días de inducción se hizo visible en el sobrenadante una banda de PM aparente entre 10 y 15kDa, compatible con rEgAgB8/1_{s2}, la cual se intensificó a los días 7 y 12. La banda estuvo ausente en el pellet correspondiente a los distintos tiempos ensayados. La presencia de rEgAgB8/1₅₂ en el sobrenadante de cultivo se verificó por Western blot (Figura 5.7 C) utilizando para el revelado el sobrenadante de cultivo del hibridoma que permitió la producción del Mo-EB7. A tiempo final se realizó la purificación de rEgAgB8/1₅₂ por cromatografía de afinidad utilizando una columna comercial de agarosa Strep-Tactin XT (con afinidad por Strep-Tagx2, Figura 5.7 A). En los últimos 4 carriles de la Figura 5.7 B se muestra, como ejemplo, la purificación a partir del cultivo con 7 días de inducción; rEgAgB8/1_{s2} es retenido por la cromatografía aplicada aunque debió utilizarse una columna de 5 mL para realizar la purificación en un único paso (la menor capacidad de la columna de 1 mL llevó a saturación de la unión y aparición de producto en la fracción FT, Figura 5.7 C). Como paso final, rEgAgB8/1_{S2} se sometió a cromatografía de inmunoafinidad, tomando ventaja de la columna casera de Sefarosa conteniendo VHH₅ anti-EgAgB8/1 (preparada según se mencionó anteriormente). En la Figura 5.7 D se observa que rEgAgB8/1_{s2} interacciona con los anticuerpos inmovilizados, quedando sólo una pequeña proporción en la fracción FT y en el primer lavado realizado con alta fuerza iónica (1M NaCl) y estando ausente en el resto de las fracciones correspondientes al lavado. La disminución a pH 4 y 5 no tuvo efecto pero a pH=2.5 permitió eluir rEgAgB8/1₅₂ con mayor grado de pureza (desaparición de bandas de alto PM presentes en la fracción inicial). El análisis de rEgAgB8/1₅₂ por SDS-PAGE mostró principalmente una banda de


Figura 5.7. Purificación de rEgAgB8/1_{s2} **por cromatografía de afinidad con Strep-Tactin XT seguida de inmunoafinidad con VHH**_s **anti-EgAgB8/1**. (A) Imágenes del cultivo de células S2 inducido y de la columna de agarosa comercial Strep-Tactin XT, utilizada para la purificación por cromatografía de afinidad, y la columna de Sefarosa casera conteniendo los VHH_s anti-EgAgB8/1 inmovilizados (B y C) Análisis por SDS-PAGE y Western blot, respectivamente, del sobrenadante (S) y pellet (P) derivados del cultivo de células S2 inducidos por 4, 7 y 12 días y de las fracciones colectadas durante la purificación de rEgAgB8/1_{s2} por cromatografía de afinidad (Step-Tactin XT) del S obtenido de la expresión por 7días. (D) Análisis por SDS-PAGE de las fracciones obtenidas durante la cromatografía de inmunoafinidad (VHH_s anti-EgAgB8/1) del eluído de la columna Strep-Tactin XT. En todos los casos, la electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida (15%) bajo condiciones reductoras (6mM de DTT) y las proteínas se visualizaron con azul de Coomassie. Para el Western-blot, las proteínas se trasfirieron a una membrana de PVDF y se reveló la presencia de EgAgB8/1 mediante la incubación con el sobrenadante de cultivo del hibridoma EB7, MPM: marcador de peso molecular; FT: fracción no retenida por la columna; L: lavados; L 1M: lavados con PBS conteniendo 1M de NaCl; L PBS: lavados con PBS; eluídos: rEgAgB8/1_{s2}.

entre 10 y 15 kDa, aunque la formación de oligómeros de mayor PM no se puede descartar dado que el análisis por Western Blot revela bandas de mayor peso molecular (Figura 5.7 C). Se obtuvieron 0.97, 2.23 y 2.57 mg de rEgAgB8/1_{s2} luego de 4, 7 y 12 días de inducción de la

expresión, respectivamente. El rEgAgB8/1_{S2} se preservó en PBS_{E-B-AbAm} y en una atmósfera de nitrógeno a 4°C al igual que el EgAgB_{IP}. Las preparaciones obtenidas se caracterizaron tal como se describe a continuación.

5.2.3. Caracterización del EgAgB_{IP} nativo y de rEgAgB8/1_{S2}

Se analizó la calidad de las preparaciones en términos de su tamaño molecular mediante DLS, su tamaño molecular y carga de lípidos por electroforesis en geles nativos de poliacrilamida y su composición lipídica mediante el análisis por HPLC-MS/MS para lípidos.

El análisis mediante DLS mostró una alta homogeneidad en ambas preparaciones, basados en los gráficos ajustados por volumen que mostraron un único pico correspondiente a un componente que representa aproximadamente el 99% del contenido total. El EgAgB_{IP} mostró un R_H=5.6 ± 0.4 (Figura 5.8) que es compatible con el obtenido para las preparaciones de EgAgB_{AbAm} purificadas sin el paso final de inmunoafinidad (5.7 ± 0.5, Figura 3.3). Por otra parte, el rEgAgB8/1₅₂ obtenido a partir del sobrenadante de cultivo de células S2 colectado a los 4, 7 y 12 días p.i. mostró valores de R_H de 8.3 ± 0.5, 7.8 ± 0.3 y 13.8 ± 0.7, respectivamente. Esto reveló que la apolipoproteína se armó como una macromolécula de gran tamaño, pudiendo adoptar inclusive un tamaño mayor al EgAgB_{IP}, probablemente como consecuencia de su oligomerización y unión a lípidos presentes en el cultivo de dichas células. Este resultado era esperable dada la naturaleza del EgAgB y el hecho que todas las rEgAgB8/1-3 producidas en E. coli mostraron capacidad para oligomerizar y unir lípidos bacterianos (incluyendo gran variedad de fosfolípidos y ácidos grasos³⁹²). Otra observación de interés fue la variación en el R_H de las partículas obtenidas en función del tiempo de expresión p.i., que se extendió hasta 12 días buscando acumular la proteína en el sobrenadante para lograr un mayor rendimiento. A los 4 y 7 días el tamaño de rEgAgB8/1_{s2} fue similar y algo mayor a lo reportado para la partícula lipoproteica nativa. Sin embargo, este valor aumentó aún más a los 12 días, obteniéndose una partícula con casi el doble de R_H. Por otra parte, si bien el cultivo inducido se suplementa con una proporción de medio fresco cada 72 horas, observamos que la viabilidad de las S2 decae con el tiempo (se hace evidente a partir del octavo día), lo cual podría introducir modificaciones en los componentes hidrofóbicos incorporados en el rEgAgB8/1_{s2} que influencien las propiedades de la lipoproteína. Buscando la mayor similitud del rEgAgB8/1₅₂ con el EgAgB_{IP} a nivel del tamaño de las partículas, y tomando en cuenta la viabilidad de las células S2 y que la producción a los 4 días tuvo menor rendimiento, consideramos 7 días como tiempo óptimo para la obtención de la rEgAgB8/1_{s2}.

El análisis del EgAgB_{IP} y rEgAgB8/1_{S2} en geles nativos de poliacrilamida también permitió obtener información sobre el tamaño molecular. Además, se analizó en paralelo el plasma humano y murino y fracciones de HDL (HDL-2, HDL-3) y LDL humanas purificadas del plasma, haciendo posible comparar la distribución de tamaño de las preparaciones de EgAgB con el de estas lipoproteínas de dimensiones conocidas. Tal como se muestra en la Figura 5.9, las fracciones lipoproteicas HDL-2 y HDL-3 humanas presentaron el rango de tamaño esperado, siendo el promedio aproximado de 9.7 nm y 6.8 nm, respectivamente. En el EgAgB_{IP} se identificaron hasta 3 bandas principales con un diámetro promedio aproximado de 7 nm para la banda mayoritaria y 10.7 y 13.1 nm para las minoritarias (Figura 5.9 A). El rEgAgB8/1_{S2} mostró un diámetro de partícula promedio de 11.9 nm. Por otra parte la tinción con Negro Sudán permitió demostrar que ambas formas del EgAgB presentaron una carga significativa de lípidos, aunque el rEgAgB8/1_{S2} mostró un contenido lipídico relativamente menor al de EgAgB_{IP} (Figura 5.9 B).



Figura 5.8. Análisis por DLS del tamaño de EgAgB_{IP} y rEgAgB8/1_{S2}. Se determinó por DLS el R_H del EgAgB_{IP} y rEgAgB8/1_{S2} obtenido a los 4, 7 y 12 días p.i. de la expresión en células S2. La medición se realizó a una concentración de 1 mg/mL tomando tres medidas consecutivas a 25 °C en el equipo Zetasizer NanoS (MALVERN). Los gráficos muestran el R_H promedio de tres determinaciones consecutivas corregidas por el volumen.



Figura 5.9. Caracterización de EgAgB_{IP} y rEgAgB8/1_{S2} y su comparación con lipoproteínas plasmáticas por electroforesis en geles nativos de poliacrilamida. Las muestras se analizaron en geles nativos de poliacrilamida en gradiente de densidad (4-20%). Se muestra en (A) la tinción con azul de Coomassie para revelar la presencia de las proteínas y en (B) la tinción con Negro Sudan para revelar la presencia de lípidos en las diferentes sub-fracciones.

La composición lipídica del EgAgB_{IP} y del rEgAgB8/1_{S2} obtenido luego de 7 días p.i se analizó por espectrometría de masa, de forma análoga a lo que se describió para el EgAgB nativo (ver capítulo 3, sección 3.2.3). Los resultados referentes al contenido de los 50 lípidos neutros (principalmente ácidos grasos, de triplicados analíticos) y polares (principalmente fosfolípidos, de duplicados



Figura 5.10. Análisis comparativo de los componentes hidrofóbicos presentes en EgAgB_{IP} y rEgAgB8/1_{s2} en relación a la preparación de EgAgB nativo con dos rondas de ultracentrifugación (2^{da} UC). Los lípidos presentes en las preparaciones 2^{da} UC, EgAgB_{IP} y rEgAgB8/1_{s2} se extrajeron con solventes orgánicos utilizando el método de Folch y se analizaron por HPLC-MS/MS utilizando las columnas HILIC y C4 (duplicados y triplicados analíticos, respectivamente). Los resultados se representan separadamente para los lípidos neutros y polares utilizando *heatmaps* a los efectos de visualizar similitudes y diferencias en el perfil lipídico entre las muestras. Los paneles muestran la abundancia relativa de las especies lipídicas normalizadas, según la escala de colores indicada.

analíticos) más abundantes se representan como *heatmaps* en la Figura 5.10 y se listan en la Tabla S5.1. La composición lipídica de EgAgB_{IP} y rEgAgB8/1_{S2} difirió en relación al EgAgB nativo presente en Ld_f (2^{da} UC), siendo rEgAgB8/1_{S2} la que exhibió mayores diferencias. Al comparar la abundancia relativa promedio entre la preparación Ld_f (2^{da} UC) y el EgAgB_{IP} se registraron incrementos/disminuciones de abundancia menores a 10 veces en los componentes neutros y polares, siendo los primeros menos variables que los últimos (relación 2^{da} UC/EgAgB_{IP}, Tabla S5.1). Sin embargo, rEgAgB8/1_{S2} se diferenció claramente de la Ld_f (2^{da} UC) y de EgAgB_{IP} por carecer de

muchos de los principales componentes lipídicos neutros y polares: se detectó principalmente ácido hexadecanoico (C16:0), seguido del los ácidos octadecenoico (C18:1), hexadecenoico (C16:1) y tetradecanoico (C14:0), en orden decreciente, y una abundancia disminuída de los ácidos docosapentaenoico (C22:5), docosatetraenoico (C22:4) y tetracosadienoico (C24:2) pero también de otros componentes (relación EgAgB_{IP}/ rEgAgB8/1_{S2} mayor a 10, Tabla S5.1). A nivel de los lípidos polares del rEgAgB8/1_{S2} fue muy llamativa la presencia de pocas especies, careciendo de la mayoría de las identificadas en el EgAgB nativo (Tabla S5.1 B), lo cual podría afectar el entorno en el cual se expone la apolipoproteína.

Finalmente como parte de la caracterización se determinó la capacidad de EgAgB_{IP} y rEgAgB8/1_{S2} de afectar la viabilidad e inducir per se la secreción de citoquinas pro-inflamatorias en macrófagos THP-1. Para este fin los macrófagos se incubaron con 1, 10 y 20 μ g/mL de EgAgB_{IP}, rEgAgB8/1₅₂ o su respectivo vehículo (PBS_{E-B-AbAm}) y con LPS (10 ng/mL, como control de la respuesta celular) por 24 horas. Se determinó la viabilidad celular en forma indirecta, mediante el ensayo de MTT. Este ensayo colorimétrico permite cuantificar el formazán que se genera como consecuencia de la reducción enzimática del MTT por la succinato deshidrogenasa mitocondrial, por lo que sólo ocurre en células viables. Por tanto, se puede relacionar la cantidad de formazán generado (determinado por absorbancia a 560 nm) con la viabilidad celular, aunque hay que tener presente que variaciones en su nivel también podrían indicar alteración del metabolismo mitocondrial o proliferación. Como se observa en la Figura 5.11 A, a las concentraciones ensayadas ninguna de las preparaciones provocó cambios en la actividad mitocondrial de los macrófagos durante las 24 horas de exposición, sugiriendo que no hubo pérdida de la viabilidad. Por otra parte, la cuantificación de los niveles de IL-1 β e IL-6 en los sobrenadantes de cultivo de los macrófagos (Figura 5.11 B y C), mostró que concentraciones de 1 y 10 μ g/ml del EgAgB_{IP} y el rEgAgB8/1_{S2} no indujeron la secreción de niveles de citoquinas; a 10 µq/ml ambas preparaciones mostraron una tendencia a la secreción de IL-1 β , pero se no alcanzó la significancia estadística. A 20 μ g/mL se mantuvo el efecto nulo en la respuesta de IL-6, pero ambas preparaciones promovieron la producción de IL-1β aunque en niveles muy inferiores a los generados por la estimulación con LPS. Para comparar la calidad de EgAgB_{IP} y rEgAgB8/1_{S2} con las preparaciones previas (EgAgB_{AbAm}) se calculó el índice de actividad normalizada (cociente entre los niveles de IL-1 β o IL-6 inducidos por las preparaciones de EgAgB a 10 μg/mL y del LPS a 10 ng/mL). Para la IL-1β, este índice fue de 0.061 y 0.026 para el EgAgB_{IP} y rEgAgB8/1_{S2}, respectivamente, indicando un importante descenso en relación al valor de 0.141 reportado para EgAgBAbAm. En referencia a la IL-6, los índices se mantuvieron por debajo de 0.016 (calculado en base al límite de detección del ELISA), al igual que para EgAgB_{AbAm}. En concordancia con estos resultados, el análisis de las preparaciones de EgAgB_{IP} y rEgAgB8/1₅₂ (obtenidas en forma independiente) mediante el test de endotoxinas LAL nos permitió determinar que las muestras contenían niveles de LPS menores a los obtenidos en las preparaciones anteriores, y que se estimaron entre 0.09 ng y 0.02ng de LPS/µg de proteína (lotes correspondientes a los gráficos de la Figura 5.11).



Figura 5.11. Efecto de EgAgB_{IP} y rEgAgB8/1_{S2} sobre la viabilidad y la inducción de citoquinas proinflamatorias en macrófagos THP-1. Se estimularon $0.2x10^6$ macrófagos THP-1 con EgAgB_{IP} o rEgAgB8/1_{S2} (1, 10 o 20 µg/mL), LPS (10 ng/mL) o PBS_{E-B-AbAm} (vehículo) por 24 horas. (A) Nivel de viabilidad determinado indirectamente en función de la actividad mitocondrial medida por la reducción del MTT a formazán. Se tomó como 100% de viabilidad el nivel de formazán (Abs_{560 nm}) de los macrófagos cultivados en medio (M, control). Los resultados muestran el % de viabilidad promedio relativo al control ± SEM correspondiente a dos experimentos con triplicados analíticos. (B) y (C) Niveles de IL-1 β e IL-6 (pg/m)L, respectivamente, presentes en los sobrenadantes de cultivo determinados por ELISA de captura. Se grafica el promedio ± SEM de tres experimentos independientes utilizando triplicados analíticos. Se indican con (*) los datos que mostraron diferencias significativas con el control de vehículo (ANOVA de dos vías y prueba de Tukey, * p < 0.05, **** p < 0.0001).

Estos resultados mostraron que las estrategias diseñadas fueron relativamente exitosas ya que mejoraron la calidad de las preparaciones de EgAgB. De todas maneras, se retuvo cierta actividad pro-inflamatoria que se hizo evidente al utilizar concentraciones de 20 μg/ml (para IL-1β, ya que en el caso de IL-6 los niveles no alcanzaron la significancia estadística), por lo cual no puede descartarse que sea consecuencia de trazas de LPS. En cualquier caso, dada la presencia de estas trazas aún luego de los sucesivos pasos de purificación, los resultados sugieren que estas moléculas de LPS no estarían libres sino asociadas a la partícula de EgAgB.

De acuerdo con el conjunto de los resultados obtenidos, se prepararon varios lotes de EgAgB nativo y dos de rEgAgB8/1_{S2} siguiendo la metodología descripta anteriormente. Se continuaron los estudios sólo con aquellas preparaciones que presentaban índices de actividad normalizada por la respuesta al LPS menores o iguales a 0.1 para IL-1β y 0.02 para IL-6 (valor obtenido a partir del

límite de detección del ensayo). En todos los casos que fue posible también se analizaron mediante el test LAL constatando que la estimulación con 10 µg/mL de aquellas preparaciones que mostraron contener menor nivel de LPS (entre 0.01-0.02 ng de LPS/µg de proteína) generó niveles detectables de IL-1β (entre 87 y 159 pg/mL) que tendieron a ser superiores al medio (entre 39 y 83 pg/mL), aunque no alcanzaron la significancia estadística. Por esta razón no resulta posible concluir si esta actividad se asocia a la presencia de LPS o es intrínseca del EgAgB. Finalmente, por simplicidad, a partir de aquí nos referiremos a las preparaciones EgAgB_{IP} y rEgAgB8/1_{S2} como EgAgB y rEgAgB8/1, respectivamente.

5.3. Modulación por el EgAgB de la activación inflamatoria de macrófagos inducida *in vitro* por agonistas de TLRs

Se evaluó el efecto del EgAgB y rEgAgB8/1 sobre macrófagos realizando ensayos donde las células se estimulan con distintos agonistas de PRRs para promover una activación inflamatoria. El uso de distintos agonistas resultó de interés para establecer si los eventuales efectos moduladores resultaban similares o diferentes según el agonista utilizado. Inicialmente se llevaron a cabo experimentos con macrófagos THP-1 y luego, como modelo paralelo, se utilizaron macrófagos murinos derivados de médula ósea (BMDM). Cabe mencionar que en algunos estudios se observaron diferencias en la intensidad de la respuesta de los macrófagos entre experimentos independientes, posiblemente asociadas a la preparación celular y/o a variaciones inherentes a los reactivos (variación en la actividad de los stock de agonista) y/o manipulación. Para disminuir estos efectos, cuando se indica, los resultados se normalizaron tomando como 100% la respuesta del agonista utilizado.

5.3.1. Efectos sobre la activación de macrófagos THP-1

Tomando en cuenta los antecedentes el primer estímulo utilizado fue el LPS, agonista del receptor TLR4. Se realizaron ensayos preliminares para evaluar la respuesta al LPS en un amplio rango de concentraciones, estimulando los macrófagos y cuantificando los niveles de IL-1β e IL-6 en el sobrenadante de cultivo a las 24 horas. Los resultados (Figura 5.12 A y B) muestran que 1 ng/mL fue suficiente para generar una respuesta notoria en términos de inducción de IL-1β e IL-6 (notar que a 0.1 ng/mL de LPS no se observó producción significativa de ninguna de las citoquinas). Además, se observó un incremento sostenido de los niveles de estas citoquinas al aumentar la concentración de LPS sin alcanzar la saturación. Apuntando a utilizar la menor concentración de LPS necesaria para generar una buena respuesta de IL-1 β e IL-6 y en base a la experiencia del grupo de investigación, se seleccionó la dosis de 10 ng/mL para analizar el efecto del EgAgB sobre la activación de los macrófagos (Figura 5.12 C-E). Nuevamente comprobamos que concentraciones de 1 y 10 µg/mL de las preparaciones de EgAgB y rEgAgB8/1 no indujeron per se la secreción de IL-6 ni IL-1 β ; se detectó IL-1 β en el sobrenadante de cultivo cuando se utilizó 10 µg/mL del EgAgB, pero esta tendencia no alcanzó la significancia estadística. Por otro lado, cuando los macrófagos se estimularon con 10 ng/mL de LPS en presencia de EgAgB o rEgAgB8/1 se observó una disminución en la respuesta de IL-1β e IL-6 secretadas. En el caso de la IL-1β, el efecto del EqAgB fue dosis dependiente y los niveles cayeron en un 49% y 80% cuando se ensayaron concentraciones 1 y 10 µg/mL, respectivamente. En el caso de la IL-6 la inhibición provocada por ambas preparaciones fue más marcada aún que para IL-1β. Este resultado reproduce aquellos logrados con el EgAgB_{EB7} y

permite evidenciar la capacidad del EgAgB nativo (como partícula lipoproteica) de interferir con la respuesta promovida por el LPS en los macrófagos, al menos en términos de la producción/liberación de citoquinas pro-inflamatorias. Además mostró que a pesar de las diferencias observadas en tamaño y composición lipídica, el rEgAgB8/1 se comportó de forma similar a EgAgB, aunque mostró menor capacidad para modular la respuesta de IL-1β (a 1 µg/mL no provocó una disminución de acuerdo con el test estadístico).

Los TLRs ensamblados en la membrana plasmática (incluyendo TLR2 y TLR4) activan la vía asociada al adaptador MyD88 mientras que los TLRs presentes en las membranas de endosomas (incluyendo TLR3) activan la vía dependiente del adaptador TRIF. El TLR4 es una excepción porque si bien está en la membrana plasmática, además es endocitado y puede activar la vía dependiente de TRIF. Las vías asociadas a MyD88/TIRAP y TRIF/TRAM convergen en cierta medida, por ejemplo, a nivel de la activación del factor NFκB, que dirige la expresión de las citoquinas IL-1β, IL-6 e IL-12, pero también muestran diferencias ya que sólo la vía dependiente de TRIF conduce a la transcripción de interferones de tipo I como el IFN-β. Buscando complementar los resultados, y apuntando a la comprensión de la posible modulación a nivel de las vías de activación intracelular gatilladas por el EgAgB, se cuantificaron en los sobrenadantes de cultivo los niveles de IFN-β. Como se puede observar en la Figura 5.12, el EgAgB nativo y rEgAgB8/1 inhibieron fuertemente los niveles de IFN-β inducidos por LPS, anulándolos por completo a una concentración de 10 μg/mL.

Para ampliar el análisis de los efectos del EgAgB sobre la activación de los macrófagos THP-1 apuntamos a evaluar efectos sobre la inducción/actividad de la NOS2 o iNOS, enzima que como ya se comentó es relevante para la generación de especies reactivas del nitrógeno. Con este fin, se analizaron en el sobrenadante de cultivo, por el método de Griess, los niveles de nitrito (NO₂.) ya que el NO· eventualmente formado por la actividad de esta sintasa difunde a través de las membranas biológicas y se oxida en el sobrenadante celular generando NO₂, entre otros derivados. Sin embargo, en las condiciones que se ensayaron no se detectó generación de NO₂- en respuesta al LPS invalidando este análisis (los niveles de NO₂- no se diferenciaron del control de vehículo y fueron 1.1 ± 1.9 y 3.2 ± 2.9 µM para los macrófagos THP-1 incubados con el vehículo y con LPS, respectivamente). Cabe resaltar que en estos ensayos, las preparaciones de EgAgB tampoco indujeron *per se* la producción de NO₂-; los niveles de NO₂- en las células incubadas con la lipoproteína a la concentración de 10 µg/mL no fueron significativamente diferentes del control (1.7 ± 2.6 µM).

En conjunto, utilizando la línea celular THP-1 de origen humano, se observó que las preparaciones del EgAgB y rEgAgB8/1 tienen la capacidad de modular la activación inflamatoria inducida por LPS en macrófagos, inhibiendo la secreción de IL-1 β e IL-6 asociadas principalmente a la activación de las vías dependientes de MyD88/TIRAP, y del IFN- β , asociado a la vía TRIF/TRAM.



Figura 5.12. Efecto del EgAgB sobre la secreción de IL-1β, IL-6 y IFN-β inducida por LPS en macrófagos THP-1. Se estimularon 0.2×10^6 macrófagos THP-1 con (A, B) LPS a distintas concentraciones (0.1-1000 µg/mL) ó (C-E) EgAgB o rEgAgB8/1 (1 y 10 µg/mL) en ausencia o presencia de LPS (10 ng/mL). En todos los ensayos se utilizó el tampón de disolución de las preparaciones de EgAgB (PBS_{E-B-AbAm}) como control de vehículo. A las 24 horas se cuantificaron las citoquinas IL-1β, IL-6 e IFN-β presentes en los sobrenadantes de cultivo por ELISA de captura. Se grafican los niveles promedio (pg/mL) ± SEM correspondientes a tres experimentos (A, B, expresado como porcentaje), cuatro experimentos (C y D) y dos experimentos (E) independientes, cada uno utilizando triplicados analíticos. Los datos corresponden a dos lotes de EgAgB y rEgAgB8/1 (réplicas biológicas). Se indican con (*) sobre las barras las diferencias significativas con el control (A y B) o con el LPS (C-E) y sobre corchetes las diferencias significativas entre muestras (ANOVA de dos vías y prueba de Tukey, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

Como hipótesis se planteó que el componente lipídico del EgAgB sea responsable total o parcialmente de los efectos moduladores observados sobre la activación inducida por LPS en los macrófagos; sería posible que trás la interacción con estas células el EgAgB liberara parte de su contenido lipídico. En un intento por indagar esta hipótesis, se extrajeron los lípidos del EgAgB por el método descripto por Folch²⁰⁵ (sección 2.5.2.1) y se utilizaron en ensayos de inhibición de la activación de macrófagos análogos a los descriptos anteriormente. Considerando que los componentes proteico y lipídico de EgAgB nativo se encuentran en una relación aproximada de 1:1, las fracciones obtenidas se ensayaron a 10 y 20 µg/mL y se sumó el control del vehículo (DMSO). Los resultados se resumen en la Figura 5.13. Los vehículos utilizados (PBS_{E-B-Abam} y DMSO, para la lipoproteína nativa y su fracción lipídica, respectivamente) no afectaron en forma significativa los niveles de IL-1β e IL-6 inducidos por LPS a 10 ng/mL. Por otro lado, ni el EgAgB ni los lípidos del EqAqB per se indujeron la secreción de estas citoquinas. Resultó interesante que las fracciones lipídicas provocaron un descenso de los niveles de IL-1β e IL-6 inducidos por LPS, el cual fue de menor magnitud que el producido por el EgAgB nativo a la misma concentración (por ejemplo para IL-1β, a 10 μ g/mL el EqAqB inhibió la respuesta en un 70% y sus lípidos en un 28%). Estos resultados sugieren que los lípidos que componen la lipoproteína nativa podrían contribuir, al menos de forma parcial, en la modulación ejercida por el EgAgB sobre los macrófagos. Corresponde mencionar que resultó difícil continuar trabajando con las fracciones lipídicas porque se debe destinar una importante cantidad de las preparaciones de EgAgB para su obtención ya que de lo contrario es difícil poder cuantificar la concentración de lípidos en la muestra (se determinó por gravimetría). Además, se necesitó obtener soluciones relativamente concentradas (2 mg/ml) ya que al ser DMSO el diluyente, sólo puede utilizarse un volumen pequeño de muestra en relación al volumen final en el pozo de la placa de cultivo, considerando que una relación mayor al 0.5% de DMSO comienza a afectar la viabilidad celular⁴⁰⁰.



Figura 5.13. Participación del componente lipídico del EgAgB en la modulación de la secreción de IL-1 β e IL-6 inducida por LPS en macrófagos THP-1. Se estimularon $0.2x10^6$ macrófagos THP-1, en ausencia o presencia de LPS (10 ng/mL), con EgAgB (10 µg/mL) o su componente lipídico (10 y 20 µg/mL, extraído con solventes orgánicos). Se utilizaron controles de los correspondientes vehículos (PBS_{E-B-AbAm} y DMSO). A las 24 horas se cuantificaron las citoquinas presentes en los sobrenadantes de cultivo por ELISA de captura. Se grafican los niveles promedio de IL-1 β (A) e IL-6 (B) (pg/mL) ± SEM correspondientes a dos experimentos independientes utilizando triplicados analíticos. Se indican con (*) sobre las barras las diferencias significativas con el LPS y sobre corchetes las diferencias significativas entre muestras (ANOVA de dos vías y prueba de Tukey, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001).

Para avanzar en la caracterización del efecto modulador del EgAgB sobre los macrófagos, se realizaron ensayos similares con el zymosán, material que contiene principalmente β-glucanos derivados de la levadura Saccharomyces cerevisiae y que es reconocido por el heterodímero TLR2/TLR6. Al igual que para el LPS, en primer lugar se determinó la concentración óptima de zymosán a utilizar en los ensayos con el EgAgB, que permitiera detectar la respuesta celular así como el eventual efecto inmunomodulador. Para ello, se estimularon macrófagos THP-1 con diferentes concentraciones de zymosán (0.01, 0.05, 0.1, 0.5 y 1 mg/mL) por 24 horas y luego se midió la concentración de las citoquinas IL-1ß e IL-6 en el sobrenadante de cultivo. El resultado de este ensayo se muestra en la Figura 5.14 A y B, donde se observa que el zymosán indujo la secreción de forma dosis dependiente de IL-1β e IL-6, respectivamente, con saturación de las respuestas a una concentración cercana a los 0.5 mg/mL. Tomando en cuenta esto, se eligió 0.1 mg/mL de zymosán para ensayar la capacidad moduladora del EgAgB ya que produjo una respuesta de buena magnitud en los macrófagos y en un rango fuera de la saturación. El EgAgB y rEgAgB8/1 afectaron los niveles de IL-1 β e IL-6 secretados por los macrófagos activados con zymosán (Figura 5.14 C y D). En relación a la secreción de IL-1 β , se observó inhibición sólo cuando se utilizó 10 µg/mL de EgAgB o rEgAgB8/1. En el caso de la secreción de IL-6, el EgAgB causó una reducción dependiente de la concentración, alcanzando el 50% de inhibición a 10 µg/mL, mientras que el rEgAgB8/1 mostró menor actividad, observándose inhibición sólo a 10 µg/mL. Estos resultados sugirieron que el EgAgB puede interferir con la respuesta pro-inflamatoria que el zymosán desencadena en los macrófagos. Sin embargo, se cometió el error de no verificar en el momento la eventual presencia de trazas de LPS en la preparación de zymosán que pudieran influenciar la activación celular a la concentración de trabajo (0.1 mg/mL); corresponde mencionar que las especificaciones del Zymosán utilizado (Sigma) no incluyen el nivel de endotoxinas razón por la cual fue previamente lavado varias veces con medio de cultivo. Por tanto, la modulación del EqAgB sobre la respuesta inflamatoria inducida por zymosán, en términos de IL-1 β e IL-6, debe ser confirmada controlando el nivel de pirógenos del agonista.

Buscando complementar este estudio y tomando en cuenta el alto contenido de mananos del zymosán, se intentó utilizar mananos como agonista, pero las preparaciones solubles disponibles no fueron capaces, aún en altas concentraciones (2.5 mg/mL), de inducir la secreción de niveles detectables IL-1β e IL-6 por los macrófagos THP-1.



Figura 5.14. Efecto del EgAgB sobre la secreción de IL-1 β e IL-6 inducida por zymosán en macrófagos THP-1. Se estimularon 0.2x10⁶ macrófagos con (A, B) zymosán a distintas concentraciones (0.01-1 mg/mL), ó (C, D) EgAgB, rEgAgB8/1 (ambos a 1 y 10 µg/mL) o PBS_{E-B-AbAm} (vehículo) en ausencia/presencia de zymosán (0.1 mg/mL). A las 24 horas se cuantificaron las citoquinas IL-1 β e IL-6 presentes en los sobrenadantes de cultivo por ELISA de captura. Se grafican los niveles promedio (pg/mL) ± SEM correspondientes a un experimento (A, B) y tres experimentos independientes (C y D), cada uno utilizando triplicados analíticos. Se indican con (*) sobre las barras las diferencias significativas con el LPS y sobre corchetes las diferencias significativas entre muestras (ANOVA de doa vías y prueba de Tukey, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001).

Finalmente, se estudió la posible interferencia del EgAgB con la secreción de citoquinas gatillada por el Pam3CSK4, agonista del heterodímero TLR1/TLR2, y por Poly (I:C), ligando de alta afinidad del receptor endosomal TLR3. Para estos ensayos se trabajó únicamente con el EgAgB nativo. Nuevamente, a partir de las curvas de dosis-respuesta de IL-1β e IL-6 (Figura 5.15 A, B), se seleccionaron para los ensayos de modulación las dosis de 50 ng/mL y 100 µg/mL para el Pam3CSK4 y el Poly (I:C), respectivamente. A diferencia del efecto inhibitorio sobre la respuesta inducida por el LPS o zymosán, el EgAgB aumentó en algunos casos los niveles de IL-1β e IL-6 inducidos por estos agonistas; el efecto sólo se observó a 10 µg/mL de EgAgB sobre las respuestas de IL-1β inducida por Pam3CSK4a y de IL-6 inducida por Poly (I:C) (Figura 5.15 C y D). Estos resultados indicaron que el mecanismo de acción del EgAgB no ocurriría en pasos comunes a las vías de señalización gatilladas por TLRs, y probablemente involucre interacciones que tienen lugar a nivel del receptor en la membrana plasmática. Por otra parte, la potenciación leve de las respuestas inducidas por otros agonistas de TLRs podría ser consecuencia de la presencia de trazas



de LPS probablemente asociadas al EgAgB y/o de un posible efecto pro-inflamatorio del EgAgB a esa concentración.

Figura 5.15. Efecto del EgAgB sobre la secreción de IL-1 β e IL-6 inducida por Pam3CSK4 y Poly (I:C) en macrófagos THP-1. Se estimularon $0.2x10^6$ macrófagos THP-1 con los agonistas (A, B) Pam3CSK4 (1-500 ng/mL) ó (E, F) Poly (I:C) (1-500 µg /mL), y a las 24 horas se determinaron los niveles de IL-1 β (A,E) e IL-6 (B,F) en los sobrenadantes de cultivo por ELISA de captura. Similarmente, macrófagos THP-1 se estimularon con

EgAgB (1 o 10 µg/mL) o PBS_{E-B-AbAm} (vehículo) en ausencia/presencia de Pam3CSK4 o Poly (I:C) (50 y 100 ng/mL y µg/mL, respectivamente) y a las 24 horas se cuantificaron los niveles IL-1 β e IL-6 en los sobrenadantes de cultivo. En todos los casos se grafican los niveles promedio (pg/mL) ± SEM correspondientes a un experimento (A, B, E, F) y dos experimentos (C, D, G, H) independientes, cada uno utilizando triplicados analíticos. Se indican con (*) sobre las barras las diferencias significativas con el LPS y sobre corchetes las diferencias significativas entre muestras (ANOVA de dos vías y prueba de Tukey, * p < 0.05).

5.3. Efectos sobre la activación de BMDM



Figura 5.16. Efecto del EgAgB sobre la secreción de IL-6 e IL-12p40 inducidas por LPS en BMDM de ratón. (A y B) Se cultivaron 0.2×10^6 macrófagos BMDM con LPS a distintas concentraciones (0,01-1000 ng/mL) o PBS_{E-B-AbAm} (control de vehículo) y a las 24hs post-estimulación se determinaron por ELISA de captura los niveles de IL-6 o IL-12p40 en los sobrenadantes de cultivo. (C y D) Se cultivaron 0.2×10^6 macrófagos BMDM con EgAgB, rEgAgB8/1 (ambos a 1 o 10 µg/mL) o PBS_{E-B-AbAm} (control de vehículo), en ausencia/presencia de LPS (10 ng/mL), y a las 24 horas se cuantificaron IL-6 e IL-12p40 en los sobrenadantes de cultivo. Se grafican los niveles promedio (pg/mL) ± SEM correspondientes a un experimento (A, B) y a tres experimentos (C y D) independientes, cada uno utilizando triplicados analíticos. Se indican con (*) sobre las barras las diferencias significativas con el LPS y sobre corchetes las diferencias significativas entre muestras (ANOVA de dos vías y de prueba de Tukey, * p < 0.05, *** p < 0.001, **** p < 0.0001).

Para tener mayor evidencia de la capacidad moduladora del EgAgB sobre macrófagos se utilizaron como modelo BMDM de ratón. Se diseñaron ensayos análogos a los realizados con los macrófagos THP-1 utilizando LPS como agonista y evaluando la secreción de IL-6 e IL-12p40 (subunidad compartida con la IL-23); esta última citoquina resulta interesante por su capacidad de perfilar/regular las respuestas inmunes. En este modelo no fue posible analizar los efectos sobre la IL-1 β ni sobre la citoquinas anti-inflamatoria IL-10, dado que no se detectó su presencia en los sobrenadantes (incluso analizados sin diluir). De acuerdo con las curvas de dosis respuesta (Figura 5.16 A y B) se seleccionó la concentración 10 ng/mL del LPS para evaluar la eventual modulación de la activación, porque esta concentración indujo una respuesta intensa, pero no saturada, de ambas citoquinas tras 24 horas de estimulación. En primer lugar, ninguna de las formas del EgAgB -nativo y recombinante- indujeron *per se* la secreción de IL-6 o IL-12p40. Además, EgAgB y rEgAgB8/1 provocaron una potente y similar inhibición de la secreción inducida por LPS de estas citoquinas; de hecho, a 1 µg/mL ambas lipoproteínas redujeron en aproximadamente un 85 y 80% los niveles de IL-6 y IL-12p40, respectivamente, y la inhibición fue prácticamente total a 10 µg/mL (Figura 5.16 C y D).

A diferencia de los macrófagos THP-1, los ensayos con BMDM permitieron analizar el efecto del EgAgB sobre la expresión/actividad de la iNOS inducida por la estimulación con LPS. Se determinaron los niveles de NO₂- mediante el método de Griess en el sobrenadante de cultivo a las 24 horas de estimulación. Las formas nativa y recombinante del EgAgB no indujeron *per se* la generación de NO₂-, mostrando valores similares a los inducidos por el vehículo (PBS_{E-B-AbAm}). En presencia de LPS se detectó un aumento significativo en el nivel de NO₂-, que disminuyó fuertemente en presencia de EgAgB y rEgAgB8/1 (Figura 5.17).



Figura 5.17. Efecto del EgAgB sobre la generación de NO₂- inducida por LPS en BMDM de ratón. Se cuantificaron los niveles de nitrito, mediante el método de Greiss, en los sobrenadantes de cultivo donde se estimularon BMDM con EgAgB o rEgAgB8/1 (ambos a 1 o 10 µg/mL) o PBS_{E-B-AbAm} (vehículo) en ausencia/presencia de LPS (10 ng/mL) por 24 horas (experimentos correspondientes a la Figura 5.13), Se grafican el promedio de la concentración de NO₂- \pm SEM correspondiente a un experimento con triplicados analíticos (A) y el promedio normalizado por la respuesta de LPS \pm SEM correspondiente a tres experimentos independientes con triplicados analíticos (B). Se indican con (*) los datos que mostraron diferencias significativas con el LPS (ANOVA de dos vías y de prueba de Tukey, * p < 0.05, ** p < 0.01).

Además, se evaluaron en este modelo de macrófagos los efectos del EgAgB sobre la expresión de la molécula presentadora de antígeno MHC-II y las moléculas co-estimuladoras CD40 y CD86, que cumplen un papel importante en la activación de las células Th efectoras, capaces de potenciar las propiedades efectoras de los macrófagos. Para este análisis, a las 24 horas de la estimulación se despegaron las BMDM por pipeteo (con PBS en presencia de EDTA y glucosa) y se realizó la tinción de superficie para CD40 y CD86 utilizando anticuerpos conjugados a fluorocromos que permitieron la cuantificación de estas moléculas por citometría de flujo. Como se desprende de la Figura 5.18, existió un nivel basal de expresión de las moléculas (observada en presencia del vehículo y de igual magnitud para células incubadas sólo con medio) que no se modificó frente a la presencia de EgAgB y rEgAgB8/1, si bien se observó una tendencia al alza. La estimulación con LPS aumentó la expresión de CD40, CD86 y MHC-II con respecto al nivel basal, pero este aumento no se afectó cuando se co-incubó con el EgAgB o el rEgAgB8/1.



Figura 5.18. Efecto del EgAgB sobre la expresión de CD40, CD86 y MHC-II en BMDM. Se estimularon BMDM con EgAgB o rEgAgB8/1 (ambos a 1 o 10 µg/mL) y con PBS_{E-B-AbAm} (control de vehículo) en ausencia/presencia de LPS (10 ng/mL). A las 24 horas se despegaron de la placa de cultivo por pipeteo (con PBS, 3mM EDTA y 0.1 % glucosa), se incubaron con anticuerpos anti-CD40-FITC, anti-CD86-PE y anti-MHC-II-APC o sus respectivos controles (FMO) y se midió la fluorescencia por citometría de flujo. (A, B y C) Histogramas representativos de la IF obtenida para CD40 (detector FL-1), CD86 (detector FL-2) y MHC-II (detector FL-3) en un experimento con triplicados analíticos. (C, D y E) Se grafica la IF promedio (media geométrica corregida por el control FMO) \pm SEM para CD40,CD86 y MHC-II, respectivamente, correspondiente a dos experimentos independientes con triplicados analíticos (ANOVA de dos vías y prueba de Tukey, * p < 0.05, ** p < 0.01).

En conjunto, los resultados sobre modulación de la activación inflamatoria mostraron que la lipoproteína nativa, así como su forma recombinante armada en base a la subunidad mayoritaria

EgAgB8/1, tienen la capacidad de interferir con la activación gatillada por el LPS, disminuyendo la producción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1ß e IL-6, de la citoquina perfiladora de la respuesta inmune IL-12p40 y de especies reactivas derivadas del NO[.]. La información obtenida sugiere que, el componente lipídico contribuiría a la inhibición descripta. Dichos efectos podrían ser mediados por uno o más mecanismos, incluyendo interferencias a nivel de la interacción del LPS con el TLR4 en los macrófagos (por ejemplo el secuestro por el EgAgB del LPS a nivel extracelular) o por interferencias que ocurran a nivel de la señalización intracelular desencadenada por el LPS vía este receptor. La idea de que la interferencia ocurra a nivel de la interacción LPS-TLR4 toma más fuerza considerando que el EgAgB no moduló la respuesta inducida por Pam3CSK4 y el Poly (I:C), asociadas a la activación del heterodímero TLR1/TLR2 y TLR3, pero que disparan vías de señalización compartidas con el TLR4. En relación a la modulación observada sobre el zymosán, no nos dimos cuenta a tiempo que la preparación de zymosán utilizada no está controlada para los niveles de LPS, por lo cual nos quedó la duda sobre la validez de este resultado. Por otra parte, llama la atención que los efectos moduladores observados in vitro no se asociaron con modificaciones a nivel de la expresión de CD40, CD86 ni MHC-II sobre la superficie de los macrófagos, por lo que la modulación del EgAgB sobre las señales inducidas por la interacción LPS-TLR4 afecta la expresión génica en forma diferente, siendo importante a nivel de los genes que codifican las citoquinas y la iNOS y despreciable sobre los que codifican estos receptores.

5.3. Estudio de interferencia del EgAgB en la unión del LPS a los macrófagos

Los resultados obtenidos mostraron que el EgAgB es potencialmente capaz de modular la activación de macrófagos inducida por LPS hacia fenotipos inflamatorios. El primer paso para la activación de los macrófagos por este agonista es su reconocimiento por PRRs, particularmente el TLR4. Dado que las lipoproteínas plasmáticas pueden unir LPS y/o ser reconocidas por el TLR4^{401,402}, resultó posible que los efectos inhibitorios del EgAgB fueran consecuencia de la unión EgAgB-LPS en el medio extracelular, lo cual neutralizaría o alteraría la interacción del LPS con el TLR4. Para indagar sobre esta hipótesis se determinó la unión del LPS a macrófagos THP-1 por citometría de flujo utilizando LPS comercial conjugado al fluorocromo Alexa-488 (LPS*). Primero se evaluó la intensidad de la señal correspondiente a la unión del LPS* a macrófagos THP-1 ensayando distintas dosis del reactivo (en un amplio rango de concentraciones (entre 0.01 y 10 µg/mL). Se obtuvo una curva de dosis-respuesta (Figura 5.19) que mostró que concentraciones de entre 0.01 y 1 µg/mL generaron señales muy modestas de fluorescencia con respecto al control, resultando necesario utilizar mayores concentraciones de LPS*. Se optó por emplear una concentración de 5 µg/mL que fue suficiente para obtener una buena intensidad de fluorescencia sin alcanzar la saturación.

A continuación realizamos ensayos de competencia de la unión del LPS a los macrófagos por el EgAgB, utilizando un amplio rango de concentraciones (1, 10, 100 y 200 µg/mL de EgAgB). Se utilizaron diferentes condiciones, pre-incubando, co-incubando y post-incubando al EgAgB con el LPS, sin pasos de lavado y descarte de sobrenadante (sólo agregando estímulos al volumen existente). Además, en paralelo se realizaron ensayos de desplazamiento con LPS no marcado u OVA con fines comparativos. En la Figura 5.20 A y B se observa que la presencia de EgAgB antes (PRE) o durante (CO) el agregado de LPS* inhibió, en forma dependiente de la dosis, la unión del



Figura 5.19. Análisis de la unión de LPS* a macrófagos THP-1. Se estimularon macrófagos THP-1 ($0.2x10^6$ células) con cantidades crecientes de LPS* ($0.01-10 \mu g/mL$) o de medio (control de vehículo) por 30 minutos y posteriormente y se cuantificó la fluorescencia de las células por citometría de flujo. Todas las incubaciones se realizaron en presencia de NaN₃ para disminuir la posible internalización del LPS. (A) Histogramas representativos mostrando la IF en FL-1 emitida por las células incubadas en las diferentes condiciones según el patrón de colores (pintado en gris, células control; líneas en tonos de rojo, células inubadas con diferentes concentraciones de LPS*). (B) Se grafica la IF promedio (FL-1, media geométrica) ± SEM en función de la concentración de LPS* correspondiente a un experimento utilizando triplicados analíticos.

LPS* a los macrófagos, sin grandes diferencias en el grado de inhibición entre las dos estrategias (salvo a la concentración de 100 µg/mL de EgAgB donde la preincubación genera una inhibición mayor en PRE que en CO). La presencia de 200 µg/mL de EgAgB disminuyó en más de un 50% la interacción del LPS* con los macrófagos mientras que la OVA a igual concentración no alteró la unión, lo cual apoya la idea de una interferencia específica del EgAgB que no se reproduce por la presencia de una alta concentración de una proteína en el entorno (notar que el uso de OVA es un control razoznable ya que las albúminas son proteínas con capacidad de unir lípidos⁴⁰³). El efecto inhibitorio del EgAgB se diluyó en gran medida cuando la incubación del EgAgB se practicó luego del agregado de LPS* (POST), indicando que la interferencia generada por el EgAgB es más efectiva si está presente al momento en que el LPS* se pone en contacto con los macrófagos. El LPS no marcado no compitió con el LPS* por la unión, aún en presencia de concentraciones iguales de ambos reactivos (la co-incubación con LPS frío a 5 µg/ml mantuvo los valores de IF promedio entre 22.3 y 22.6, similares a los reportados para el LPS*), indicando que en presencia de 10 µg/ml de LPS no se alcanza la saturación. La introducción de un cambio en el protocolo experimental, que consistió en centrifugar las células y eliminar el sobrenadante luego de la incubación con EgAgB y previo al agregado de LPS*, modificó el resultado inhibitorio descripto (Figura 5.20 C). Bajo esta metodología el EgAgB a baja concentración (1 y 10 µg/mL) no alteró la unión del LPS* a los macrófagos mientras que a alta concentración (100-300 µg/mL) alcanzó solo un 12% de inhibición. Los resultados indican que el EgAgB es capaz de inhibir la unión del LPS a los macrófagos compitiendo desde la fase soluble por la unión a los receptores celulares. Además, de acuerdo con las condiciones usadas en la competencia surge que esta inhibición fue más eficiente cuando el EgAgB se pre- o co-incuba con el LPS. Es pertinente aclarar que los experimentos de competencia mencionados se realizaron en ausencia de SFB por lo cual la presencia de niveles suficientes de LBP para la unión del LPS podría haberse comprometido. Consideramos que esto no

fue así porque los cultivos fueron mantenidos con 5% de SFB hasta el momento de la competencia y porque se reportó la asociación de la LBP a las células en ausencia de LPS⁴⁰⁴. Además, se conoce que niveles tan bajos como 1 ng/mL de LBP (1000 veces menos que su concentración en el suero) son suficientes para la internalización del TLR4⁴⁰⁵. En concordancia con este supuesto, Sofía Lagos (tesis de Maestría⁴⁰⁶) no observó diferencias en la unión del LPS* a células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón (BMDCs) trabajando en presencia y ausencia de SFB.



Figura 5.20. Análisis de interferencia del EqAgB con la unión del LPS a los macrófagos THP-1. Se analizó la unión del LPS* (5 µg/mL) a los macrófagos THP-1 (0,2x10⁶ células) en presencia de EgAgB y OVA (proteína control) por 30 minutos a 37° C con NaN3. En (A) el EgAgB o la OVA (ambos a 200 μg/mL) se pre-, co- o post-incubaron con las células, en relación al agregado del LPS*. Se utilizó PBSE-B-AbAm como control de vehículo. En estas incubaciones no se hicieron lavados entre la adición de los ligandos. Se muestra el porcentaje de unión promedio del LPS* (relativo a la unión del LPS* en presencia del vehículo, barras blancas) ± SEM correspondiente a tres experimentos independientes utilizando triplicados analíticos. Se indican con (*) sobre las columnas los datos que mostraron diferencias significativas con el LPS* en presencia de vehículo y con (*) sobre corchetes los datos que mostraron diferencias significativas entre muestras (ANOVA de dos vías y prueba de Tukey, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001). (B) Histogramas respresentativos de la fluorescencia emitida en FL-1 por las células incubadas con LPS*, utilizando pasos de pre-, co- o postincubación con el EgAgB o pre-incubación con OVA (200 µg/mL) y su respectivo control FMO. (C) Las células se pre-incubaron con EgAgB (1-300 µg/mL) por 30 minutos, se centrifugaron, se descartó el sobrenadante y se incubaron con LPS* por otros 30 minutos. Se muestra el porcentaje de unión promedio del LPS* (relativo a la unión del LPS* en presencia del vehículo, barras blancas) ± SEM correspondiente a un experimento con triplicados analíticos.

Buscando evidencia a favor de la interacción entre el EgAgB y el LPS, se determinó por DLS si el agregado de LPS modificaba el R_H del EgAgB. Como se observa en la Figura 5.21, ambas preparaciones por separado mostraron gráficos compatibles con la presencia de poblaciones

homogéneas, siendo mayor la correspondiente al LPS ($R_{H-LPS} \sim 100$ nm vs. $R_{H-EgAgB} \sim 10$ nm). El agregado sucesivo de LPS (10 ng a 100 µg) al EgAgB produjo cambios en el perfil de los gráficos de intensidad de la luz dispersada por las partículas en la muestra; hubo aparición de picos de mayor tamaño tras el agregado de 10 a 40 µg y generación de partículas muy heterogéneas con un



Figura 5.21. Análisis por DLS del EgAgB_{IP} y del LPS solos o combinados en distintas proporciones. Se analizaron por DLS el EgAgB_{IP} y el LPS (ambos a 1 mg/mL) separadamente o realizando agregados sucesivos de LPS a la preparación de EgAgB_{IP}. Notar que la concentración de EgAgB va disminuyendo conforme aumentó el agregado de LPS. Se grafica la distribución de las poblaciones de acuerdo al tamaño estimado (R_H promedio) determinado según la medida de la luz dispersada por intensidad (gráficos de la columna

izquierda) y su valor ajustado por el volumen (gráficos de la columna derecha). Los valores corresponden al promedio de 3 determinaciones analíticas de la muestra, realizadas en forma consecutiva. Cabe destacar que en este caso se utilizó una preparación de EgAgB que fue congelada en presencia de sacarosa, por lo cual el buffer en el que se realizó la determinación difirió del empleado para las determinaciones previas pudiendo afectar el valor del R_H.

 R_{H} ~100nm (ensanchamiento del pico a 100 µg de LPS). Sin embargo, llamó la atención que al normalizar la intensidad por el volumen, no se observaron dos picos discretos (a ~10 y 100nm) ni la mezcla de ambos generó picos de mayor tamaño, sólo apareció una mínima señal con el agregado de 100 µg de LPS. Varios factores complican la interpretación de los resultados incluyendo: i) la capacidad del LPS de formar micelas a las concentraciones ensayadas que dificulta estimar su relación molar con respecto al EgAgB y ii) la metodología asume supuestos para el cálculo del R_H que podrían no ajustarse a todas las partículas en la muestra. Una posibilidad que explicaría el resultado es que los monómeros de LPS se incorporen al EgAgB sin consecuencias notorias en el tamaño promedio de la partícula (se comenta en la Discusión).

5.4. Análisis de la capacidad del EgAgB de remover colesterol de los macrófagos

Evaluamos la capacidad del EgAgB de tomar colesterol de los macrófagos en colaboración con el Dr. Julve (director del Laboratorio del Grupo de Bases Metabólicas del Riesgo Cardiovascular, Instituto de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona - España, ver nota en encabezado de página). Para estos experimentos se utilizaron dos modelos de macrófagos: macrófagos humanos derivados de la línea THP-1 y macrófagos murinos de la línea J774.A1 (ambos disponibles en el laboratorio del Dr. Julve y ampliamente utilizados para ensayos de eflujo de colesterol). Con el fin de asegurar un mayor nivel de expresión del transportador ABCA-1, en el caso de los macrófagos murinos se realizó una estimulación con AMP cíclico⁴⁰⁷. El ensayo consistió en incorporar en un primer paso colesterol tritiado a los macrófagos y luego de 48 horas remover todo el colesterol que no se incorporó a la célula y exponerlas a los posibles aceptores de colesterol por 4 horas: las lipoproteínas parasitarias EgAgB y rEgAgB8/1 y la HDL₃ como control positivo. Además, se realizaron controles con el vehículo (PBS_{F-B-AbAm}). Al finalizar este tiempo se cuantificó la marca radiactiva en el sobrenadante de cultivo y en el lisado celular. El eflujo de colesterol promovido por cada preparación se determinó como la relación entre la marca radiactiva presente en el sobrenadante y la marca total (sobrenadante y lisado celular). La Figura 5.22 resume los resultados que se desprenden de dos experimentos independientes realizados por duplicado o triplicado (ver nota al pie). Debido a la dispersión generada por diferencias en la marca con colesterol entre experimentos independientes, se normalizó el eflujo de colesterol utilizando el nivel de eflujo observado en células control (vehículo). En los ensayos con macrófagos J774, la HDL₃ a la menor concentración ensayada (25 µg/mL) mostró una tendencia a promover el eflujo de colesterol, alcanzando significancia estadística a la mayor concentración (50 μg/mL). El EqAgB nativo y su forma recombinante rEqAgB8/1 también lograron captar colesterol de los macrófagos, pero no aumentaron el eflujo de colesterol mediado por la HDL₃. En concordancia con estos resultados, el EgAgB y la rEgAgB8/1 promovieron la toma de colesterol de macrófagos THP-1, pero no se observó un nivel significativo de eflujo para la HDL₃ (se observó una tendencia que no alcanzó la significancia estadística). Este es el primer reporte que apoya la participación del

EgAgB en la toma de colesterol celular, mostrando la existencia de funciones compartidas entre esta lipoproteína y las plasmáticas⁴⁰⁸. Además, da sustento a la hipótesis del EgAgB como transportador lipídico, potencialmente capaz de adquirir aquellos lípidos que resultan imprescindibles para la sobrevida del parásito ya que no puede sintetizarlos. Una vez más, la forma recombinante del EgAgB reproduce los efectos funcionales de la partícula nativa y gana fuerza como modelo alternativo para el estudio del EgAgB.



Figura 5.22. Análisis de la capacidad del EgAgB de tomar colesterol de los macrófagos. Se plaquearon 0.2x10⁶ células/pozo de macrófagos J774 (células proliferantes, A) o 1 x 10⁶ de macrófagos THP-1 (diferenciados a partir de premonocitos THP-1 por la estimulación con 50 ng/mL de PMA por 72 horas, B). A las 96 horas se adicionó 1 µC de colesterol tritiado y se permitió su incorporación a las células durante 48 horas. Se retiró el sobrenadante y se equilibró por 18 horas con 0.2% de BSA libre de ácidos grasos (para remover el colesterol marcado en el medio de cultivo, que no haya sido incorporado a las células). En este paso a los macrófagos J774 también se les adicionó 0.3 mM de AMP cíclico para inducir la expresión de la molécula ABCA-1, transportador de colesterol en los macrófagos. Luego se incubaron las células con 25 y/o 50 μg/mL de EgAgB o rEgAgB8/1, HDL₃ (aceptor conocido de colesterol celular, control positivo del eflujo) y PBS_{E-B-AbAm} (control de vehículo). A las 4 horas se colectó el sobrenadante (centrifugando para eliminar posibles restos celulares), y se lisaron y sonicaron las células. Se adicionó al sobrenadante y al lisado celular líquido de centelleo, agitó y se realizó el conteo de la marca radiactiva. Finalmente, se determinó el eflujo de colesterol que promovió cada preparación como la relación entre la marca en el total del sobrenadante y la marca total (sobrenadante y células). Los gráficos representan el eflujo de colesterol promedio ± SEM correspondiente a dos experimentos independientes realizados por duplicado o triplicado. Se indican con (*) los datos que mostraron diferencias significativas con el vehículo (ANOVA de dos vías y prueba de Tukey, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001).

Nota

Como se comentó en la sección 2.8, estos datos experimentales fueron obtenidos por la Dra. Ana Ferreira en el marco de una pasantía y debido a la pandemia no se pudo concretar una nueva instancia para que yo pudiera continuar este estudio. Por restricciones de tiempo y cantidad de EgAgB o rEgAgB8/1 no fue posible realizar un tercer experimento independiente.

5.4. Análisis *in vivo* de los efectos del EgAgB per se y sobre la inflamación innata inducida por LPS en el peritoneo de ratón

5.4.1. Justificación del estudio y la estrategia experimental

Hasta aquí vimos que el EgAgB nativo mostró capacidad de modular ciertos efectos inflamatorios inducidos por el LPS en los macrófagos, reduciendo de forma fuerte y efectiva los niveles de IL-1β, IL-6, IL-12p40 y NO· generados. Estos efectos podrían explicarse, según analizamos, por una interferencia del EgAgB con la unión del LPS a los receptores blanco en las células, probablemente evitando la unión al TLR4, aunque no puede descartarse que exista también una señalización por parte del EgAgB. Además, estos efectos parecen vincularse con la apolipoproteína que compone el EgAgB nativo, ya que fueron reproducidos por la forma recombinante, rEgAgB8/1. Como el uso de aproximaciones in vitro tiene limitaciones, no asegura que los efectos observados ocurran en el contexto in vivo, y podrían perderse efectos ligados a la acción de otros componentes celulares o solubles no presentes en los cultivos, buscamos ahondar en los efectos del EgAgB sobre las células innatas a través de experimentos in vivo y utilizando al LPS como estímulo inflamatorio. En estos estudios, se buscó determinar el efecto global del EgAgB sobre las poblaciones celulares residentes e inflamatorias, se examinaron además algunos marcadores de activación en los monocitos y macrófagos, por ser centrales en el presente trabajo, y los niveles de algunas las principales citoquinas inflamatorias y anti-inflamatorias. Los experimentos utilizaron hembras de la cepa Balb/c, administradas con EgAgB nativo o rEgAgB8/1 en cavidad peritoneal, en ausencia o presencia de LPS (15 µg/ratón). Se eligió como modelo la cavidad peritoneal ya que este trabajo está centrado en el estudio de los efectos del EgAgB sobre los macrófagos y esta cavidad es un lugar anatómico ampliamente utilizado para el estudio de las poblaciones de células innatas, incluyendo a los macrófagos. De hecho, en estado basal dicha cavidad presenta mayormente linfocitos y macrófagos, aproximadamente en iguales cantidades. Para las preparaciones de EgAgB se escogió la dosis apuntando a mantener la relación más alta de µg EgAgB (proteína)/célula utilizada *in vitro* (~5 µg totales para 0.5x10⁶ macrófagos) y considerando además que en estado basal la cavidad peritoneal puede contener entre 2 y 4x10⁶ células, y que localmente la dosis podría será menor ya que es probable que una proporción del EgAgB inyectado difunda rápidamente pasando a la sangre (el peritoneo es un sitio ampliamente vascularizado). Por tanto, se inyectaron 50 µg de EgAgB nativo o rEgAgB8/1 por ratón. Las inyecciones de EgAgB y de LPS se realizaron en forma secuencial y en este orden, sin mezclar las preparaciones, para evitar interacciones previas entre los estímulos. Se utilizaron preparaciones de EgAgB con índices de actividad normalizada menores o iguales a 0.1 para IL-1 β y a 0.03 para IL-6, los cuales se tomaron como indicadores de concentraciones de LPS menores de 0.09 ng/mL según el ensayo LAL. Además, como estos indicadores también se verían aumentados por la presencia de otros PAMPs o DAMPs, se los consideró más adecuados para controlar las preparaciones a inyectar. Se analizaron las poblaciones presentes en la cavidad peritoneal y las citoquinas producidas a las 4 y 24 horas post-estimulación (p.e.). La evaluación de los efectos inducidos se realizó a las 4 y 24 horas luego de la administración de los estímulos, tiempos de la respuesta inmune innata aguda. Se eligió el tiempo de 4 horas p.e. apuntando a evaluar los efectos sobre las células residentes, antes de que adquiriera magnitud la eventual infiltración celular. En particular, a este tiempo es posible estudiar la población de macrófagos residentes, ya que la estimulación con LPS (u otros estímulos inflamatorios) induce una rápida migración hacia el omento que conduce a una disminución casi total de los macrófagos a tiempos más largos (18-24 horas⁴⁰⁹). Por otra parte, el

análisis a las 24 horas p.e., buscó evaluar los fenotipos adquiridos por las poblaciones residentes y reclutadas. Para la caracterización celular, se realizaron tres tinciones independientes que permitieron identificar las poblaciones presentes y los niveles de expresión de las moléculas de MHC-II y los receptores co-estimulatorios CD40 y CD86 por citometría de flujo (ver sección 2.10 por detalles de la metodología). Complementando este análisis, a ambos tiempos se analizaron en el lavado peritoneal los niveles de las citoquinas inflamatorias IL-1 β e IL-6, de la citoquina reguladora del perfil de la respuesta inmune IL-12p40 y de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 por ELISA de captura. La elección del tiempo final de 4 horas también aseguró poder evaluar los efectos de algunas citoquinas secretadas en la cavidad (al menos IL-6), que se conoce no se logran detectar a tiempos mayores (comunicación personal Cecilia Casaravilla, Cátedra de Inmunología). En función de la disponibilidad de EgAgB_{IP}/rEgAgB8/1_{S2} y de ratones se llevaron a cabo entre 2 y 3 experimentos independientes para cada preparación y cada tiempo.

5.4.2. Efectos a nivel de las citoquinas

Los resultados obtenidos mostraron que en concordancia con la experiencia previa del grupo, sólo fue posible detectar las citoquinas en el lavado peritoneal colectado a las 4 horas p.e.. A este tiempo se cuantificaron IL-6, IL-12p40 e IL-10 mientras que no se detectó IL-1β. Los niveles de IL-6 fueron ampliamente superiores que los de IL-12p40 e IL-10; éstos últimos arrojaron absorbancias medibles pero pequeñas por lo cual su determinación puede contar con mayor error. En la Figura 5.23 se presentan los resultados de los mediadores solubles, discriminando según se haya utilizado EgAgB nativo o rEgAgB8/1 en la estimulación. En comparación con el vehículo utilizado como control, ninguna de las preparaciones de EgAgB indujo per se la producción de IL-6, IL-12p40 o IL-10. En contraste, el LPS indujo un aumento en los niveles de IL-6 e IL-12p40. En el caso de la IL-10, se observó una tendencia al aumento luego de la administración de LPS, pero esta tendencia sólo alcanzó la significancia estadística en los experimentos donde se ensayó el rEgAgB8/1. Considerando los niveles de citoquinas promovidos por el LPS, la presencia de EgAgB nativo redujo la concentración de IL-6 (p 0.001, n=3) y mostró una tendencia a disminuir los niveles de IL-12p40 a nivel de la cavidad peritoneal. Por otra parte, el rEgAgB8/1 mostró efectos similares, ya que tendió a reducir la producción de IL-6 (p=0.1, n=2) e inhibió la de IL-12p40 (p=0.05, n=3). Finalmente, a nivel de la IL-10 los resultados sugirieron que la estimulación conjunta con LPS y EgAgB nativo provocó un aumento en comparación con la estimulación con cada uno de ellos por separado, potenciación que se observó como una tendencia en los ensavos con LPS y rEgAgB8/1. Por tanto, la administración del EgAgB afectó la respuesta de citoquinas inducida por LPS en la cavidad peritoneal de ratón, modulando los niveles de IL-6 y de IL-12p40. Los efectos observados a nivel de los mediadores solubles están en sintonía con la capacidad del EgAgB de interferir in vitro con la activación celular inducida por el LPS sobre monocitos/macrófagos. Adicionalmente se constató que el EqAgB potenció los niveles de IL-10 inducidos en respuesta al LPS, información que no había surgido de los ensayos in vitro por limitaciones en la detección de IL-10 en las condiciones del ensayo.



Figura 5.23. Efecto del EgAgB sobre la respuesta de citoquinas inducidas por LPS en la cavidad peritoneal de ratón. Se estimularon hembras Balb/c por vía intraperitoneal con EgAgB nativo/rEgAgB8/1 (50 µg/ratón) o PBS_{E-B-AbAm} (control de vehículo) en ausencia o presencia de LPS (15 µg/ratón). Las inyecciones de EgAgB y de LPS se realizaron en forma secuencial y en este orden sin mezclar las preparaciones. A las 4 horas p.e. se obtuvo una muestra de los mediadores solubles presentes en la cavidad realizando un lavado peritoneal con 1 mL de solución de lavado y se cuantificaron en el sobrenadante las citoquinas IL-6 e IL-12p40 y de IL-10 por ELISA de captura, siguiendo el diseño experimental que se describió en la sección 2.10. Los gráficos muestran los niveles de cada citoquina (según se indica para los ensayos) con EgAgB (paneles de la izquierda, correspondientes a 3 experimentos independientes con 5 individuos por lote) o con rEgAgB8/1 (paneles de la derecha, correspondientes a 2 experimentos independientes con 5 individuos por lote). Cada

punto en los gráficos representa un individuo y se indica la mediana por grupo correspondiente a cada experimento (línea horizontal fina y corta) y al conjunto de experimentos independientes (línea horizontal gruesa y larga). Se aplicó la prueba exacta no paramétrica de dos vías de Mack Skillings seguido de la prueba basada en el test T de Student, sobre la cual se realizó la corrección de Benjamini y Hochberg (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

5.4.3. Efectos a nivel de la composición celular del peritoneo

En relación a los efectos sobre la composición celular, primero se determinó el total de células viables colectadas de la cavidad peritoneal a las 4 y 24 horas p.e.. La viabilidad de las suspensiones obtenidas se ubicó entre 87% y 95%, y los valores se distribuyeron de forma azarosa entre los grupos experimentales. Por tanto, los estímulos a las dosis ensayadas no tuvieron efecto sobre la viabilidad celular. Como se puede observar en la Figura 5.24, en relación al grupo control, la estimulación con EgAgB tendió a aumentar el número de células totales a las 4 horas y esta tendencia alcanzó la significancia estadística sólo para rEgAgB8/1. Además, el aumento inducido por EgAgB8/1 se sostuvo hasta las 24 horas. En contraste, el LPS no indujo aumento sobre el total de células a ninguno de los tiempos analizados en relación al control, por el contrario, disminuyó el número a las 24 horas p.e.. Más aún, el total de células en los ratones administrados con LPS fue menor en comparación a los que recibieron EgAgB (nativo o recombinante) a ambos tiempos de análisis y la administración del LPS junto con las preparaciones de EgAgB interfirió con el aumento en el total de células inducido por el EgAgB nativo/rEgAgB8/1. Este resultado muestra nuevamente que existe una interferencia entre las señales inducidas por estas macromoléculas.

A continuación, y siguiendo la estrategia de selección que se describió en la sección 2.10.3, se caracterizó la composición celular de la cavidad peritoneal incluyendo algunos marcadores fenotípicos de activación celular como MHC-II, CD86 y CD40. Primero se analizaron las poblaciones residentes, que incluyen principalmente a los macrófagos y linfocitos B, y en menor proporción a las DCs.

Los macrófagos residentes de gran tamaño, llamados LPM, se identificaron como células CD19⁻ Ly6C⁻F4/80⁺⁺ (Figura 2.5) y mostraron expresión baja de MHC-II (similar o apenas superior al respectivo control FMO). En comparación con el control, la administración de LPS disminuyó el número total de LPMs a las 4 horas, siendo casi total su desaparición a las 24 horas p.e. (Figuras 5.25 y 5.26 A y E, respectivamente). La estimulación con el EgAgB, tanto nativo como recombinante, tendió a disminuir el número de LPMs a las 4 horas p.e. en relación al control y este efecto alcanzó la significancia estadística a las 24 horas p.e.. Sin embargo, la disminución de LPM generada por el EgAgB nativo fue más moderada y significativamente menor al LPS mientras que el rEgAgB8/1 se comportó de forma similar al LPS. Esta reducción en el total de los macrófagos en el peritoneo se asemeja a la provocada por otros estímulos inflamatorios y podría estar asociada, como ya se comentó, a la activación y migración de LPM al omento. En el caso del LPS, se comprobó un incremento en el nivel de expresión en superficie de las moléculas de MHC-II a las 4 y 24 horas p.e. (Figuras 5.25 y 5.26 B y F) y de las moléculas co-estimuladoras CD86 y CD40 (muy modesto) a las 24 horas p.e. en comparación con el control (Figuras 5.25 y 5.26 G y H, Figura S5.2). Al igual que ocurrió para el número, el análisis de los efectos del EgAgB sobre las moléculas de superficie de los LPMs mostró algunas similitudes con los registrados para el LPS, pero más modestas en magnitud. En particular, el EgAgB nativo provocó un aumento en MHC-II a las 4 horas p.e. (Figura 5.25 B) y de CD86 y CD40 a las 24 horas p.e. (Figura 5.25 G, H y Figura S5.2). De estos efectos, la estimulación con el rEgAgB8/1 reprodujo el aumento de MHC-II (que se mantuvo hasta las 24 horas) y de CD86 pero no de CD40. Más aún el rEgAgB8/1 mostró una modulación de los niveles de CD40 basales a las 4 horas (Figura 5.26 D). En cuanto a la modulación de la respuesta al LPS, la presencia del EgAgB nativo parece aumentar los niveles de CD86 a las 4 horas p.e. (Figura 5.25 C y Figura S5.3 A), pero reducir la expresión de MHC-II a las 24 horas (Figura 5.25 F y Figura S5.3 B). Cabe señalar que a las 24 horas de estimulación con rEgAgB8/1, LPS o LPS+EgAgB/rEgAgB8/1 la población de LPM que persistió en la cavidad fue pequeña por lo cual los datos pueden tener menor exactitud.



Figura 5.24. Efecto del EgAgB sobre el total de células viables de la cavidad peritoneal tras la estimulación en ausencia y presencia de LPS. Se estimularon hembras Balb/c por vía intraperitoneal con EgAgB nativo/rEgAgB8/1 (50 µg/ratón) o PBS_{E-B-AbAm} (control de vehículo) en ausencia o presencia de LPS (15 µg/ratón). Las inyecciones de EgAgB y de LPS se realizaron en forma secuencial y en este orden sin mezclar las preparaciones. A las 4 y 24 horas p.e. se recuperaron las células mediante lavado peritoneal y se calculó el número total en función de la concentración de la suspensión celular y el volumen de lavado obtenido, siguiendo el diseño experimental que se describió en la sección 2.10. Los gráficos muestran el número total de células para experimentos con EgAgB (paneles de la izquierda, correspondientes a 3 experimentos independientes con 5 individuos por lote) o con rEgAgB8/1 (paneles de la derecha, correspondientes a 2 experimentos independientes con 5 individuos por lote) a los dos tiempos finales. Cada punto en los gráficos representa un individuo y se indica la mediana por lote correspondiente a cada experimento (línea horizontal fina y corta) y al conjunto de experimentos independientes (línea horizontal gruesa y larga). Se aplicó la prueba exacta no paramétrica de dos vías de Mack Skillings seguido de la prueba basada en el test T de Student, sobre la cual se realizó la corrección de Benjamini y Hochberg (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

EgAgB nativo



2

Figura 5.25. Efectos in vivo de EgAgB sobre la población de LPM. Se estimularon hembras Balb/c por vía intraperitoneal con EgAgB (50 µg/ratón) o PBS_{E-B-AbAm} (control de vehículo) en ausencia o presencia de LPS (15 µq/ratón). Las inyecciones de EqAgB y de LPS se realizaron en forma secuencial y en este orden sin mezclar las preparaciones. A las 4 y 24 horas p.e. se recuperaron las células mediante lavado peritoneal y se marcaron con anticuerpos específicos conjugados a fluorocromos para su análisis por citometría de flujo, siguiendo el diseño experimental que se describió en la sección 2.10. Utilizando el programa FlowJo se definieron los LPM como aquellas células CD19⁻Ly6C⁻F4/80⁺⁺ y se determinó sobre esta población el nivel de expresión de las moléculas MHC-II, CD86 y CD40. Los gráficos muestran el número total de LPM (A y E) y los niveles de expresión de MHC-II (B y F), CD86 (C y G) y CD40 (D y H) determinados como la media geométrica de la IF normalizada por el nivel del lote control, a las 4 (A-D) y 24 (E-H) horas p.e.. Cada punto del gráfico representa un individuo y se indica la mediana por lote correspondiente a cada experimento (línea horizontal fina y corta) y al conjunto de experimentos independientes (línea horizontal gruesa y larga). La IF del control FMO se representa con una línea punteada. Los gráficos corresponden a dos experimentos independientes para 4 horas y a tres experimentos independientes para 24 horas, con 5 individuos por lote. Se aplicó la prueba exacta no paramétrica de dos vías de Mack Skillings seguido de la prueba basada en el test T de Student, sobre la cual se realizó la corrección de Benjamini y Hochberg (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

rEgAgB8/1

№ exp.





N° exp.

0.5

0.0

r

 \sim

Ś 1

rE9A9BB/1

∿่า

LPS* TEARABE 1

Ŷ r







Macrófagos F4/80⁺⁺MHC-II^{-/+} **m**

G

Expresión de CD86 (normalizada)

LPM (x10⁶)

3

2

1

0

2.5-

2.0-

1.5

1.0-

0.5-

0.0

 $\hat{}$ ν

5

52

ŝ

LESABBEIT

1EgAgB8/1

ŀ

Figura 5.26. Efectos in vivo de rEgAgB8/1 sobre la población de LPM. Se estimularon hembras Balb/c por vía intraperitoneal con rEqAgB8/1 (50 µg/ratón) o PBS_{E-B-AbAm} (control de vehículo) en ausencia o presencia de LPS (15 µg/ratón). Las inyecciones de EgAgB y de LPS se realizaron en forma secuencial y en este orden sin mezclar las preparaciones. A las 4 y 24 horas p.e. se recuperaron las células mediante lavado peritoneal y se marcaron con anticuerpos específicos conjugados a fluorocromos para su análisis por citometría de flujo, siguiendo el diseño experimental que se describió en la sección 2.10. Utilizando el programa FlowJo se definieron los LPM como aquellas células CD19⁻Ly6C⁻F4/80⁺⁺ y se determinó sobre esta población el nivel de expresión de las moléculas MHC-II, CD86 y CD40. Los gráficos muestran el número total de LPM (A y E) y los niveles de expresión de MHC-II (B y F), CD86 (C y G) y CD40 (D y H) determinados como la media geométrica de la IF normalizada por el nivel del lote control, a las 4 (A-D) y 24 (E-H) horas p.e.. Cada punto del gráfico representa un individuo y se indica la mediana por lote correspondiente a cada experimento (línea horizontal fina y corta) y al conjunto de experimentos independientes (línea horizontal gruesa y larga). La IF del control FMO se representa con una línea punteada. Los gráficos corresponden a dos experimentos independientes con 5 individuos por lote. Se aplicó la prueba exacta no paramétrica de dos vías de Mack Skillings seguido de la prueba basada en el test T de Student, sobre la cual se realizó la corrección de Benjamini y Hochberg (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

Como ya se mencionó, en el peritoneo de los ratones reside además una población minoritaria de macrófagos de tamaño pequeño, llamados SPM, que se identificaron como células CD19⁻Ly6C⁻ F4/80^{-/+}MHC-II⁺⁺ (Figura 2.5 F). Tal como se explicó en 2.10.3.1, los eosinófilos, que pudieran haberse reclutado como consecuencia de la estimulación y que expresan niveles bajos de F4/80, se eliminaron de la población CD19⁻Ly6C⁻F4/80^{-/+} (EOS-) en base al menor tamaño y mayor granularidad/complejidad celular que los monocitos, identificándolos en un gráfico FSC vs. SSC (Figura 2.5 E). Se observó que la administración del LPS provocó un descenso en el número de SPM a las 24 horas y que el EgAgB nativo, pero no el rEgAgB8/1, indujo un descenso similar. En este caso la co-administración del LPS y el EgAgB, tanto nativo como recombinante, no alteró la desaparición de esta población inducida por el LPS. Por otra parte, a nivel del fenotipo celular, la estimulación con LPS no provocó cambios en la expresión de MHC-II a las 4 horas pero disminuyó los niveles a las 24 horas p.e.. Este efecto no fue modificado por la presencia del EgAgB; más aún, el EgAgB nativo y el rEgAgB8/1 provocaron una disminución similar (Figuras 5.27 y 5.28 A, B, E y F). Respecto a las moléculas co-estimuladoras, la presencia de LPS en la cavidad peritoneal condujo a un aumento en la expresión de las moléculas CD86 y CD40 sobre la superficie de los SPM a las 4 y 24 horas p.e., que fue de mayor magnitud que para los LPM; observar por ejemplo que a las 24 horas fue de aproximadamente 3 y 1.5 veces para CD86 en SPM y LPM, respectivamente (la respuesta diferencial está de acuerdo con lo reportado por²⁵⁵ donde los SPM presentan un perfil pro-inflamatorio y los LPM parecen tener un papel en el mantenimiento de homeostasis). Estos efectos se contrarrestaron levemente por la presencia del EgAgB nativo (Figura 5.27 C, D, G y H y Figura S5.4 y Figura S5.5 para 4 y 24 horas, respectivamente). En este caso el rEgAgB8/1 moduló la expresión de CD86, pero no de CD40, inducida por LPS a las 4 horas p.e. (Figura 5.28 C y D y Figura S5.6 A y B, respectivamente). En relación al efecto mediado por las preparaciones de EgAgB per se, el EgAgB nativo indujo la expresión de CD86 y CD40, a las 4 y 24 horas p.e., respectivamente (Figura 5.27 C y H), mientras que rEgAgB8/1 indujo la expresión de ambas moléculas a los dos tiempos (Figura 5.28 C, D, G y H y Figura 55.6 y S5.7), siendo todos los valores inferiores a los promovidos por el LPS (salvo para la expresión de CD40 inducida por rEgAgB8/1 que alcanzó valores similares a los del LPS a las 24 horas p.e., Figura 5.28 H y Figura 55.7).





Figura 5.27. Efectos *in vivo* de EgAgB sobre la población de SPM. Análisis de los cambios en el número y la expresión de marcadores de superficie en los SPM (identificados como células CD19⁻F4/80^{-/+}Ly6C⁻MHC-II⁺⁺) provenientes de ratones Balb/c estimulados con EgAgB en presencia o ausencia de LPS, siguiendo el diseño experimental que se describió en la sección 2.10. Los gráficos muestran el número total de SPM (A y E) y los niveles de expresión de MHC-II (B y F), CD86 (C y G) y CD40 (D y H) determinados como la media geométrica de la IF normalizada por el nivel del lote control, a las 4 (A-D) y 24 (E-H) horas p.e.. Cada punto del gráfico representa un individuo y se indica la mediana por lote correspondiente a cada experimento (línea horizontal fina y corta) y al conjunto de experimentos independientes (línea horizontal gruesa y larga). La IF del control FMO se representa con una línea punteada. Los gráficos corresponden a dos experimentos independientes para 4 horas y a tres experimentos independientes para 24 horas, con 5 individuos por lote. Se aplicó la prueba exacta no paramétrica de dos vías de Mack Skillings seguido de la prueba basada en el test T de Student, sobre la cual se realizó la corrección de Benjamini y Hochberg (* p < 0.05, *** p < 0.001).

rEgAgB8/1



78

Figura 5.28. Efectos *in vivo* de rEgAgB8/1 sobre la población de SPM. Análisis de los cambios en el número y la expresión de marcadores de superficie en los SPM (identificados como células CD19⁺F4/80^{-/+}Ly6C⁻MHC-II⁺⁺) provenientes de ratones Balb/c estimulados con rEgAgB8/1 en presencia o ausencia de LPS, siguiendo el diseño experimental que se describió en la sección 2.10. Los gráficos muestran el número total de SPM (A y E) y los niveles de expresión de MHC-II (B y F), CD86 (C y G) y CD40 (D y H) determinados como la media geométrica de la IF normalizada por el nivel del lote control, a las 4 (A-D) y 24 (E-H) horas p.e.. Cada punto del gráfico representa un individuo y se indica la mediana por lote correspondiente a cada experimento (línea horizontal fina y corta) y al conjunto de experimentos independientes (línea horizontal gruesa y larga). La IF del control FMO se representa con una línea punteada. Los gráficos corresponden a dos experimentos independientes con 5 individuos por lote. Se aplicó la prueba exacta no paramétrica de dos vías de Mack Skillings seguido de la prueba basada en el test T de Student, sobre la cual se realizó la corrección de Benjamini y Hochberg (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

Otra población mayoritaria de la cavidad peritoneal son los linfocitos B, que se identificaron como células F4/80⁻CD19⁺. Se ha descripto que los linfocitos B constituyen alrededor del 50% de las células residentes y en el grupo control de nuestros experimentos constituyeron entre el 44 y el 57%. Por comparación con el control se observó que la estimulación con el EgAgB (nativo o recombinante), LPS o la combinación de ambos no provocó cambios en el número de linfocitos B peritoneales a las 4 horas p.e., pero a las 24 horas p.e. el LPS indujo una disminución que no fue revertida por la presencia de EgAgB nativo o rEgAgB8/1 (Figuras 5.29 D y 5.30 D, respectivamente). En este caso, la disminución de linfocitos de la cavidad peritoneal no fue tan notoria (~30% de reducción) como la de los macrófagos (~90% de reducción). Como se ha reportado que el marcador fenotípico utilizando para identificar a los linfocitos B, CD19, podría disminuir durante su activación/diferenciación^{410,411}) examinamos si su expresión se afectó en las diferentes condiciones de estimulación, observando una leve disminución en el caso del LPS a las 24 horas p.e. (Figura S5.8 A). Por otra parte, la reducción inducida por el LPS en el número de los linfocitos B coincidió con un aumento en los niveles de CD86 a las 4 horas p.e. y de MHC-II y CD86 a las 24 horas p.e.. Estos resultados plantean la posibilidad de que la reducción en el número de linfocitos B F4/80⁻ CD19⁺sea producto de su activación y no de su migración hacia otros tejidos. A diferencia del LPS y en concordancia con la ausencia de efecto sobre el número de células F4/80⁻CD19⁺, ni el EgAgB nativo o el rEgAgB8/1 aumentaron los niveles de MHC-II y CD86 a las 24 horas p.e., aunque se observó que produjeron algunas alteraciones; ambos indujeron per se la expresión de CD86 a las 4 horas y sólo el rEgAgB8/1 indujo la expresión de MHC-II a las 24 horas p.e. (menor a la inducida por el LPS, Figura 5.30 E). Por otra parte, la presencia del EgAgB no moduló los aumentos inducidos por el LPS en la expresión de estas moléculas, aunque el EgAgB nativo tendió a revertirlos (Figura 5.29 E y F).

En el panel de tinción que permitió el estudio de los linfocitos B se incluyó la marca para CD11b y CD5, que permitiera discriminar las subpoblaciones B1 (F4/80⁻CD19⁺CD11b⁺) y B1a (F4/80⁻CD19⁺CD11b⁺CD5⁺). Resultó interesante el análisis, particularmente de la población de linfocitos B1a, ya que es capaz de reconocer específicamente a la fosfatidilcolina y es responsable de la producción de anticuerpos naturales IgM con función neutralizante para este componente y protección contra las infecciones bacterianas⁴¹². En las condiciones experimentales analizadas, la subpoblación B1a fue muy minoritaria dentro del total de los linfocitos B (alcanzando sólo entre un 0.5 y un 3%), lo que impidió avanzar en la descripción de sus marcadores de superficie ya que representó un número total de células muy bajo para un análisis comparativo confiable. En cuanto a la subpoblación B1, el análisis del número de células y los niveles de expresión de MHC-II, CD86 y

CD40 no difirió del presentado para la población total de linfocitos B (ver ejemplo para EgAgB nativo y 24 horas p.e. en Figura S5.8 B). Esto sugiere que esta subpoblación respondería de forma similar respecto a la totalidad de los linfocitos B.


Figura 5.29. Efectos *in vivo* de EgAgB sobre la población de linfocitos B peritoneales. Análisis de los cambios en el número y la expresión de marcadores de superficie de linfocitos B peritoneales (identificados como células CD19⁺ F4/80⁻) provenientes de ratones Balb/c estimulados con EgAgB en presencia o ausencia de LPS, siguiendo el diseño experimental que se describió en la sección 2.10. Los gráficos muestran el número total de linfocitos B (A y D) y los niveles de expresión de MHC-II (B y E) y CD86 (C y F), determinados como la media geométrica de la IF normalizada por el nivel del lote control, a las 4 (A-C) y 24 (D-F) horas p.e.. Cada punto del gráfico representa un individuo y se indica la mediana por lote correspondiente a cada experimento (línea horizontal fina y corta) y al conjunto de experimentos independientes (línea horizontal gruesa y larga). La IF del control FMO se representa con una línea punteada. Los gráficos corresponden a dos experimentos independientes para 4 horas y a tres experimentos independientes para 24 horas, con 5 individuos por lote. Se aplicó la prueba exacta no paramétrica de dos vías de Mack Skillings seguido de la prueba basada en el test T de Student, sobre la cual se realizó la corrección de Benjamini y Hochberg (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).



Figura 5.30. Efectos *in vivo* de rEgAgB8/1 sobre la población de linfocitos B peritoneales. Análisis de los cambios en el número y la expresión de marcadores de superficie de linfocitos B peritoneales (identificados como células CD19⁺ F4/80⁻) provenientes de ratones Balb/c estimulados con rEgAgB8/1 en presencia o ausencia de LPS, siguiendo el diseño experimental que se describió en la sección 2.10. Los gráficos muestran el número total de linfocitos B (A y D) y los niveles de expresión de MHC-II (B y E) y CD86 (C y F), determinados como la media geométrica de la IF normalizada por el nivel del lote control, a las 4 (A-C) y 24 (D-F) horas p.e.. Cada punto del gráfico representa un individuo y se indica la mediana por lote correspondiente a cada experimento (línea horizontal fina y corta) y al conjunto de experimentos independientes (línea horizontal gruesa y larga). La IF del control FMO se representa con una línea punteada. Los gráficos corresponden a dos experimentos independientes para 4 horas y a tres experimentos independientes para 24 horas, con 5 individuos por lote. Se aplicó la prueba exacta no paramétrica de dos vías de Mack Skillings seguido de la prueba basada en el test T de Student, sobre la cual se realizó la corrección de Benjamini y Hochberg (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

Finalmente, las **DCs** (identificadas como células CD11c⁺⁺MHC-II⁺⁺) constituyen otra población residente en el peritoneo sobre la cual se evaluaron los efectos del EgAgB en presencia o ausencia del LPS. Si bien constituyen una población minoritaria en la cavidad peritoneal de los ratones, se acepta que son células clave en la comunicación a los ganglios de los mensajes de alerta que llegan a los tejidos, influenciando el encendido y orquestado de respuestas adaptadas para combatir las agresiones. De acuerdo con lo esperado, en el grupo control de nuestros experimentos constituyeron sólo entre el 0.1 y 0.24 %. En cuanto al análisis de su fenotipo, se determinó el nivel de expresión de las moléculas de superficie MHC-II y CD86 porque lamentablemente, no se contó con anticuerpos que permitieran incluir el marcado para CD40 dentro del panel de tinción. Como se puede observar en las Figuras 5.31 y 5.32, el número de DCs no se vio afectado a las 4 horas p.e. bajo ningún estímulo. Sin embargo, a las 24 horas p.e. la presencia tanto del EgAgB (nativo o su forma recombinante) como del LPS condujo a una disminución de las DCs en comparación con el control; esta disminución fue de menor magnitud para el EgAgB que para el LPS (\sim 35% y \sim 60% de reducción, respectivamente). Por otra parte, la disminución en el total de DCs provocada por el LPS coincidió con aumento en los niveles de expresión de CD86 a las 4 horas p.e. (Figuras 5.31 y 5.32 C) y de MHC-II y CD86 a las 24 horas p.e. (Figuras 5.31 y 5.32 E y F), sugiriendo que estas células se activaron y migraron a tejidos linfoides secundarios incluyendo al omento. Asimismo, la disminución del número de DCs provocada por el EqAgB/rEqAgB8/1 coincidió con una mayor expresión de CD86 a las 4 y 24 horas p.e. (Figuras 5.31 y 5.32 C y F, respectivamente), que fue de menor magnitud que la inducida por el LPS. Si bien la co-estimulación con LPS y EgAgB o rEgAgB8/1 no revirtió el descenso en el total de DCs presentes en el peritoneo, resultó interesante que el EgAgB moduló levemente la expresión de CD86 inducida por LPS (Figura 5.31 F y Figura S5.9), en forma similar a lo observado sobre las SPM. Sin embargo, nuevamente este efecto no fue reproducido por rEgAgB8/1 (Figura 5.32 F).





Figura 5.31. Efectos *in vivo* de EgAgB sobre la población de DCs. Análisis de los cambios en el número y la expresión de marcadores de superficie de las DCs peritoneales (identificadas como células CD11c⁺⁺MHC-II⁺⁺) provenientes de ratones Balb/c estimulados con EgAgB en presencia o ausencia de LPS siguiendo el diseño experimental que se describió en la sección 2.10. Los gráficos muestran el número total de células dendríticas (A y D) y los niveles de expresión de MHC-II (B y E) y CD86 (C y F), determinados como la media geométrica de la IF normalizada por el nivel del lote control, a las 4 (A-C) y 24 (D-F) horas p.e.. Cada punto del gráfico representa un individuo y se indica la mediana por lote correspondiente a cada experimento (línea horizontal fina y corta) y al conjunto de experimentos independientes (línea horizontal gruesa y larga). La IF del control FMO se representa con una línea punteada. Los gráficos corresponden a dos experimentos independientes para 4 horas y a tres experimentos independientes para 24 horas, con 5 individuos por lote. Se aplicó la prueba exacta no paramétrica de dos vías de Mack Skillings seguido de la prueba basada en el test T de Student, sobre la cual se realizó la corrección de Benjamini y Hochberg (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).





Figura 5.32. Efectos *in vivo* de rEgAgB8/1 sobre la población de DCs. Análisis de los cambios en el número y la expresión de marcadores de superficie de las DCs peritoneales (identificadas como células CD11c⁺⁺MHC-II⁺⁺)provenientes de ratones Balb/c estimulados con rEgAgB8/1 en presencia o ausencia de LPS, siguiendo el diseño experimental que se describió en la sección 2.10. Los gráficos muestranel número total de DCs (A y D) y los niveles de expresión de MHC-II (B y E) y CD86 (C y F), determinados como la media geométrica de la IF normalizada por el nivel del lote control, a las 4 (A-C) y 24 (D-F) horas p.e.. Cada punto del gráfico representa un individuo y se indica la mediana por lote correspondiente a cada experimento (línea horizontal fina y corta) y al conjunto de experimentos independientes (línea horizontal gruesa y larga). La IF del control FMO se representa con una línea punteada. Los gráficos corresponden a dos experimentos independientes para 4 horas y a tres experimentos independientes para 24 horas, con 5 individuos por lote. Se aplicó la prueba exacta no paramétrica de dos vías de Mack Skillings seguido de la prueba basada en el test T de Student, sobre la cual se realizó la corrección de Benjamini y Hochberg (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

Con respecto a las células reclutadas a la cavidad peritoneal como consecuencia de la administración de los estímulos, en primer lugar se analizaron las poblaciones derivadas de monocitos, agrupadas dentro de las células CD19⁻F4/80⁻ que no son eosinófilos (eliminados en función de su morfología, que se distingue como eventos con FSC bajo y SSC alto, ver Figura 2.5 E). Dentro de las células derivadas de monocitos inflamatorios se distinguieron 3 poblaciones, en base a la expresión de los marcadores Ly6C, MHC-II y F4/80 (para simplificar su denominación todas se nombran como monocitos/poblaciones y sus características en cuanto a la expresión de dichos marcadores)

Los monocitos recientemente reclutados se caracterizan por una alta expresión de Ly6C en su superficie y por la ausencia de MHC-II. Los resultados obtenidos para los monocitos Ly6C⁺⁺MHC-II⁻ se muestran en las Figuras 5.33 para experimentos con EgAgB nativo y 5.34 para experimentos con rEgAgB8/1. En primer lugar, como era esperable se observó un bajo número de monocitos presentes en el control. A diferencia del LPS, el EgAgB nativo y rEgAgB8/1 indujeron aumento de esta población a las 4 horas p.e. en comparación con el control (Figuras 5.33 A y 5.34 A). Sin embargo, en presencia de LPS este aumento se vio anulado, lo cual sugiere una interferencia del LPS con las interacciones que establece el EgAgB y que promueven este reclutamiento de monocitos. Además, este reclutamiento inducido por el EgAgB, tanto nativo como recombinante, se sostuvo a las 24 horas p.e.. Resultó interesante que los monocitos reclutados por el EgAgB no mostraron niveles de MHC-II o de CD86 y CD40 significativamente mayores que los observados en el control, aunque se observaron tendencias al aumento de las mencionadas moléculas coestimuladoras que no alcanzaron la significancia estadística (principalmente a las 4 horas para el EqAgB nativo Figura 5.33, y sólo para el CD86 en el caso del rEgAgB8/1, Figura 5.34). En contraste, la estimulación con el LPS provocó un reclutamiento más lento de monocitos, que se hizo evidente recién a las 24 horas p.e. y, en este caso, coincidió con aumentos en la expresión de CD40 a las 4 horas y de MHC-II y CD86 a las 24 horas p.e. en comparación con el control. Además la expresión de MHC-II y CD86 a las 24hs fue mayor en los monocitos reclutados por el LPS que en lo reclutados por el EgAgB. Por otro lado, la co-estimulación con EgAgB mostró efectos contrastantes sobre la respuesta inducida por el LPS: mientras que a las 4 horas tendió a aumentar los niveles de MHC-II y coestimuladores inducidos por dicho agonista, a las 24 horas este efecto potenciador desapareció. Además, se observó una modesta modulación del EgAgB nativo sobre el aumento inducido por el LPS a las 24 horas en la expresión de MHC-II (Figura 5.33 F y Figura S5.10 A) y de CD86 (próxima a la significancia estadística, p=0.08, Figura 5.33 G). Sin embargo, estos efectos moduladores no se reprodujeron cuando se utilizó el rEgAgB8/1 (Figura 5.34 F y G).

EgAgB nativo



....

Figura 5.33. Efectos *in vivo* de EgAgB sobre la población de monocitos inflamatorios Ly6C⁺⁺MHC-II⁻. Análisis de los cambios en el número y la expresión de marcadores de superficie en los monocitos Ly6C⁺⁺MHC-II⁻ reclutados en el peritoneo de ratones Balb/c estimulados con EgAgB en presencia o ausencia de LPS, siguiendo el diseño experimental que se describió en la sección 2.10. Los gráficos muestran el número total de monocitos Ly6C⁺⁺MHC-II⁻ (A y E) y los niveles de expresión de MHC-II (B y F), CD86 (C y G) y CD40 (D y H) determinados como la media geométrica de la IF normalizada por el nivel del lote control, a las 4 (A-D) y 24 (E-H) horas p.e.. Cada punto del gráfico representa un individuo y se indica la mediana por lote correspondiente a cada experimento (línea horizontal fina y corta) y al conjunto de experimentos independientes (línea horizontal gruesa y larga). La IF del control FMO se representa con una línea punteada. Los gráficos corresponden a dos experimentos independientes para 4 horas y a tres experimentos independientes para 24 horas, con 5 individuos por lote. Se aplicó la prueba exacta no paramétrica de dos vías de Mack Skillings seguido de la prueba basada en el test T de Student, sobre la cual se realizó la corrección de Benjamini y Hochberg (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001). rEgAgB8/1



191

Figura 5.34. Efectos *in vivo* de rEgAgB8/1 sobre la población de monocitos inflamatorios Ly6C⁺⁺MHC-II⁻. Análisis de los cambios en el número y la expresión de marcadores de superficie en los monocitos Ly6C⁺⁺MHC-II⁻ reclutados en el peritoneo de ratones Balb/c estimulados con rEgAgB8/1 en presencia o ausencia de LPS, siguiendo el diseño experimental que se describió en la sección 2.10. Los gráficos muestranel número total de monocitos Ly6C⁺⁺MHC-II⁻ (A y E) y los niveles de expresión de MHC-II (B y F), CD86 (C y G) y CD40 (D y H) determinados como la media geométrica de la IF normalizada por el nivel del lote control, a las 4 (A-D) y 24 (E-H) horas p.e.. Cada punto del gráfico representa un individuo y se indica la mediana por lote correspondiente a cada experimento (línea horizontal fina y corta) y al conjunto de experimentos independientes (línea horizontal gruesa y larga). La IF del control FMO se representa con una línea punteada. Los gráficos corresponden a dos experimentos independientes para 4 horas y a tres experimentos independientes para 24 horas, con 5 individuos por lote. Se aplicó la prueba exacta no paramétrica de dos vías de Mack Skillings seguido de la prueba basada en el test T de Student, sobre la cual se realizó la corrección de Benjamini y Hochberg (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

Por otra parte, se conoce que los monocitos reclutados reciben estímulos del ambiente inflamatorio del peritoneo lo cual conduce a su diferenciación a macrófagos, perdiendo la expresión de Ly6C y ganando la expresión de MHC-II y F4/80 en superficie. Por tanto, sobre las células CD19⁻F4/80^{+/-} libres de eosinófilos, se identificaron otras **dos poblaciones inflamatorias derivadas de monocitos reclutados en vías de diferenciación, con fenotipo Ly6C⁺MHC-II⁺ o Ly6C⁻MHC-II⁺ (Figura 2.5). Nuevamente, los niveles de ambas poblaciones fueron muy bajos en los ratones control.**

Al igual que lo observado para los monocitos Ly6C⁺⁺MHC-II⁻, la estimulación con el EgAgB, tanto nativo como recombinante, provocó un incremento temprano (4 horas p.e.) en la población Ly6C⁺MHC-II⁺ (Figuras 5.35 A y 5.36 A). La misma también se observó aumentada luego de 24 horas p.e. con el rEgAgB8/1, pero no con el EgAgB nativo (Figuras 5.36 E y 5.35 E, respectivamente). En los casos de aumento inducido por el EgAgB, la co-estimulación con el LPS inhibió esta respuesta, subrayando la interferencia en las señales que desencadenan el EgAgB y el LPS (Figuras 5.35 A y 5.36 A y E). Además los monocitos Ly6C⁺MHC-II⁺ reclutados por la estimulación con el EgAgB nativo no mostraron niveles aumentados de las moléculas coestimuladoras CD86 y CD40, y exhibió a las 24 horas niveles menores de MHC-II que el grupo control. En el caso del rEgAgB8/1, hubo aumento en la expresión de CD86 en estas células, sin evidencias de interferencia por la co-estimulación con LPS. Por otra parte, la administración de LPS condujo a un modesto aumento en el número de células Ly $6C^+MHC-II^+$ a las 24 horas p.e. (Figuras 5.35 A y 5.36 A). Sobre las mismas se detectaron niveles de MHC-II menores que los controles (tanto a las 4 como 24 horas p.e.), y aumento en CD86 sólo a las 4 horas p.e., pero no en CD40 respecto al control. La co-estimulación con LPS y EgAgB no modificó los niveles de MHC-II o CD86 regulados negativa o positivamente por el LPS.

EgAgB nativo



Figura 5.35. Efectos *in vivo* de EgAgB sobre la población Ly6C⁺MHC-II⁺ derivada de monocitos inflamatorios. Análisis de los cambios en el número y la expresión de marcadores de superficie en la población Ly6C⁺MHC-II⁺ reclutada en el peritoneo de ratones Balb/c estimulados con EgAgB en presencia o ausencia de LPS, siguiendo el diseño experimental que se describió en la sección 2.10. Los gráficos muestran el número total de monocitos Ly6C⁺MHC-II⁺ (A y E) y los niveles de expresión de MHC-II (B y F), CD86 (C y G) y CD40 (D y H) determinados como la media geométrica de la IF normalizada por el nivel del lote control, a las 4 (A-D) y 24 (E-H) horas p.e.. Cada punto del gráfico representa un individuo y se indica la mediana por lote correspondiente a cada experimento (línea horizontal fina y corta) y al conjunto de experimentos independientes (línea horizontal gruesa y larga). La IF del control FMO se representa con una línea punteada. Los gráficos corresponden a dos experimentos independientes para 4 horas y a tres experimentos independientes para 24 horas, con 5 individuos por lote. Se aplicó la prueba exacta no paramétrica de dos vías de Mack Skillings seguido de la prueba basada en el test T de Student, sobre la cual se realizó la corrección de Benjamini y Hochberg (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

rEgAgB8/1



Figura 5.36. Efectos *in vivo* de rEgAgB8/1 sobre la población Ly6C⁺MHC-II⁺ derivada de monocitos inflamatorios. Análisis de los cambios en el número y la expresión de marcadores de superficie en la población Ly6C⁺MHC-II⁺ reclutada en el peritoneo de ratones Balb/c estimulados con rEgAgB8/1 en presencia o ausencia de LPS., siguiendo el diseño experimental que se describió en la sección 2.10. Los gráficos muestranel número total de monocitos Ly6C⁺MHC-II⁺ (A y E) y los niveles de expresión de MHC-II (B y F), CD86 (C y G) y CD40 (D y H) determinados como la media geométrica de la IF normalizada por el nivel del lote control, a las 4 (A-D) y 24 (E-H) horas p.e.. Cada punto del gráfico representa un individuo y se indica la mediana por lote correspondiente a cada experimento (línea horizontal fina y corta) y al conjunto de experimentos independientes (línea horizontal gruesa y larga). La IF del control FMO se representa con una línea punteada. Los gráficos corresponden a dos experimentos independientes para 4 horas y a tres experimentos independientes para 24 horas, con 5 individuos por lote. Se aplicó la prueba exacta no paramétrica de dos vías de Mack Skillings seguido de la prueba basada en el test T de Student, sobre la cual se realizó la corrección de Benjamini y Hochberg (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

Finalmente, respecto a los monocitos Ly6C⁻MHC-II⁺, no se observó alteración en su número como consecuencia de la administración del EgAgB (tanto nativo como recombinante), el LPS o ambos estímulos, a ninguno de los tiempos analizados. Eventualmente, parecería que la estimulación con las preparaciones de EgAgB tendió a aumentar el número a las 24 horas p.e. en relación al control (Figuras 5.37 E y 5.38 E). Esto podría reflejar la evolución de la diferenciación de los monocitos LyC6⁺⁺MHC-II⁻ que el EgAgB reclutó a las 4 horas p.e.. En concordancia con esta posibilidad, los ratones administrados con LPS exhibieron un reclutamiento más tardío de monocitos LyC6⁺⁺MHC-Il⁻ y no mostraron tendencia al aumento de la población Ly6C⁻MHC-II⁺. En forma similar a lo observado para la población Ly6C⁺MHC-II⁺, hubo un descenso moderado en los niveles de expresión de MHC-II asociado a la administración de LPS, sólo o junto con EgAgB nativo, a las 4 horas p.e.. Este efecto se observó también a las 24 horas p.e. para el EgAgB nativo, LPS o la combinación de estímulos. En contraste, el rEgAgB8/1 promovió un descenso de MHC-II sólo a las 4 horas p.e. (Figura 5.38 B). Por otra parte, a nivel de las moléculas co-estimuladoras se observó que el LPS indujo aumento de la expresión de CD86 a las 4 y 24 horas. No hubo inducción de CD86 en estas células como consecuencia de la administración del EgAgB nativo o rEgAgB8/1 a ninguno de los tiempos analizados (Figuras 5.37 C, G y 5.38 C, G). No obstante, la co-estimulación con el EgAgB (nativo o recombinante) y el LPS indujo niveles de CD86 mayores que los presentes en estas células estimuladas sólo con el LPS o el EgAgB a las 4 horas p.e. (Figuras 5.37 C y 5.38 C). Para CD40 se registró expresión aumentada frente a la estimulación con LPS sólo a las 4 horas p.e. (Figuras 5.37 D y H), que fue de similar magnitud a la inducida por el EgAgB nativo y por la combinación de estímulos. Nuevamente, el rEgAgB8/1 mostró leves diferencias respecto al EgAgB nativo ya que tendió a aumentar los niveles de expresión de CD86 y CD40 respecto al control a las 4 horas p.e (no alcanzó significancia estadística, Figuras 5.38 C y D). Sin embargo, a este tiempo, también, potenció la expresión de CD86 inducida por el LPS (Figura 5.38 C).

EgAgB nativo



197

Figura 5.37. Efectos *in vivo* de EgAgB sobre la población Ly6C⁻MHC-II⁺ derivada de monocitos inflamatorios. Análisis de los cambios en el número y la expresión de marcadores de superficie en la población Ly6C⁻MHC-II⁺ reclutada en el peritoneo de ratones Balb/c estimulados con EgAgB en presencia o ausencia de LPS, siguiendo el diseño experimental que se describió en la sección 2.10. Los gráficos muestran el número total de monocitos Ly6C⁻MHC-II⁺ (A y E) y los niveles de expresión de MHC-II (B y F), CD86 (C y G) y CD40 (D y H) determinados como la media geométrica de la IF normalizada por el nivel del lote control, a las 4 (A-D) y 24 (E-H) horas p.e.. Cada punto del gráfico representa un individuo y se indica la mediana por lote correspondiente a cada experimento (línea horizontal fina y corta) y al conjunto de experimentos independientes (línea horizontal gruesa y larga). La IF del control FMO se representa con una línea punteada. Los gráficos corresponden a dos experimentos independientes para 4 horas y a tres experimentos independientes para 24 horas, con 5 individuos por lote. Se aplicó la prueba exacta no paramétrica de dos vías de Mack Skillings seguido de la prueba basada en el test T de Student, sobre la cual se realizó la corrección de Benjamini y Hochberg (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

rEgAgB8/1



199

Figura 5.38. Efectos *in vivo* de rEgAgB8/1 sobre la población Ly6C⁻MHC-II⁺ derivada de monocitos inflamatorios. Análisis de los cambios en el número y la expresión de marcadores de superficie en la población Ly6C⁻MHC-II⁺ reclutada en el peritoneo de ratones Balb/c estimulados con rEgAgB8/1 en presencia o ausencia de LPS, siguiendo el diseño experimental que se describió en la sección 2.10. Los gráficos muestran el número total de monocitos Ly6C⁻MHC-II⁺ (A y E) y los niveles de expresión de MHC-II (B y F), CD86 (C y G) y CD40 (D y H) determinados como la media geométrica de la IF normalizada por el nivel del lote control, a las 4 (A-D) y 24 (E-H) horas p.e.. Cada punto del gráfico representa un individuo y se indica la mediana por lote correspondiente a cada experimento (línea horizontal fina y corta) y al conjunto de experimentos independientes (línea horizontal gruesa y larga). La IF del control FMO se representa con una línea punteada. Los gráficos corresponden a dos experimentos independientes para 4 horas y a tres experimentos independientes para 24 horas, con 5 individuos por lote. Se aplicó la prueba exacta no paramétrica de dos vías de Mack Skillings seguido de la prueba basada en el test T de Student, sobre la cual se realizó la corrección de Benjamini y Hochberg (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

Finalmente se evaluaron los efectos *in vivo* sobre **las poblaciones de granulocitos**, neutrófilos y eosinófilos, células CD19⁻F4/80⁻CD11c⁻MHCII⁻ identificadas como SiglecF⁻Gr-1⁺⁺ y Gr-1⁻SiglecF⁺, respectivamente. En este caso en el peritoneo de los ratones control prácticamente no se detectaron neutrófilos, pero si un muy bajo número de eosinófilos lo cual está de acuerdo con la composición celular descripta para el peritoneo de ratón²⁵⁵.

Los **neutrófilos**, de manera similar a lo reportado para los monocitos Ly6C⁺⁺MHC-II⁻, se reclutaron a la cavidad peritoneal a las 4 horas p.e. sólo por la estimulación con el EgAgB (Figura 5.39 A y B y Figura S5.11 A para EgAgB nativo y S5.11 B para rEgAgB8/1). La magnitud de este reclutamiento fue mayor que la de los monocitos, alcanzando alrededor de 1x10⁶ células. Nuevamente, en presencia de LPS esta capacidad se vio anulada, reforzando la existencia de una interferencia por parte del LPS con el reclutamiento inducido por el EgAgB. A las 24 horas p.e. las preparaciones de EgAgB mostraron un reclutamiento similar al inducido por el LPS sólo o en conjunto con EgAgB, todos significativamente superiores al control (Figura 5.39 C y D). Para el caso de los neutrófilos, los experimentos con EgAgB nativo y rEgAgB8/1 arrojaron resultados similares. Corresponde mencionar que dentro de esta población CD19⁻F4/80⁻CD11c⁻MHCII⁻SiglecF⁻Gr-1⁺⁺ no se puede descartar la presencia de células mieloides supresoras, para las cuales no se cuenta con marcadores fenotípicos específicos y que se identifican por su funcionalidad. En cuanto a los eosinófilos, el número no se modificó a las 4 ni 24 horas p.e., salvo cuando se estimuló con el EgAgB nativo, condición en la que se observó un reclutamiento moderado a las 24 horas p.e., que fue nuevamente inhibido por la co-estimulación con LPS (Figura 5.40).



Figura 5.39. Efectos in vivo del EgAgB sobre la población de neutrófilos. Se estimularon hembras Balb/c por vía intraperitoneal con EgAgB nativo/rEgAgB8/1 (50 µg/ratón) o PBS_{E-B-AbAm} (control de vehículo) en ausencia o presencia de LPS (15 µg/ratón). Las invecciones de EgAgB y de LPS se realizaron en forma secuencial y en este orden sin mezclar las preparaciones. A las 4 y 24 horas p.e. se recuperaron las células mediante lavado peritoneal y se marcaron con anticuerpos específicos conjugados a fluorocromos para su análisis por citometría de flujo, siguiendo el diseño experimental que se describió en la sección 2.10. Utilizando el programa FlowJo se definieron los neutrófilos como aquellas células CD19⁻F4/80⁻CD11c⁻MHCII⁻ SiglecF Gr-1⁺⁺. Los gráficos muestran el número total de neutrófilos para experimentos con EgAgB (paneles A y C) o con rEgAgB8/1 (paneles B y D) a los dos tiempos finales. Cada punto en los gráficos representa un individuo y se indica la mediana por lote correspondiente a cada experimento (línea horizontal fina y corta) y al conjunto de experimentos independientes (línea horizontal gruesa y larga). La IF del control FMO se representa con una línea punteada. Los gráficos corresponden a dos experimentos independientes con 5 individuos por lote, salvo para el caso de EgAgB a 24 horas que derivan de tres experimentos independientes. Se aplicó la prueba exacta no paramétrica de dos vías de Mack Skillings seguido de la prueba basada en el test T de Student, sobre la cual se realizó la corrección de Benjamini y Hochberg (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).



Figura 5.40. Efectos *in vivo* del EgAgB sobre la población de eosinófilos. Se estimularon hembras Balb/c por vía intraperitoneal con EgAgB nativo/rEgAgB8/1 (50 µg/ratón) o PBS_{E-B-AbAm} (control de vehículo) en ausencia o presencia de LPS (15 µg/ratón). Las inyecciones de EgAgB y de LPS se realizaron en forma secuencial y en este orden sin mezclar las preparaciones. A las 4 y 24 horas p.e. se recuperaron las células mediante lavado peritoneal y se marcaron con anticuerpos específicos conjugados a fluorocromos para su análisis por citometría de flujo, siguiendo el diseño experimental que se describió en la sección 2.10. Utilizando el programa FlowJo se definieron los eosinófilos como aquellas células CD19⁻F4/80⁻CD11c⁻MHCII⁻Gr-1⁻SiglecF⁺. Los gráficos muestran el número total de eosinófilos para experimentos con EgAgB (paneles A y C) o con rEgAgB8/1 (paneles B y D) a los dos tiempos finales. Cada punto del gráfico representa un individuo y se indica la mediana por grupo correspondiente a cada experimento (línea horizontal fina y corta) así como a los experimentos independientes con 5 individuos por lote, salvo para el caso de EgAgB a 24 horas que derivan de tres experimentos independientes. Se aplicó la prueba exacta no paramétrica de dos vías de Mack Skillings seguido de la prueba basada en el test T de Student, sobre la cual se realizó la corrección de Benjamini y Hochberg (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

5.4.4. Integración de los resultados de los ensayos in vivo

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos de estimulación intraperitoneal con el EgAgB y el LPS, solos o administrados conjuntamente, mostraron que el EgAgB indujo una respuesta a nivel celular, y con repercusión en la producción de citoquinas, que fue diferente a la inducida por el LPS. Además, en los efectos sobre varios parámetros se observó que las respuestas inducidas por el EgAgB fueron interferidas por el LPS y viceversa. Globalmente, esto apoya los resultados observados en los ensayos basados en el uso de cultivos celulares de monocitos humanos y de macrófagos humanos y murinos.

A nivel de la dinámica de las poblaciones inmunes residentes y reclutadas al peritoneo, se resumen todos los cambios observados para los distintos grupos experimentales a las 4 y 24 horas p.e. en la Figura 5.41. Esta representación buscó visualizar posibles cambios en las poblaciones peritoneales a lo largo del tiempo. Sin embargo, como los experimentos se realizaron estimulando con distintas preparaciones de EqAqB a distintos lotes de ratones no se realizó una comparación entre los dos tiempos utilizando herramientas estadísticas. Las diferencias significativas que se indican refieren a diferencias con el grupo control a un tiempo dado (4 o 24 horas). Además en estos gráficos se consideraron en conjunto las poblaciones de monocitos inflamatorios, ya que todas ellas derivarían de la entrada de monocitos de la sangre. Los gráficos muestran la existencia de un perfil diferencial entre el LPS y el EqAgB en relación al grupo control. Observamos que la estimulación con LPS condujo a un recambio importante en la composición celular de la cavidad peritoneal con una clara disminución de los macrófagos residentes, que en el caso de los LPM fue evidente desde las 4 horas p.e. agudizándose a las 24 horas p.e., mientras que para los SPM se registró sólo a las 24 horas p.e.. Las otras poblaciones residentes analizadas, los linfocitos B y DCs, no se afectaron a las 4 horas pero también decrecieron en número a las 24 horas p.e. con respecto al control. El LPS es un activador policional de los linfocitos B^{413,414}, lo que podría explicar la leve disminución en la expresión de CD19 y el aumento en la expresión de MHC-II y CD86 observado a las 24 horas p.e. con esta endotoxina (Figura S5.7). Por otro lado, el recambio incluyó el reclutamiento a las 24 horas p.e. de gran cantidad de neutrófilos en comparación con la de monocitos inflamatorios, no observándose aumento en la población de eosinófilos. Las principales diferencias con los efectos provocados por el EgAgB (nativo o rEgAgB8/1) radican en aspectos relacionados con la cinética con la que ocurrió el recambio de las poblaciones inmunes, la entrada de eosinófilos, y en los fenotipos mostrados por las poblaciones reclutadas. En cuanto al recambio celular, a nivel de las poblaciones residentes, la estimulación por el EgAgB provocó un descenso en los macrófagos LPM y SPM relativamente similar al inducido por el LPS aunque de menor magnitud en el caso del EgAgB nativo. Sin embargo, en contraste con el LPS, el EgAgB no indujo una disminución en el total de linfocitos B, lo que podría ser consecuencia de una nula o menor capacidad para activar esta población celular, en concordancia con los menores niveles de MHC-II y CD86 observados con respecto al LPS. Por otra parte, a nivel de las poblaciones reclutadas, el EgAgB provocó un ingreso más rápido (4 horas p.e.) de neutrófilos (en alto número) y monocitos inflamatorios (en bajo número) que el LPS y promovió también la entrada de eosinófilos a las 24 horas p.e., lo cual no se observó en el caso del LPS. Respecto a posibles efectos del EgAgB sobre el recambio de las poblaciones celulares en respuesta al LPS, de la Figura 5.41 se desprende que no existieron diferencias notorias cuando el LPS se administró solo o en conjunto con el EgAgB. Por el contrario,

sí se registraron interferencias del LPS sobre respuestas celulares inducidas por el EgAgB, como el reclutamiento rápido de neutrófilos y monocitos Ly6C⁺⁺MHC-II⁻ así como también eosinófilos a las 24 horas p.e..

Por otra parte, se observó alteración en el fenotipo celular adquirido por varias poblaciones peritoneales. Primeramente, en las poblaciones de monocitos y macrófagos se encontraron diferencias en la expresión de moléculas asociadas a activación celular inducida por el LPS o el EgAgB; estas diferencias pueden ser modestas en magnitud, pero no puede descartarse que repercutan a nivel funcional. En el caso del LPS, los efectos sobre los LPM, SPM y el reclutamiento de algunas poblaciones se asociaron con la activación celular, medida en términos de aumento en la expresión de las moléculas MHC-II, CD86 y CD40. Estos aumentos fueron en general más notorios a las 24 horas, particularmente sobre las poblaciones de LPM, SPM y Ly6C⁺⁺MHC-II⁻. En comparación, la estimulación con EgAgB indujo per se aumentos menores de MHC-II y/o moléculas coestimuladoras en LPM, SPM y Ly6C⁺⁺MHC-II⁻ sugiriendo que estas poblaciones adquirirían un perfil pobremente activado a las 24 horas p.e. (similar expresión de MHC-II y CD86 al control y menor que para el LPS). Más aún, el EgAgB nativo mostró capacidad de modular la activación inducida por el LPS en dichas células, al menos en términos de la expresión de MHC-II en LPM y monocitos inflamatorios Ly6C⁺⁺MHC-II⁻, y de CD86 y CD40 en SPM. Respecto a la capacidad del EgAgB de modular la activación de los monocitos inflamatorios (Ly6C⁺MHC-II⁺ y Ly6C⁻MHC-II⁺), debe tenerse presente que en los tiempos del ensayo el reclutamiento de estas poblaciones derivadas de monocitos fue pobre y su activación fue modesta en comparación con la observada en SPM. Esto seguramente influye en la posibilidad de evaluar el efecto del EgAgB sobre el reclutamiento y activación de dichos monocitos. Se observó que estas poblaciones vieron descendidos sus valores de MHC-II en presencia de LPS, EgAgB (principalmente nativo) o la combinación de ambos estímulos, condición que coincide con la observada para los SPM y concuerda con lo observado por⁴⁰⁹. En este sentido, los monocitos Ly6C⁺MHC-II⁺ y Ly6C⁻MHC-II⁺ podrían ser fuente de un refuerzo de la población SPM en un plazo mayor a 24 horas, como también reportaron^{255,409}. Finalmente, a nivel de las DCs también se observó modulación en los niveles de expresión de CD86, lo que podría disminuir su capacidad de activación T. Por tanto, más allá de que el EgAgB promueva una reacción que parecería ser inflamatoria, con reclutamiento celular, el fenotipo que adquieren las células reclutadas parece tener menor capacidad coestimuladora y presentadora.

La modulación de la activación celular observada coincide con la modulación de los mediadores solubles que pudieron ser cuantificados en el lavado peritoneal (esto fue sólo para algunas citoquinas y únicamente a las 4 horas p.e.). El EgAgB (nativo o recombinante) moduló los niveles de IL-6 e IL-12p40 inducidos por LPS, lo cual se asociaría con una disminución del ambiente inflamatorio. Sin embargo, llamó la atención el rápido reclutamiento que indujo, principalmente de neutrófilos pero también de monocitos en comparación con el LPS. En este sentido, sería necesario contar con un análisis más completo de las citoquinas presentes en cavidad peritoneal, que permitiera determinar niveles de aquellas con mayor relación con la entrada de poblaciones desde la sangre (permeabilidad del endotelio), como IL-1 β y TNF- α , y el guiado de las mismas hacia el sitio de infección, como IL-8 para neutrófilos y MCP-1 para monocitos (ver Discusión). Esta información podría ayudar a comprender la dinámica de las poblaciones reclutadas en presencia del EgAgB.



Figura 5.41. Integración de resultados: cambios en las poblaciones celulares residentes y reclutadas a cavidad peritoneal tras la inoculación del EgAgB nativo o rEgAgB8/1 en ausencia y presencia de LPS por 4 y 24 horas. Los gráficos muestran la mediana y el rango (a partir de la mediana de cada experimento) del número total de cada población celular para el conjunto de experimentos con EgAgB o rEgAgB8/1 a los dos tiempos finales ensayados (4 y 24 horas). Notar que la escala es logarítmica. Los puntos a 4 y 24 horas se unen con una línea recta buscando visualizar la dinámica de cada población en el tiempo (tendencias a aumentar o disminuir). Se incluye del número total de células viables recuperadas para cada lote en el total de los experimentos (mediana) y se representa con un asterisco aquellos valores que mostraron diferencias significativas con el lote control a su respectivo tiempo p.e..

CAPÍTULO 6

Discusión

CAPÍTULO 6: Discusión

Esta tesis de doctorado buscó ahondar en el papel que juega el EgAgB del parásito *E. granulosus* en la adaptación a su hospedero, particularmente a través de su interacción con los monocitos y macrófagos, células residentes de los tejidos que son claves en el desarrollo de la respuesta inmune innata, y a través de ésta, en el perfilamiento de la respuesta inmune adaptativa. Para este estudio se eligió trabajar con la lipoproteína en su estado nativo, a diferencia de estudios realizados por otros grupos de investigación, apostando a reproducir, dentro de lo posible, las interacciones que pueda establecer en condiciones fisiológicas durante la infección. Esto implicó primeramente desarrollar una serie de herramientas metodológicas para su obtención en forma pura y caracterizar la preparación obtenida. Además, los obstáculos que encontramos para purificar en cantidad y calidad adecuada el EgAgB nativo, y la información obtenida sobre su composición proteica, nos llevaron a buscar un modelo alternativo expresando la forma recombinante EgAgB8/1 en células de insecto.

Se discuten primeramente los resultados referentes a las herramientas metodológicas desarrolladas.

6.1. Avances y dificultades en la obtención de preparaciones de EgAgB nativo para estudios funcionales

La obtención de las preparaciones de EgAgB nativo proveniente de LH cumplió con varios objetivos importantes y complementarios. El principal propósito fue obtener preparaciones de alto grado de pureza para los ensayos biológicos, pero a la vez se buscó caracterizarlas para profundizar en nuestro conocimiento sobre su composición y aproximarnos a su posible función. Se utilizó la fracción QS_f para el análisis proteómico, dado que contó con la ventaja de: i) ser producto de un único paso de procesamiento, evitando la suma de pasos sucesivos de purificación que podrían llevar a la pérdida de componentes poco representados, ii) ser una fracción enriquecida en el EgAgB y contener una mínima proporción de la albúmina e inmunoglobulinas del hospedero en relación al LH, cuya abundancia podría dificultar la detección de péptidos poco representados por espectrometría de masas. Por otro lado, inicialmente para obtener el EgAgB puro para ensayos funcionales, se realizó un fraccionamiento en gradiente de densidad a partir del QS_f, por ser un método utilizado para la obtención de las lipoproteínas plasmáticas humanas. Así obtuvimos la fracción lipoproteica llamada Ld_f (derivada de ultracentrifugaciones sucesivas), que como se demostró del análisis por HPLC-MS/MS y su posterior fraccionamiento sobre anti-EqAgB8/1-Sefarosa, mostró una muy buena pureza aunque aún se detectaron algunos contaminantes del hospedero, principalmente Apo-A1. Ld_f fue adecuada para la caracterización de la composición proteica y lipídica evadiendo el sesgo introducido por el uso del Mo-EB7. Sin embargo, esta metodología mostró algunas limitaciones. Por un lado, la recuperación de la fracción coloreada en el gradiente de KBr podría ser parcial afectando el rendimiento. Por otro lado, Ld_f no resultó apta para los estudios funcionales del EgAgB principalmente por la presencia de componentes tipo pirógeno, que activaron las poblaciones de macrófagos, no reproduciendo los efectos moduladores de preparaciones de EgAgB inmunopurificado descriptos previamente

por nuestro grupo³⁹⁰. Esto mostró la necesidad de incluir/adicionar el paso final de cromatografía de inmunoafinidad a la estrategia de purificación.

La escasa disponibilidad del Mo-EB7 sumada a la pérdida del hibridoma correspondiente, llevó a buscar caminos alternativos para este fin. Como la apolipoproteína EgAgB8/1 resultó ser por lejos la más abundante en las preparaciones del EgAgB nativo, resolvimos obtener para este propósito un nanoanticuerpo (VHH) anti-EgAgB8/1, con el cual se preparó la matriz para la cromatografía de afinidad. La inclusión del paso de purificación utilizando el anti-EgAgB-Sefarosa contribuyó sin duda a mejorar la calidad de la preparación, disminuyendo los niveles de LPS por debajo de 0.1 ng/µg de proteína y permitiendo observar el efecto inmunomodulador del EgAgB nativo sobre monocitos y macrófagos. De todos modos no puede descartarse que el sesgo en la composición del antígeno debido al uso del nanoanticuerpo anti-EgAgB8/1 haya contribuido a reproducir los resultados observados. Por otra parte, como ya se comentó la estimación de los niveles de LPS no fue exacta y es un punto que se deberá mejorar en el futuro, en base al uso de métodos más modernos para su determinación (kits que permiten cuantificar concentración en lugar de un umbral).

La columna de inmunoafinidad tuvo una muy baja capacidad de unión considerando la cantidad de VHH inmovilizado. Tal como se detalló en los resultados, se inmovilizaron casi 10 mg del VHH anti-EgAgB8/1 por mL de matriz de Sefarosa, lo cual, asumiendo el tamaño molecular del VHH (~20 kDa), del EgAgB (230 kDa) y una relación 1:1 para la interacción VHH-EgAgB, debería haber permitido purificar alrededor de 115 mg de EgAgB por mL, o sea aproximadamente 57.5 mg de EqAgB en término de proteína. Sin embargo la capacidad de la columna fue muy baja, de ~1.75 mg/mL, lo cual significa sólo el 2.3% de lo esperado teóricamente. Esta gran pérdida en la capacidad de la columna también fue reportada por Alvez³⁶⁸ a una escala menor, quien en forma preliminar ensayó la inmovilización del VHH anti-EgAgB8/1 y la inmunopurificación del EgAgB nativo directamente a partir de LH. Sin embargo, aún a pesar de este bajo rendimiento, Alvez afirma que la columna generada permitía alcanzar, en un único paso, rendimientos similares a los obtenidos a través del método de purificación por cromatografía de intercambio aniónico y ultracentrifugación y con una pureza similar, destacando esta herramienta para la obtención de EgAgB de una manera más práctica. El bajo rendimiento de la columna evidenció que la relación de interacción teórica entre el VHH y el EgAgB fue drásticamente menor que 1:1. Esto podría deberse a cierta desnaturalización del VHH al inmovilizarlo, o, más probablemente, a que la inmovilización a través de lisinas cercanas a los CDRs interfiriera en la interacción con el antígeno, dado el pequeño tamaño del VHH. De hecho, a pesar de que no hay lisinas en los CDRs, las regiones FR2 y FR3 (del inglés frame work region), próximas a CDR1 y CDR2, presentan 1 y 3 lisinas, respectivamente (Figura S2.1 B). La localización de estas lisinas en regiones FRs, que son más conservadas dentro de la secuencia codificante, podría representar una limitación de los VHHs en general frente a la inmovilización. Existen reportes sobre el uso de VHHs inmovilizados con fines de remoción de componentes/toxinas, y aunque no todos informan el rendimiento alcanzado algunos obtienen entre 9 y 13.5 mg del ligando correspondiente por mL de resina, representando entre un 18 y 27% del rendimiento teórico⁴¹⁵. En base al pobre rendimiento obtenido para la columna de VHH anti-EgAgB8/1-Sefarosa y a la experiencia generada, una alternativa que podría mejorar la obtención de EgAgB nativo sería expresar el VHH fusionado a un linker o a una proteína grande, que sea mayormente responsable de la inmovilización del complejo a la Sefarosa^{416,417}, de forma de mejorar la disponibilidad del VHH para el reconocimiento específico.

Si bien este trabajo fue exitoso en relación a la obtención de preparaciones aptas para estudiar los efectos del EgAgB sobre los macrófagos, cabe destacar que el proceso de obtención del EgAgB nativo conlleva varias dificultades, que podrían explicar la complejidad de obtener preparaciones de alta pureza. Primero, el material parasitario es seleccionado y colectado en mataderos, siendo difícil el control riguroso de la temperatura y el tiempo previo a su procesamiento. De hecho, la mayoría de las veces se colectan vísceras durante varios días previos a su envío a nuestro laboratorio, afectando su calidad microbiológica y por tanto su utilidad, aun cuando se conserve a baja temperatura. En segundo lugar, pese a que el EgAgB es una de las proteínas parasitarias más abundante del LH, su abundancia relativa es baja al considerar el contenido de albúmina e inmunoglobulinas del hospedero. Por tal motivo se deben emplear grandes volúmenes de LH (mínimo 1L) para obtener cantidades útiles de EgAgB. De hecho, para realizar la puesta a punto del nuevo método de purificación del EgAgB y todos los ensayos que describimos en la tesis fueron necesarias más de 20 rondas de purificación, lo que significa que se procesaron no menos de 35 litros de LH en buen estado. Se trata de una gran cantidad de material parasitario considerando que normalmente se obtienen entre 25 y 150 mL de un QH fértil. Tercero, la necesidad de partir de un gran volumen de LH crudo y la complejidad de la metodología de purificación del EgAgB (requiere varios tipos de fraccionamiento que implican pasos intermedios de concentración y/o cambio de solución amortiguadora) contribuye al bajo rendimiento final, hace más largo el proceso (se extendió por 8-10 días para cada producción, aproximadamente) y aumenta el riesgo de contaminación. Además, no resulta posible realizar pasos sencillos de concentración del LH (por ejemplo, precipitación) que faciliten el trabajo práctico ya que provocarían agregación de las lipoproteínas.

En este escenario, como forma de independizarse del trabajo con preparaciones nativas y buscando evitar contaminación derivada del material parasitario, se decidió producir como alternativa la forma recombinante de la subunidad mayoritaria EgAgB8/1 en células de D. melanogaster, un sistema no convencional que evita los posibles aportes de pirógenos inherentes a los sistemas de expresión en bacterias. El método es relativamente sencillo de ejecutar disponiendo ahora de las células S2 transformadas para la expresión del EgAgB8/1, aunque todo el proceso requiere un tiempo de más de 15 días (cultivo y amplificación de células S2 transformadas, expresión del rEqAqB8/1 durante 7 días y pasos de purificación). Para la purificación también resultó vital el paso de cromatografía de inmunoafinidad, por lo cual tiene sin duda importancia generar una matriz con alto rendimiento. Corresponde mencionar que el rEgAgB8/1 purificado por inmunoafinidad empleando elanti-EqAqB8/1-Sefarosa, no se obtuvo libre de LPS pero sus niveles fueron inferiores a 0.1 ng/µg de proteína, permitiendo llevar adelante los estudios en macrófagos. La presencia de trazas de LPS en todas las preparaciones de EgAgB, tanto nativas como recombinantes, sugiere la existencia de una interacción entre ambas macromoléculas. De hecho, esta interacción parece resistir los pasos en la purificación que utilizan condiciones disociativas relacionadas al aumento de la concentración salina (elución en la cromatografía de intercambio iónico) y descenso de pH (elución durante la cromatografía de inmunoafinidad), lo cual podría explicarse si fuera mediada por el lípido A. El rEgAgB8/1 producido adquirió un tamaño y composición similar al EgAgB nativo, armándose como una lipoproteína. Adicionalmente, reprodujo varios de sus efectos inmunomoduladores y fue capaz de promover el eflujo de colesterol de los macrófagos, por lo cual resulta promisorio como modelo para avanzar en el conocimiento de la función del EgAgB. Contar con esta partícula modelo es una ventaja para el trabajo experimental porque permite independizarse de la 210

disponibilidad de material parasitario, sobre todo para aquellos experimentos que requieren algunas decenas de mg de EgAgB (como los ensayos *in vivo*). De todos modos, los resultados que se obtengan con esta lipoproteína modelo deberán confirmarse con la lipoproteína nativa, ya carece difiere en la composición proteica (carece de otras subunidades) y lipídica, mostró mayor tamaño molecular y no reprodujo algunas actividades funcionales.

La vida útil de las preparaciones de EgAgB, como la de la mayoría de las lipoproteínas², es limitada ya que la naturaleza lipoproteica favorece su oxidación y consecuente agregación, llevando al deterioro de la preparación conforme avanza el tiempo. Por esta razón, el almacenamiento del EqAqB se realizó a 4°C en frascos de vidrio estériles y en condiciones que inhibieran la oxidación, incluyendo atmósfera de N₂ y la presencia de antioxidantes como el EDTA y el BHT. Aun tomando estos cuidados se observó formación de agregados visibles a partir de aproximadamente 3 meses de almacenamiento de las preparaciones, por lo que se fijó este tiempo como máximo para su uso en los ensayos que se describieron. Además, no se optó por congelar las muestras ya que el proceso de congelado y descongelado también podría introducir alteraciones en la organización de la partícula, llevando a la pérdida de su estructura nativa. Más recientemente, a partir de la colaboración con el Dr. Josep Julve (Instituto de Investigación del Hospital de Santa Cruz y San Pablo, Barcelona), nuestro grupo verificó que es posible congelar el EgAgB y el rEgAgB8/1 en sacarosa (40%), tal como se practica para lipoproteínas humanas, sin pérdida de la actividad moduladora (Sofía Lagos, tesis de maestría). Este método de preservación asegura la calidad y utilidad de las preparaciones lipoproteicas por más tiempo, lo cual facilitará los estudios futuros con el EqAqB.

En conjunto, esta tesis aportó conocimientos y herramientas metodológicas en lo que refiere a la obtención del EgAgB, en forma nativa y recombinante, contribuyendo al estudio de sus propiedades bioquímicas y biológicas. Fue un logro que las preparaciones de EgAgB purificadas a homogeneidad, mediante cromatografía de afinidad basada en el uso de un anticuerpo monoclonal (VHH anti-EgAgB8/1), retuvieron niveles traza de LPS posibilitando analizar *in vitro* e *in vivo* los efectos de este antígeno sobre las poblaciones de monocitos y macrófagos.

6.2. Avances en la composición del EgAgB nativo y comparación con el rEgAgB8/1

Los estudios proteómico y lipidómico permitieron ahondar en la composición del EgAgB nativo presente en el LH, lo cual contribuyó, entre otras cosas, a verificar la relevancia de la subunidad EgAgB8/1, resultado que influyó en el desarrollo metodológico discutido anteriormente. El análisis del EgAgB proveniente de hidátides de distintos genotipos o estados de fertilidad fue un tema que surgió mientras se practicaba y afinaba el método de purificación, dado que en el laboratorio se contaba con material parasitario de origen bovino fértil y no fértil, pero también con LH porcino donado desde Argentina. Se consideró que esta comparación era valiosa en términos de la información que podría aportar, aunque no formó parte de los objetivos centrales de esta tesis.

6.2.1. Sobre el componente proteico

El análisis proteómico se realizó por electroforesis bidimensional acoplada a MALDI-TOF/TOF y se complementó mediante el análisis por LC-MS/MS para posibilitar una descripción más completa de la composición del EgAgB. En relación al uso de estas metodologías, primero es importante

destacar que se trabajó de forma rigurosa, para tener certeza en la identificación de las variantes, buscando determinar qué subunidades del EgAgB, pero también cuáles de sus isoformas polimórficas, estaban presentes. Esta determinación fue alcanzada en aquellos casos en que existieron péptidos únicos diferenciales entre las isoformas, pero en muchos casos sólo se detectaron péptidos compartidos dentro de regiones conservadas que impidieron la discriminación. Las estrategias proteómicas utilizadas permitieron consolidar la información existente y aportar datos complementarios. La electroforesis bidimensional sumada a la identificación por MS/MS aportó información sobre las familias de apolipoproteínas presentes y también permitió evidenciar su capacidad de oligomerizar, sugiriendo la existencia de modificaciones post-traduccionales. Por otro lado, el análisis por LC-MS/MS tuvo mayor sensibilidad, lo cual fue una ventaja cuando se buscó discriminar entre diferentes isoformas y permitió la identificación de componentes muy poco representados (por ejemplo el EgAgB8/3 en bQS_f y el EqAgB8/5 en bQS_f y sQS_f) que no se detectaron mediante MALDI-TOF/TOF. Además, los datos cuantitativos aportados por el análisis por LC-MS/MS revelan la abundancia de las diferentes subunidades del EgAgB nativo derivado del LH en los materiales de los genotipos de Echinococcus granulosus s.l. analizados (pool de los genotipos G1/G3/G5 y G7).

El análisis por electroforesis bidimensional acoplada a MALDI-TOF/TOF fue la primer herramienta utilizada para abordar la caracterización proteómica del EgAgB, para el cual se utilizaron las fracciones QS_f y Ld_f. Estudios anteriores de nuestro grupo, aplicando esta metodología se centraron en el EgAgB inmunopurificado en base al uso del Mo-EB7³. Utilizando 25 µg de muestra en la electroforesis bidimensional observaron spots enfocados a la altura de la forma monomérica; dos spots principales ubicados a pH 8.8 y 9.6 y uno minoritario a pH 7.7, todos conteniendo la subunidad EgAgB8/1. La identificación se debió principalmente a la presencia de dos señales peptídicas que se encuentran en regiones conservadas de la secuencia aminoacídica de EgAgB8/1, haciendo imposible discriminar cuáles de las isoformas descritas para EgAgB8/1 estaba presente en cada spot. Estas isoformas incluyen moléculas que tienen diferente pl teórico, y que podrían explicar la aparición del spot a pH 9.6 y 8.8, aunque no el componente con pl en el entorno de 7.7. Este análisis cualitativo apoyaría la idea de que el EgAgB8/1 es la principal subunidad presente en el EgAgB de LH de origen bovino. Sin embargo, para caracterizar la composición proteica los datos obtenidos de este EgAgB inmunopurificado no son concluyentes, ya que podría estar enriquecido en partículas que contengan el EgAgB8/1 como consecuencia de que el Mo-EB7 no reconoce las otras subunidades del EgAgB¹⁹³. Así, el análisis de las fracciones QS_f o Ld_f por electroforesis bidimensional combinada con MALDI-TOF/TOF permitió conocer con más exactitud la composición del EgAgB derivado de LH. Para estos estudios se partió de una mayor cantidad de muestra (150 µg de QS_f o Ld_f) y se observó un perfil complejo para el EgAgB, donde las formas monomérica y oligoméricas mostraron un amplio rango de valores de pl (Figura 3.3). En concordancia con las observaciones previas, el EgAgB8/1 fue predominante ya que se identificó en todos los spots correspondientes al EgAgB y los péptidos identificados fueron compatibles con al menos 2 isoformas. Además, en algunos spots se identificaron las subunidades EgAgB/2 y EqAgB8/4, siendo posible la presencia de variantes polimórficas (Tabla 3.2). Del análisis del pl teórico de las variantes observadas (varían entre 6.15 y 9.42 en base a su secuencia proteica, Tabla 3.2), no parece posible que el polimorfismo por sí solo genere componentes con pl tan variado (entre 5 y 9). Esto sugiere la presencia de modificaciones post-traduccionales (PTM, por sus siglas en inglés) que podrían incluir fosforilación y/o oxidación, dentro de las más habituales. Utilizando herramientas in silico se observó que las variantes de las subunidades del EgAgB identificadas por

MALDI-TOF/TOF en los spots enfocados en la electroforesis bidimensional (Q5EKQ4, Q9UA06, Q6UZE2, Q6UZE3 y Q6UZD8, Tabla 3.2) poseen sitios potenciales de fosforilación que provocarían cambios notorios en el pl, contribuyendo al patrón proteico observado en dicha electroforesis (ver Material Suplementario 6.1). Sin embargo, cuando se buscó evidencias de fosforilación en base a las masas de los péptidos trípticos detectados por MALDI-TOF/TOF, no se tuvo éxito. Cabe mencionar que la detección de fosforilación en proteínas no es sencilla principalmente porque el fosfato es una modificación muy lábil. Para abordar esta caracterización sería necesario utilizar soluciones conteniendo inhibidores de fosfatasas que permitan evaluar cuidadosamente la presencia de fosforilación. De todas maneras, la detección por MS/MS enfrenta la dificultad de que el fosfato suele perderse durante el proceso de fragmentación de los péptidos, necesario para confirmar su identidad. El resultado obtenido no permite descartar la fosforilación como una PTM que contribuya al amplio rango del pl observado para los componentes del EgAgB. Respecto a la posible oxidación, no se evidenció utilizando el kit Oxyblot (Figura 3.4) por lo cual descartamos mecanismos oxidativos que generen grupos carbonilo. De todos modos, cabe señalar que, a pesar de tratarse de un método optimizado para la evaluación de la carbonilación de proteínas, el procedimiento utilizado por el kit Oxyblot ha sido criticado por falta de especificidad y por proporcionar una estimación poco fiable de la extensión oxidativa real de una proteína⁴¹⁸. En relación a la capacidad de las subunidades de contribuir a la formación de oligómeros, a partir del análisis del EgAgB nativo se observó la presencia de EgAgB8/1 y EgAgB8/4 en los spots de 16 y 24 kDa, lo cual coincide con la capacidad de oligomerización observada en general para las subunidades recombinantes^{202,392}. En contraste, el EgAgB8/2 y EgAgB8/3 (para el pool G1/G3/G5 o G7, respectivamente) se encontraron únicamente en forma monomérica por lo cual no parecerían formar oligómeros estables como las otras subunidades. Esto discrepa con los antecedentes mencionados del trabajo con las formas recombinantes que evidencian que la estructura anfipática del componente proteico delipidado define un perfil electrostático compatible con la interacción entre ellas (Figura 1.5). De todas maneras no debe descartarse que esta diferencia se asocie con dificultades en su detección (menor abundancia y/o péptidos más difíciles de detectar). Por otro lado, los spots presentes en la electroforesis bidimensional que correspondieron al EgAgB no lograron un enfoque tan preciso (se observan difusos) como otros componentes de la muestra. No se descarta que esta particularidad se relacione con la presencia de lípidos, que permanecerían asociados al componente proteico y pudieran afectar el enfoque/migración de las proteínas, incluso contribuyendo a su capacidad de oligomerización, coincidiendo con lo postulado por²⁰².

En relación a rEgAgB8/1, su análisis por SDS-PAGE y tinción con Coomassie (Figura 5.7 B y D) no permitió evidenciar de forma clara la presencia de oligómeros aunque no podría descartarse que esto ocurriera en base al resultado del western blot (Figura 5.7 C). Si bien no se evaluó el comportamiento del rEgAgB8/1 por electroforesis bidimensional, la comparación con el EgAgB nativo podría aportar pistas sobre cómo esta subunidad contribuye al complejo perfil observado por esta técnica.

En cuanto al conjunto de resultados proteómicos logrados, este trabajo contribuyó a ampliar la información disponible sobre *E. granulosus* s.l. y las subfamilias del EgAgB. La mayoría de la información que estaba disponible al inicio de esta tesis derivaba de estudios proteómicos de tipo cualitativo del LH total^{42,43,380}, en los que no se reportó el genotipo correspondiente al material parasitario analizado (sólo indican la especie del hospedero). Dada la complejidad del LH y la baja abundancia del EgAgB en él, estos estudios no describen su composición con exactitud, pero

mostraron la presencia del EgAgB8/1-5³⁸⁰, EgAgB8/2 y 4⁴² y EgAgB8/2-4⁴³. Existe un único trabajo²⁰⁴ que realizó una caracterización proteómica cuantitativa del EgAgB purificado de hidátides pulmonares fértiles de origen bovino y humano, pertenecientes al genotipo G1. En dicho trabajo, el EgAgB inmunopurificado a partir de hidátides individuales se analizó mediante LC-MS/MS (en solución o a partir de bandas obtenidas mediante separación en geles SDS-PAGE o nativos), estimando la abundancia relativa de las subunidades mediante el índice emPAI. Tanto para hidátides bovinas (n=2) como para humanas (n=1), y en forma concordante para las distintas aproximaciones experimentales alcanzadas, la subunidad mayoritaria fue el EgAgB8/1 seguida del EgAgB8/4, EgAgB8/2 y EgAgB8/3, en orden de abundancia relativa decreciente. A diferencia, en esta tesis el análisis proteómico del EgAgB se realizó a partir de un pool de LH (n=23), sacrificando la caracterización individual para alcanzar la caracterización de una muestra representativa. Así, el conjunto de los datos obtenidos en esta tesis está globalmente de acuerdo con este antecedente ya que mostró la presencia de las subunidades EgAgB81-4, siendo el EgAgB8/1 la mayoritaria en el pool proveniente de los genotipos G1/3/5. Las subunidades EgAgB8/2-4 representaron una fracción menor del total ordenándose, según la abundancia estimada por iBAQ, primero EgAgB8/3, luego EgAgB8/4 y finalmente EgAgB8/2. Adicionalmente, logramos detectar EgAgB8/5 con la menor representación dentro del total de las subunidades, aportando nueva información al estudio realizado por Monteiro y colaboradores²⁰⁴. Lamentablemente la necesidad de purificar el EgAgB a partir de pooles de LH y nuestra impericia/limitaciones para realizar el genotipado del material impidieron generar pooles derivados de un único genotipo de E. granulosus s.l.. De todas maneras, independientemente del origen del EgAgB nativo, la subunidad EgAgB8/1 fue ampliamente mayoritaria en las especies comprendidas dentro de E. granulosus s.l., lo cual es respaldado también por otros autores^{202,380}. La abundancia y el hecho de que el EgAgB8/1 recombinante mostró capacidad para unir lípidos^{170,392} e interactuar con células innatas modulando la activación inflamatoria y contribuyendo al eflujo de colesterol (esta tesis), indican que esta isoforma es un componente clave en la función del EgAgB en la hidátide. En relación con las otras subunidades, los resultados obtenidos indicaron que todas las variantes son sintetizadas por la hidátide de *E. granulosus* s.l. pero en niveles muy inferiores al EgAgB8/1, avalando datos previos de ARNm¹⁸⁵ y niveles de proteína³⁸⁰ para la expresión de *EqAqB1-5*.

Resultó particularmente novedosa la descripción, a nivel de la presencia y abundancia, de los productos proteicos del EgAgB en la hidátide de E. canadensis, genotipo G7. Esta tesis aportó evidencias que apoyan la expresión diferencial de EgAgB2 entre las subespecies presentes en E. granulosus s.l. ya que la subunidad EgAgB8/2 no se detectó en el antígeno proveniente del LH del genotipo G7 de E. canadensis contrastando con los resultados en el material bovino obtenidos en esta tesis para los genotipos G1/G3/G5 y para el genotipo G1²⁰⁴. La falta de EgAgB8/2 en *E*. canadensis se explicaría a nivel molecular por la ocurrencia de una transversión A/T (en la posición 126 de la secuencia) que probablemente interfiere con el mecanismo canónico de corte y empalme (splicing) impidiendo la síntesis de un producto proteico funcional¹⁹⁶. A partir de la secuencia publicada por Kamenetzky y colaboradores¹⁹⁶ (*EqB2G5v14*) no se pudo detectar la presencia de péptidos de EgAgB8/2 específicos de E. ortleppi. Esto pudo ser consecuencia de la baja proporción en la que se encontraban los componentes de *E. ortleppi* en el LH bovino (alrededor del 10-15% del volumen total) o posiblemente a la falta de funcionalidad de EqAqB2 también en esta especie¹⁹⁶. De hecho, en E. ortleppi el EqAqB2 podría también funcionar como un pseudogen, ya que el alineamiento nucleotídico reveló la existencia de similitudes con las secuencias provenientes de los genotipos G6 y G7 (E. canadensis) y diferencias con las correspondientes a los genotipos de E.

granulosus s.s., incluyendo la presencia de la transversión A/T en el sitio de *splicing*¹⁹⁶. A la fecha no se encuentran disponibles en bases de datos públicas otras secuencias de *EgAgB2* de *E. ortleppi* que permitan ampliar el análisis de estos datos. Como el EgAgB8/2 presentó una baja abundancia relativa en los genotipos G1/G3/G5 en comparación con EgAgB8/1, su ausencia podría no tener repercusiones relevantes a nivel funcional. Por un lado no se han observado diferencias entre las propiedades de unión a lípidos de EgAgB8/1 y EgAgB8/2 en ensayos *in vitro*⁴¹⁹. Por otro, EgAgB8/2 fue la subunidad que mostró menor capacidad de unión a los monocitos/macrófagos. En relación al *EgAgB5*, detectamos en sQS_f dos péptidos únicos que hacen confiable la identificación del EgAgB8/5 en la hidátide de *E. canadensis*, en contraste con hallazgos previos a nivel de ARN¹⁹⁷. Esta diferencia podría explicarse si *EgAgB5* se expresara pobremente en la hidátide y/o si los estudios previos de expresión de ARNm se realizaron utilizando cebadores que no fueron diseñados específicamente para *E. canadensis*.

Teniendo en cuenta que el EqAgB es un componente parasitario valioso para el diagnóstico de la CE humana por ser específico de cestodos, las diferencias en la composición de las subunidades entre los genotipos G1/G3/G5 y G7 son informativos a nivel del diagnóstico y los estudios epidemiológicos sobre esta zoonosis. En particular, las subunidades rEgAgB8/1 y rEgAgB8/2 producidas en bacterias, así como los péptidos derivados de ellas, han alcanzado un rendimiento razonable en inmunoensayos con fines diagnósticos utilizando paneles de sueros de pacientes con CE y otras infecciones por helmintos (revisado por⁴²⁰). En la mayoría de estos estudios, las subunidades recombinantes se evaluaron como antígenos únicos, aunque la combinación entre ellos (cóctel de subunidades de EgAgB) o con otros antígenos del LH resultarían útiles para alcanzar pruebas más sensibles y específicas^{421–426}. En este sentido, las preparaciones de rEgAgB8/1 generadas en esta tesis podrían resultar de utilidad para el inmunodiagnóstico. Además, los resultados indican que el uso de EgAgB8/2 como antígeno en inmunoensayos podría contribuir a resultados falsos negativos en pacientes infectados por E. canadensis, al menos del genotipo G7. Probablemente lo mismo se aplica a las infecciones por el genotipo G6, aunque no se ha confirmado aún la falta de EgAgB8/2 a nivel de proteína. Como se mencionó en la Introducción, E. canadensis representa entre el 11% y el 21% de los casos de CE en humanos a nivel mundial, alcanzando una mayor prevalencia en algunos países. Por lo tanto, los resultados de esta tesis denotan la importancia de adaptar las herramientas diagnósticas a la situación epidemiológica de cada región geográfica. Teniendo en cuenta la distribución mundial de E. canadensis, las observaciones realizadas pueden ser de gran importancia para las regiones donde se han notificado casos de infección humana (incluidos países de todos los continentes, como Argentina, Egipto, Irán, Kenia, Mauritania, Mongolia, Polonia, Sudáfrica y ex-Yugoeslavia^{19,20}). Sin embargo, debido a la escasa información sobre las especies/genotipos de E. granulosus s.l. asociadas con la CE humana en muchos países y regiones, la información que aporta esta tesis resultaría de interés para cualquier región donde circule E. canadensis (por ejemplo, el sur de Brasil y la región mediterránea^{21,22}). Además, es importante recordar que la determinación del genotipo/especie de E. granulosus s.l. responsable de los casos de CE en humanos es un tema relevante porque las especies pertenecientes a este complejo difieren en sus características biológicas (es decir, infectividad y patogenicidad en humanos), lo que debería influir en el diseño de programas de control, así como de seguimiento y tratamiento de la enfermedad [54]. Sin embargo, hoy en día, sólo se puede realizar el genotipado a partir de muestras parasitarias después de la cirugía y utilizando herramientas de biología molecular. Dado que E. granulosus s.s. y E. canadensis son la causa más común de CE humana, valdría la pena desarrollar herramientas simples para diferenciar

las infecciones causadas por ellos. En este sentido, podría ser valioso contar con inmunoensayos sensibles para la detección de anticuerpos contra EgAgB8/2 en el suero de pacientes (basados en el uso de rEgAgB8/2, o sus péptidos derivados, como antígeno). La detección de anticuerpos específicos contra EgAgB8/2 podría descartar la infección por *E. canadensis*. De todas maneras resulta esencial examinar su valor para diferenciar las infecciones por *E. granulosus* s.s. y *E. canadensis*, considerando que la respuesta de anticuerpos anti-EgAgB8/2 podría ser débil en base a la baja abundancia de esta subunidad en el EgAgB nativo derivado de los genotipos G1/G3/G5 (al menos a partir del análisis de muestras bovinas y humana²⁰⁴).

También corresponde mencionar que, en concordancia con los antecedentes sobre la diversidad de isoformas expresadas en E. granulosus s.l., se detectaron diferentes isoformas de las subunidades de EgAgB8/1 y EgAgB8/3-5 en los genotipos G1/G3/G5, que además difirieron de las identificadas en el genotipo G7. La riqueza de isoformas podría relacionarse con el estado de fertilidad de la hidátide; se detectaron 2 y 3 isoformas de EgAgB8/3 y EgAgB8/4 en bQSf de origen fértil, respectivamente, contra 1 de cada una en bQS_f de origen no fértil. Una vez que se definan con mayor precisión las propiedades biológicas del EgAgB nativo será interesante compararlas entre las diferentes subunidades proteicas y sus isoformas, lo cual sumado a las diferencias en su expresión en diferentes estructuras del parásito y/o genotipos podría contribuir a comprender la función que cumple este antígeno. También, vale la pena aclarar que como se dispuso de cantidades limitadas de hidátides suinas que se utilizaron al inicio de la tesis, el EgAgB nativo de G7 no tuvo la calidad adecuada para realizar ensayos funcionales sobre las células y que permitieran compararlo con el EgAgB purificado de los genotipos G1/3/5. Este tipo de comparación también podría aportar sobre la posible participación de EqAgB8/2 en la interacción del EgAgB nativo con blancos moleculares o celulares y los efectos que deriven de estos contactos. En principio, no sería esperable observar un comportamiento tan distinto entre el EgAgB nativo derivado de los genotipos G1 y G7, ya que, como mencionamos anteriormente, la subunidad rEgAgB8/2 no ha mostrado ser eficiente en la interacción/unión a monocitos y macrófagos.

Finalmente, el análisis proteómico sobre las fracciones QS_f reveló la presencia de una gran cantidad de componentes del hospedero. Esto está de acuerdo con numerosos antecedentes provenientes del análisis del LH^{42,43,380} y podría ser consecuencia de la permeabilidad de la CL y CG de la hidátide y/o del transporte activo por parte del parásito. Cabe destacar que por LC-MS/MS se identificaron diversas apolipoproteínas en bQSf y sQSf (Tabla 3.4), incluyendo Apo-AI (reportado inicialmente por⁴²⁷), Apo-M y Apo D, todas presentes en la HDL de mamíferos. Adicionalmente se encontró Apo-E y Apo-B100 que se relacionan con la LDL. En base a estos resultados tanto HDL como LDL del hospedero, o al menos sus apolipoproteínas, serían capaces de ingresar a la hidátide. Esto las convierte en buenos candidatos como donantes de lípidos esenciales para el parásito, que podrían ceder directamente estos lípidos a las estructuras del parásito, o intercambiarlos con el EgAgB como transportador intermediario. Así la entrada de estas apolipoproteínas a la hidátide podría ser parte de un mecanismo de adaptación del parásito que le permitiría adquirir lípidos esenciales del hospedero. A la fecha no existen estudios que hayan abordado la interacción del EgAgB con las lipoproteínas plasmáticas como fuente de lípidos, aspecto que consideramos importante abordar en nuestro grupo de investigación. Ejemplo de este tipo de interacción entre proteínas del parásito y lipoproteínas del hospedero se ha reportado para una proteína secretada por el metacestodo de E. multilocularis, llamada EmABP, capaz de
interactuar con la Apo-Al⁴²⁷; esta interacción podría cumplir un papel en la toma y transporte de lípidos y colesterol a partir de la HDL del hospedero para satisfacer las demandas del parásito.

6.2.2. Sobre el componente lipídico

Respecto a la caracterización de las especies lipídicas nativas del EgAgB los resultados de esta tesis comprueban la compleja composición examinada previamente por HPTLC y cromatografía de gases³, ampliando su descripción mediante el empleo de herramientas más potentes para el análisis, como lo es la cromatografía acoplada a espectrometría de masas. En este estudio, gracias a la disponibilidad de las columnas C4 y HILIC, se logró una detallada descripción de los ácidos grasos (ampliando los datos obtenidos utilizando cromatografía gaseosa³) y de los fosfolípidos (sobre todo para la fracción Ld_f). De todas maneras este análisis por HPLC-MS/MS debe considerarse preliminar e incompleto. Por un lado, si bien siempre se utilizaron pooles de LH representativos de un gran número de hidátides (entre 5 y 25), en el marco de esta tesis sólo se logró analizar un único pool de EgAgB_{IP} y rEgAgB_{S2} con triplicados analíticos; sería deseable completar estos estudios analizando al menos 2 lotes más para contar con un mínimo de 3 réplicas biológicas, ya que, como se desprende del análisis por HPTLC de 3 lotes independientes de bLd $_{t}$ existieron diferencias en la proporción en que se encuentran representadas algunas clases lipídicas. Es justo aclarar que no fue sencilla la repetición del estudio ya que se realizó en el Reino Unido gracias a la colaboración del Dr. D. Watson, pero no contamos con financiación que permitiera consolidar esta colaboración e intervenir directamente en el análisis. En una primera etapa se analizaron las muestras en base en al uso de una columna HILIC solamente, y los resultados obtenidos fueron una guía para en una segunda etapa emplear columnas HILIC y C4 para analizar EqAgB nativo y recombinante. Cada análisis implicó la preparación y envío de varios mg de lípido, lo cual representó destinar un porcentaje considerable del lote de EgAgB nativo producido (recordar que el lípido representa aproximadamente la mitad de la masa de la lipoproteína). Por otro lado, el estudio es incompleto porque mediante HPLC-MS/MS no fue posible determinar la composición de los esteroles, componente de la lipoproteína de gran importancia por ser un lípido esencial para el parásito y por las evidencias obtenidas sobre la capacidad del EgAgB de adquirir colesterol de los macrófagos. Lamentablemente, este estudio no se concretó en el Reino Unido. El análisis de los esteroles puede realizarse por cromatografía gaseosa y es uno de los aspectos importantes que quedó pendiente del análisis de la composición del EgAgB.

En relación a la composición lipídica descrita para el EgAgB de las distintas muestras analizadas surgen algunas observaciones. Primero, el análisis por HPTLC del EgAgB nativo proveniente de hidátides bovinas o suinas mostró en ambos casos la presencia de lípidos polares y neutros (Figura 3.7). Este análisis se realizó con la fracción Ld_f, muy enriquecida en el EgAgB pero conteniendo algunos contaminantes, particularmente la apolipoproteína Apo-AI del hospedero en el caso del bLd_f por lo cual la descripción podría incluir lípidos contaminantes. Considerando esta limitación, igual puede observarse que la fosfatidilcolina resultó ser el fosfolípido más abundante, y este resultado se verificó en el análisis por HPLC-MS/MS tanto en las muestras de Ld_f como de EgAgB nativo. Además, la composición de los fosfolípidos en general fue muy similar independientemente de la fertilidad de la hidátide. En contraste, a nivel de los lípidos neutros, se observó una mayor proporción de TAGs en sLd_f para evaluar si el mayor contenido de TAGs se refleja en diferencias en el tamaño de la partícula lipoproteica, ya que sería posible que los TAGs se acumularan en el centro de la partícula incrementando su volumen. En el caso del bLd_f la variación en la proporción de las

clases lipídicas observada en los diferentes lotes (Figura 3.7), no afectó el tamaño de las partículas analizadas por DLS, las que mostraron R_H similares (~5.7 nm). Las diferencia en la proporción de TAG entre las fracciones Ld_f de origen bovino y suino no se relaciona necesariamente con la especie del parásito/hospedero, ya que como se comentó el análisis de réplicas biológicas del bLdf muestra diferencias en la proporción en que se encuentran representadas algunas clases lipídicas, a pesar de que cada lote se preparó a partir de varias hidátides individuales. Es necesario examinar un número mayor de muestras provenientes de hidátides suinas del genotipo G7 de E. canadensis para establecer si se verifica esta mayor proporción de TAGs en relación al antígeno derivado de hidátides bovinas (genotipos G1/G3/G5 de E. granulosus). De todas maneras, variaciones en el contenido de lípidos neutros, como los TAG, en el EgAgB nativo entre subespecies/especies de E. granulosus s.l. o dentro de una misma subespecie podrían ser consecuencia de la edad, estado de vitalidad y/o grado de fertilidad (generación de protoescólices) de la hidátide. Por un lado, el mayor contenido de TAGs en sLdf vs. bLdf podría ser consecuencia de la mayor vitalidad/fertilidad de la hidátide de E. canadensis del genotipo G7, proveniente de su hospedero natural. En comparación como el bovino no es el hospedero natural del genotipo G1 (predominante en los pooles analizados), el parásito podría no encontrarse óptimamente adaptado, repercutiendo en su vitalidad/fertilidad y afectando, por tanto, el metabolismo lipídico. Por otra parte, la idea de que diferencias en el contenido lipídico estén ligadas a la vitalidad/fertilidad encuentra sustento en la comparación de la composición lipídica de bLd_f proveniente de hidátides fértiles y no fértiles, aunque el análisis de mayor número de lotes también es necesario para alcanzar una conclusión. En relación al EgAgB derivado de hidátides fértiles, en aquel de hidátides no fértiles se observó una menor abundancia relativa de los principales ácidos grasos y una mayor abundancia relativa de formas oxidadas (Figura 3.8). Basados en esto, y en la idea del EgAgB como transportador, su composición lipídica podría reflejar el estado de la hidátide; menor vitalidad podría ligarse con procesos oxidativos aumentados mientras que la generación de PE requeriría mayor adquisición y transporte de lípidos esenciales para la construcción de los componentes estructurales del parásito.

Por otro lado, respecto a la composición lipídica del EgAgB, fue evidente que las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación mostraron diferencias (comparación del perfil lipídico del Ld_f obtenido luego de una o dos ultracentrifugaciones y del EgAgB_{IP}), pero a pesar de ellas, la composición no varió notoriamente en los lípidos que predominaron en la muestra, tanto neutros como polares (observar las abundancias relativas dentro de cada muestra, Figuras 3.9 y 5.10 y Tablas S3.3 y S5.1). Es lógico pensar que durante el protocolo de purificación se hayan perdido especies lipídicas débilmente asociadas al EgAgB o asociadas a proteínas contaminantes (por ejemplo Apo-Al o a trazas de albúmina). En este sentido el proceso de purificación permitiría obtener muestras enriquecidas en los lípidos que principalmente conforman el EgAgB. En cuanto al contenido de ácidos grasos del EgAgB nativo, se logró ampliar la descripción inicial realizada por nuestro grupo utilizando cromatografía gaseosa⁴⁵, donde se documentó gue el contenido de ácidos grasos del EgAgB inmunopurificado (utilizando el Mo-EB7) fue muy similar al del LH de origen, sugiriendo que el EgAgB8/1 une los ácidos grasos más abundantes del LH de forma no selectiva. En dicho trabajo se observó que, al igual que en el LH, en el EgAgB derivado de hidátides bovinas y humanas predominaron los ácidos grasos 18:1 (oleico), 16:0 (palmítico) y 18:0 (esteárico), seguido de 18:2 (linoleico) y 20:4 (araquidónico) en menor proporción (el resto representaron menos del 5% del total). El ácido oleico fue el mayoritario en la lipoproteína de origen bovino y para el cual existió cierto grado de selectividad por su unión. Los resultados de esta tesis coinciden

en la predominancia en el EgAgB inmunopurificado de los ácidos 18:1 (posiblemente oleico), 16:0 (palmítico), 18:2 (posiblemente linoleico) y 20:4 (posiblemente araquidónico); no puede asegurarse la identidad de los ácidos grasos insaturados porque la identificación por masa no permitió distinguir la posición de las insaturaciones en la cadena carbonada. En contraste con los resultados previos⁴⁵, no se identificó el ácido graso 18:0. Esto podría ser consecuencia de variaciones en el contenido de la hidátide proveniente de distintos individuos y/o alteraciones en los ácidos grasos como consecuencia de la manipulación de la muestra (oxidación, degradación, entre otras). Vale la pena destacar que se intentó evitar la acción de procesos oxidativos durante la preservación del LH y su posterior uso para el proceso de purificación del EgAgB, mediante el agregado de EDTA y BHT. De todas formas, se detectaron especies lipídicas compatibles con la ocurrencia de procesos de oxidación sobre ácidos grasos mayoritarios (16:1) y sobre el 18:0, aunque resulta imposible discernir si son consecuencia de alteración de la muestra. Finalmente, el uso de esta metodología permitió identificar una mayor cantidad de ácidos grasos en comparación a la cromatografía gaseosa y describir los principales lípidos polares presentes en el EgAgB nativo.

Respecto a la composición lipídica del rEgAgB8/1_{s2.} se observaron diferencias con el EgAgB_{IP} tanto a nivel de los lípidos neutros como polares (Figura 5.10). Si bien los fosfolípidos más abundantes en rEgAgB8/1_{s2} y en el EgAgB nativo o Ld_f no son exactamente los mismos, en todas las muestras predominan los del grupo de la PC, exhibiendo diferencias en los ácidos grasos que se encuentran en las posiciones 1 y 2 del glicerol (puede relacionarse también con la diferente abundancia de ácidos grasos, tal como se discute más adelante). Esto significaría que a pesar de estas diferencias en la composición de la PC, los grupos polares que el rEgAgB8/1_{s2} estaría mostrando sobre la superficie de la partícula podrían asemejarse a los expuestos en el EgAgB nativo. Las diferencias observadas son esperables teniendo en cuenta que el rEgAgB8/1_{s2} deriva de células de insecto en cultivo, por lo cual los principales ácidos grasos disponibles quedarán determinados por los nutrientes y el metabolismo de esta célula, que seguramente difieran de los disponibles fisiológicamente para la síntesis del EgAgB a nivel de la hidátide. Lamentablemente, existe muy poca información (composición del medio de cultivo XPress y lipídica celular) que permita establecer qué lípidos podría estar sintetizando la célula S2 en las condiciones de cultivo. Dado que el cultivo de S2 se practica en ausencia de suero, los lípidos disponibles para el ensamblado del rEgAgB8/1_{s2} derivarían únicamente de la síntesis celular. La ausencia de bibliografía sobre los lípidos de las células S2, llevó a buscar información sobre la composición lipídica de la hemolinfa de D. melanogaster. En este sentido, encontramos que más del 95% de los lípidos presentes en la hemolinfa son transportados por la lipoforina⁴²⁸. Esta lipoproteína contiene principalmente los ácidos grasos 14:0, 16:0, 14:1, 16:1 y 18:1 mientras que 18:0 y 18:2 se encuentran en menor proporción (un orden de magnitud)⁴²⁹. Además, en este estudio no se detectó la presencia del C20:4. El hecho de que rEgAgB8/1_{s2} contenga C14:0 y C16:1 en mayor proporción en comparación con el EgAgB nativo concuerda con la abundancia de estos ácidos grasos en la hemolinfa, pero no en el LH derivado de hidátides bovinas⁴⁵. Además la abundancia de C16:0 y C18:1 en el rEgAgB8/1_{s2} está de acuerdo con su predominancia en la hemolinfa.

De todos modos, **si bien existen diferencias en el tamaño y la composición proteica y lipídica del rEgAgB8/1**_{s2} **respecto al EgAgB nativo, la posibilidad de considerarlo una lipoproteína modelo depende principalmente de su comportamiento en los estudios funcionales**, lo cual se discute más adelante.

6.3. Capacidad de unión del EgAgB a monocitos y macrófagos

Uno de los objetivos específicos para abordar la hipótesis de este trabajo fue estudiar la capacidad de unión del EgAgB nativo a los monocitos y macrófagos; para esto se realizaron ensayos de unión utilizando tanto el EgAgB marcado como el Mo-EB7 para revelar la interacción y monocitos y macrófagos humanos (derivados de la línea THP-1) y murinos (derivados de una inflamación peritoneal). Los resultados mostraron que los monocitos y macrófagos representan una potencial célula blanco del EgAgB y aportaron algunos aspectos claves de esta interacción. La interacción quedó demostrada porque: i) el EgAgB, pero no la OVA, se unió a monocitos y macrófagos en forma dosis dependiente, con una Kd del orden 10⁻⁷ M (Figura 4.2); ii) la unión específica del EgAgB marcado fue desplazada por el EgAgB sin marcar, pero no por OVA (Figura 4.3); iii) el EgAgB nativo se unió a células que poseen el marcador fenotípico característico de monocitos inflamatorios/macrófagos F4/80 (F4/80⁺) en su superficie, pero no a los linfocitos presentes en las células murinas de la cavidad peritoneal (Figura 4.4). Además, se observó unión del EgAgB nativo a una población de células inflamatorias peritoneales F4/80⁻, que incluye probablemente poblaciones de monocitos recientemente infiltrados y neutrófilos. Esto resulta consistente con la observada capacidad de unión a monocitos THP-1 y con los efectos descriptos del EgAgB sobre neutrófilos⁴³⁰.

Por otra parte, se encontró que las apolipoproteínas presentes en el EgAgB probablemente contribuyen a la unión a los monocitos y macrófagos ya que las subunidades de rEgAgB libres de lípidos, particularmente rEgAgB8/1 y rEgAgB8/3, se unieron a estas células y a macrófagos peritoneales de ratón (Figura 4.5). En contraste, en las condiciones de los ensayos realizados, la subunidad rEgAgB8/2 mostró una débil unión a los macrófagos (Figura 4.5). Estas propiedades de unión a los monocitos y macrófagos están de acuerdo con el hecho de que las subunidades rEgAgB8/1 y rEgAgB8/3 presentan mayor similitud a nivel de su secuencia aminoacídica entre sí que con la subunidad rEgAgB8/2²⁰⁰. Estos resultados junto a la comprobación de que el EgAgB8/1 es la subunidad más abundante en el EgAgB nativo presente en el LH, sugieren un importante papel de esta apolipoproteína en su eventual reconocimiento por monocitos y macrófagos. Además, teniendo en cuenta la relación proteína:lípido, es altamente probable que una partícula lipoproteica contenga varias moléculas de EgAgB8/1, lo cual facilitaría la interacción con las células a través del fenómeno de avidez. El EgAgB8/3 también podría contribuir a una mayor fuerza de unión aunque esta subunidad parecería estar pobremente representado en el EqAgB nativo derivado de LH bovino, procedente de parásitos del genotipo G1, G3 y G5. De todas manerass, no se puede descartar su participación ya que mostró una unión fuerte, mayor a la mostrada por el rEgAgB8/1 particularmente en los macrófagos, y podrían existir variaciones entre diferentes hospederos intermediarios y/o en la composición del EgAgB que es liberado hacia los tejidos del hospedero a lo largo de la infección (fase de pre-enquistamiento vs. fase de postenquistamiento). Finalmente, los resultados obtenidos también podría sugerir que los fosfolípidos, particularmente la PC, juegan un papel en la interacción del EgAgB con los monocitos/macrófagos ya que el tratamiento con fosfolipasa D, hidrolizó la PC y afectó su capacidad de unión (Figura 4.7). Además, los estudios de competencia con vesículas de fosfolípidos sugirieron que la PC contribuye a la interacción en forma indirecta, influyendo en cómo las apolipoproteínas del EgAgB se presentan en la superficie de la partícula lipoproteica, más que mediando por sí misma enlaces con blancos moleculares en las células. En este sentido, la presencia de regiones con carga negativa y positiva prevista para todas las subunidades por

220

modelado de su estructura *in silico*²⁰³ (Figura 1.4), sugiere que las interacciones electrostáticas entre las apolipoproteínas del EgAgB y los fosfolípidos pueden contribuir a su adecuado montaje en la superficie de la partícula. No obstante, también debemos considerar que al hidrolizar la PC expuesta en la partícula de EgAgB nativo generando ácido fosfatídico, es posible que aumente significativamentesu carga negativa. Este aumento de carga neta negativa podría inhibir la unión del EgAgB a las células, sin que esto afecte estrictamente la exposición de las subunidades EgAgB8/1 y EgAgB8/3, sino el entorno en el que se encuentran.

Una observación que surge de los resultados anteriores, es que el/los motivos moleculares involucrados en la unión parecen estar presente en las subunidades de rEgAgB8 delipidadas, por lo cual la presencia de la estructura lipoproteica intacta no sería esencial para la unión celular. Esto podría explicar por qué las preparaciones de EgAgB desnaturalizadas mostraron efectos, de tipo modulador, sobre algunas células inmunes^{90,207}. Los motivos proteicos parecen ser resistentes a altas temperaturas, SDS y electroelución. Sin embargo, los efectos biológicos desencadenados por estos motivos en las células del sistema inmune pueden no ser representativos de las interacciones que ocurren en condiciones fisiológicas, si establecen interacciones total o parcialmente diferentes a las mediadas por el EgAgB nativo.

En conjunto, estos resultados indicarían que existe la posibilidad de que los monocitos y macrófagos reclutados durante la infección por la hidátide interaccionen con el EgAgB nativo, en la medida que esta lipoproteína alcance el tejido del hospedero. Esta interacción estaría medidada por uno o más receptores celulares capaces de unir al EgAgB, a través de sus apolipoproteínas, principalmente EgAgB8/1. Como se observó que los valores de índice de unión fueron siempre mayores en el caso de los macrófagos en comparación con los monocitos, sería posible que el eventual receptor del EgAgB tuviera un mayor nivel de expresión en los macrófagos, o bien que los macrófagos expresen receptores adicionales.

6.3.1. Explorando posibles receptores celulares involucrados en la unión del EgAgB

Considerando que el EgAgB comparte propiedades fisicoquímicas con las lipoproteínas plasmáticas, particularmente con la HDL y con su fracción más pequeña HDL₃⁴⁵, planteamos que los receptores celulares para lipoproteínas presentes en monocitos y macrófagos están involucrados en el reconocimiento de este componente parasitario. **Ensayos de competencia de la unión del EgAgB nativo a monocitos (Figura 4.9) mostraron una inhibición modesta, pero significativa, por HDL y LDL, indicando que este tipo de receptores estaría involucrado la unión y sugiriendo además la participación de otro receptor/es.**

¿Cómo explicamos que el EgAgB utilice receptores de lipoproteínas para la interacción con los monocitos y macrófagos? Se conoce que las lipoproteínas plasmáticas se unen a diferentes tipos de receptores, en general a través del reconocimiento de las apolipoproteínas que las componen. Aunque las subunidades EgAgB8 no tienen similitud a nivel de su secuencia de aminoácidos con los componentes proteicos de la HDL y/o LDL, exhiben algunas características bioquímicas similares que son propias de las llamadas apolipoproteínas plasmáticas intercambiables de vertebrados^{387,388,431}. De hecho, éstas incluyen pequeñas proteínas ricas en α-hélice (algunas de ellas menos de 10 kDa en masa) tal como sucede con las apolipoproteínas del EgAgB, ya que el análisis por dicroísmo circular del EgAgB nativo y de las rEgAgB8/1-3 delipidadas muestra que tienen cantidades sustanciales de α-hélices (entre 42 y 65% y entre 35 y 40%, respectivamente)

^{187,191,198}. Además este tipo de estructura secundaria aumenta cuando se une a lípidos¹⁹⁸. Por otra parte, el análisis *in silico* de la estructura de EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 sugiere que estas subunidades adoptarían estructuras de α -hélices anfipáticas, que son una característica importante de las apolipoproteínas intercambiables Apo AI y Apo E³⁸⁷. Así, estas similitudes en la distribución de aminoácidos polares y/o cargados a lo largo de la espiral del α -hélice entre el EgAgB8 y las apolipoproteínas intercambiables presentes en la HDL y LDL podría explicar por qué estas lipoproteínas distantes evolutivamente comparten este tipo de receptores. Adicionalmente, se ha establecido que algunas de estas apolipoproteínas inhiben la síntesis de interleuquinas proinflamatorias inducida por LPS en macrófagos murinos de la línea celular RAW 264.7⁴³² de forma similar a los efectos que el EgAgB nativo mostró sobre macrófagos, lo cual reforzaría la idea del uso de receptores para lipoproteínas.

En este trabajo se intentó avanzar en la identificación del receptor involucrado, aunque sólo se logró explorar la participación de algunos candidatos. Uno de ellos fue el receptor de LDL (LDLr). Se trata de una glicoproteína integral de membrana, altamente conservada, que se divide en 5 dominios distintos, tres de ellos extracelulares, uno transmembrana y uno citoplasmático^{433,434}. El primer dominio extracelular, correspondiente a la región amino terminal de la proteína, es el dominio de unión al ligando y se compone de siete módulos repetidos que se denominan LDL-A (del inglés, LDL receptor type A). En cada módulo LDL-A se expone una región rica en aminoácidos cargados negativamente, como ácido aspártico y ácido glutámico⁴³⁵. Las regiones que conectan cada módulo repetido con el siguiente le brindan flexibilidad al dominio de unión, de forma tal de poder acomodar lipoproteínas de distinto tamaño. Por otra parte, el dominio LDL-A también está presente en diferente número de copias en toda la familia de receptores de LDL, entre los que también se incluyen las proteínas relacionadas al LDLr (familia LRP, del inglés LDLr related protein). En el caso del LDLr, el dominio LDL-A reconoce a la apolipoproteína B de la LDL, que no es una apolipoproteína intercambiable, pero también a la apolipoproteína E que si lo es. Este reconocimiento implica interacciones entre los residuos negativos del receptor y los aminoácidos positivos (principalmente Arg y Lis) de las apolipoproteínas^{434,436,437}. Además, en el caso del LRP1, la unión de la apolipoproteína E se favorecería por la interacción entre los motivos heparan sulfato que se encuentran en la superficie de diversos tipos celulares y residuos positivos en dicha apolipoproteína⁴³⁷⁻⁴³⁹. Dado que la LDL compitió con el EgAgB por la unión a las células y considernado las propiedades estructurales de las subunidades de EgAgB (cantidad importante de Arg y Lis en su secuencia) y regiones con potencial electrostático positivo, se examinó la eventual participación del LDLr o LRP1 en la interacción del EgAgB con macrófagos o monocitos. Además, como el EgAgB es capaz de unirse a motivos de heparina⁴⁴⁰ y se ha establecido la presencia de proteoglicanos (heparán sulfato) en los macrófagos THP-1 diferenciados con PMA, pero no en los monocitos THP-1⁴⁴¹, sería posible que el EgAgB estableciera contactos con estos motivos sobre la superficie de los macrófagos, potenciando su interacción y explicando la mayor capacidad de unión a los macrófagos. Sin embargo, los resultados de experimentos basados en la unión del EgAgB a macrófagos inflamatorios peritoneales derivados de ratones LDLrKO no mostraron la participación del LDLr en la unión. Por otra parte, el LRP-1 tampoco parecería ser relevante ya que no observamos competencia utilizando un exceso de lactoferrina, ligando de alta afinidad para este receptor. Por otro lado, como no se utilizaron macrófagos THP-1 en los ensayos de competencia con lactoferrina no se puede descartar que la unión del EgAgB a estas células involucre una interacción con los

motivos de heparan sulfato. Para analizar esta posibilidad se podrían realizar ensayos de unión empleando macrófagos THP-1 pre-tratados con heparinasas, como se ha descripto previamente⁴⁴².

Otros candidatos a unir el EgAgB son los receptores barrenderos o *scavenger* (SR, revisado por⁴⁴³) ya que se ha determinado su capacidad de unir lipoproteínas. Existen varios tipos de SR, que se clasifican en seis grupos, denominados A, B, D, E, F y G; de acuerdo a su estructura primaria, al tejido en que se expresan y/o a su posible función. En el contexto de la unión a lipoproteínas, los más estudiados son los SR de clase A (SR-A) y de clase B (SR-B1 y CD36). Dentro de los SR-A, se encuentran el SR-AI, SR-AII, SR-AIII y el receptor MARCO, con dominios de unión al ligando ricos en colágeno y expresión en varios tipos celulares, principalmente en células mieloides⁴⁴⁴. Por su lado, los receptores SR-B incluyen tres miembros, CD36, SR-BI y SR-BII, que poseen un dominio extracelular altamente glicosilado (relevante para el correcto plegamiento y para la transferencia de colesterol mediada por la HDL^{445,446}). Referente a su expresión, CD36 se presenta tanto en macrófagos como en plaquetas, adipocitos y algunas células epiteliales y endoteliales⁴⁴⁷. SR-BI se expresa en monocitos, macrófagos y células dendríticas, y también se encuentra sobre hepatocitos, tejido esteroidogénico y glándulas suprarrenales⁴⁴⁷. La expresión de SR-A y de CD36 aumenta durante la diferenciación de monocitos a macrófagos⁴⁴⁸, por lo cual el uso de estos receptores por el EgAgB podría explicar la mayor unión a estas últimas. En cuanto a las lipoproteínas que pueden unir, todos los receptores SR presentan una alta promiscuidad; pero se sabe que los receptores SR-A unen principalmente LDL modificada (oxidada o acetilada) mientras que los SR-B lipoproteínas nativas como HDL, LDL y VLDL. Una característica que sería común entre los ligandos de estos receptores es la presencia de regiones ricas en cargas negativas, por lo cual las subunidades de EqAgB podrían cumplir con este requerimiento de acuerdo a los modelos obtenidos in silico (Figura 6.1). En función de los aproximaciones experimentales logradas en este trabajo, los ensayos de unión competitiva utilizando un exceso ácido poli-inosínico, un ligando de alta afinidad por receptores de clase SR-A, no arrojaron evidencia a favor de la participación de ninguno de estos receptores en la unión del EgAgB a las células (al menos en experimentos con monocitos; este resultado podría confirmarse realizando experimentos de competencia con macrófagos THP-1 y células inflamatorias peritoneales). Con respecto al SR-B1 la HDL es su principal ligando y compitió por la unión del EgAgB a los monocitos. Además la capacidad del EqAqB de tomar colesterol de los macrófagos apoyaría su participación en esta interacción. Durante el desarrollo de este trabajo no se utilizaron otras estrategias metodológicas para estudiar su participación, como anticuerpos bloqueantes, células deficientes o métodos para regular la expresión del receptor. Es importante mencionar que este útimo tipo de estrategia no es sencilla de llevar a cabo en macrófagos. En base a la colaboración con el Dr. Julve se dispone actualmente de la fracción HDL₃, ligando de utilidad para los ensayos de competencia. Por otra parte, el desarrollo de un ensayo de unión basado en el uso de una proteína quimérica comercial de SR-B1 (fusionado a la porción Fc de inmunoglobulina de tipo IgG2 de ratón, R&D Systems) podría aportar información sobre la interacción del EgAgB con dicho receptor.

Apoyándonos en la constatación de que el EgAgB tiene el potencial para promover el eflujo de colesterol a partir de los macrófagos, debemos considerar también la posibilidad de que las proteínas pertenecientes a la familia de transportadores dependientes de ATP, denominadas ABC (del inglés *ATP-binding cassette*) actúen como blancos celulares del EgAgB ya que median el transporte de colesterol (entre otras moléculas) a través de membranas extra e intracelulares⁴⁴⁹ de diversos tipos de moléculas (revisado por⁴⁵⁰). De hecho, su acción junto con la del receptor SR-BI

es esencial para el control del nivel de colesterol en los tejidos periféricos⁴⁵¹. En particular, son los transportadores ABCA1 y ABCG1 los implicados en la interacción con la HDL y el transporte reverso de colesterol en los macrófagos^{209,452-459}. Existen diferencias en las propiedades de estos transportadores; el transportador ABCA1 interacciona directamente con la apoAI mediante el reconocimiento de distintos péptidos anfipáticos^{452,460}, contribuyendo al transporte reverso de colesterol hacia la apo-AI libre de lípidos. En cambio, el transportador ABCG1 cumple una función similar mediando el eflujo de colesterol hacia las partículas de HDL maduras⁴⁵². Por tanto, sería posible que más de un receptor pudiera participar en el contacto con el EgAgB según su composición al momento de tomar contacto con la célula. Corresponde mencionar que en un experimento preliminar de eflujo de colesterol en macrófagos J774 se observó que la presencia de AMPc tendió a aumentar la remoción de colesterol celular por el EgAgB. Como el AMPc aumenta la expresión del ABCA1 en macrófagos, esto indicaría que este receptor podría estar involucrado. Estos ensayos requieren repetición y verificar la asociación del tratamiento con AMPc con el aumento de la expresión de ABCA-1 en las condiciones experimentales utilizadas (midiendo su presencia en superficie por citometría de flujo).

La identificación del receptor es un punto que quedó pendiente en este trabajo. Para completar los estudios y contribuir a esta identificación hay varios caminos posibles. Primero, como ya se mencionó, hubiera sido útil realizar experimentos de competencia de la unión sobre macrófagos con todos los ligandos utilizados. Para esto es importante tener en cuenta que durante el último tiempo se ha esclerecido, tal como se describió en la introducción, la heterogeneidad que presenta la población de macrófagos, su orígen y propiedades funcionales varían notoriamente. En este escenario, las estrategias deberían considerar el análisis sobre poblaciones residentes o derivadas de reclutamiento de la sangre (por ejemplo LPM y SPM, respectivamente). El uso de BMDM como células primarias sería una alternativa útil y modelaría a los macrófagos derivados del reclutamiento desde la sangre. Adicionalmente, para verificar los resultados en monocitos podrían emplearse monocitos primarios, por ejemplo obtenidos a partir de sangre periférica.

Respecto a la identificación del receptor, corresponde mencionar que durante este trabajo se realizaron ensayos de inmunoprecipitación a partir de la incubación del EgAgB-B con extractos de macrófagos THP-1. Lamentablemente todos fueron infructuosos ya que arrojaron perfiles por SDS-PAGE muy complejos que no permitieron discriminar el/los interactor/es específicos. Para ahondar en la identificación sería útil tomar ventaja de los ensayos de eflujo de colesterol, apuntando a evaluar la participación de SR-B1 y ABCA1 en la interacción del EgAgB con los monocitos/macrófagos. En estos ensayos es posible alterar en forma selectiva el nivel de expresión/actividad de los mencionados receptores mediante estrategias de sobreexpresión, utilizando AMPc para la inducción de ABCA1 en J774A.1, o ligandos del receptor LXR (que regula los genes asociados con la biogénesis de HDL⁴⁶¹). En forma complementaria se podría inhibir la expresión por transfección con siRNAs específicos para cada receptor (estos ensayos no son sencillos porque requieren alcanzar una alta eficiencia de transfección para lograr que la inhibición se traduzca a nivel funcional). Alternativamente se podría alcanzar una inhibición por tratamiento con probucol (ABCA1)⁴⁶², ITX5061 (SR-B1)⁴⁶³ y/o anticuerpos bloqueantes (NB400, anti-SR-B1). Los ensayos funcionales planteados resultarían más sensibles e informativos que ensayos de unión.

Los resultados obtenidos en esta tesis apoyan el uso de receptores de lipoproteínas por el EgAgB para tomar colesterol de los macrófagos. Como mencionamos en el capítulo introductorio, la hidátide de E. granulosus no puede sintetizar colesterol de novo a partir de acetato o mevalonato, y, por tanto, debe incorporarlo del hospedero. Sin embargo, son escasos los trabajos de investigación referentes al tema, y, por tanto, el mecanismo por el cual el parásito logra captar este lípido esencial sigue sin establecerse. Nuestro trabajo da luz sobre el metabolismo lipídico de E. granulosus postulando al EgAgB como un componente capaz de cumplir la función de toma y transporte de colesterol a partir de los macrófagos presentes en la interfaz hospedero-parásito. Los transportadores ABCA, a diferencia de los receptores barrenderos, no son fagocíticos, y no promueven la internalización de las apolipoproteínas con las que interactúan, permitiendo que estas se carguen de ligandos, señalándolos como mejores candidatos para la adquisición de lípidos y su transporte hacia el parásito Finalmente al considerar el/los receptor/es responsable/s de la interacción del EgAgB con las células, no debemos perder de vista las funciones inflamatorias e inmunomoduladoras observadas para las preparaciones. El uso de receptores para lipoproteínas no iría en contra de estas actividades. En particular, se ha documentado que la interacción de las apolipoproteínas con SR-B1 y ABCA1 dispara diversas vías de señalización en los macrófagos con potencial anti-inflamatorio⁴⁶⁴⁻⁴⁶⁶. Este mecanismo se amplía más adelante en el marco de las funciones inmunomoduladoras del EgAgB.

Finalmente, los estudios mostraron que el EgAgB se uniría a las células por otro receptor y los ensayos funcionales sugieren que podría ser el TLR4, como se discute más adelante.

6.4. Avances en las propiedades biológicas del EgAgB

El conjunto de resultados obtenidos en este trabajo mostraron efectos antagónicos de las preparaciones de EgAgB sobre monocitos y macrófagos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Si bien el EgAgB fue capaz de activar *per se* estas células innatas, induciendo efectos de tipo proinflamatorio, redujo la activación inducida por el LPS, incluyendo principalmente la producción de mediadores pro-inflamatorios (tanto en cultivos celulares como *in vivo*) y, en menor medida, la expresión de moléculas involucradas en la presentación del antígeno a linfocitos T (sólo en los experimentos *in vivo*). En esta sección, en base a la bibliografía reciente, se discuten los mecanismos que podrían explicar estos efectos encontrados.

6.4.1. Sobre los efectos pro-inflamatorios observados en las preparaciones del EgAgB

En primer lugar es importante remarcar que en esta tesis comprobamos que, a pesar de que el proceso de purificación del EgAgB se realizó bajo condiciones que redujeron la posibilidad de contaminación bacteriana (uso de antibióticos en todas las soluciones) y el arrastre de pirógenos (uso de agua apirógena en todas las soluciones amortiguadoras), fue necesario sumar, a los pasos iniciales de fraccionamiento, un paso final de cromatografía de inmunoafinidad para obtener preparaciones de EgAgB nativo (EgAgB_{IP}) con bajos niveles de LPS, que variaron entre 0.09 y 0.02 ng LPS/µg de proteína. De acuerdo con la bibliografía³⁷⁴ y con la sensibilidad obtenida en nuestros ensayos, estos niveles permitían abordar los estudios propuestos trabajando a concentraciones entre 1 y 10 µg/mL de EgAgB, dependiendo de la preparación, pero no descartar la posibilidad de que los efectos pro-inflamatorios observados a concentraciones mayores a 1 µg/mI sean producto,

total o parcialmente, de la presencia de LPS. De hecho, una concentración de 20 µg/mL de EgAgB_{IP} indujo la secreción de IL-1β y mostró una tendencia al aumento en la secreción de IL-6, aunque ésta no alcanzó la significancia estadística. En base a estos resultados, en los ensayos con macrófagos THP-1 y BMDM se trabajó con concentraciones de EgAgB_{IP} de hasta 10 µg/mL que no promovieron per se niveles significativos de citoquinas pro-inflamatorias. Además todas las preparaciones utilizadas en los ensayos in vitro en in vivo mostraron valores de los índices para IL-1ß e IL-6 concordantes con niveles de LPS menores a 0.09 ng/µg de proteína (estos indicadores que se consideraron adecuados también para controlar la presencia de otros PAMPs o DAMPs). Por otra parte, la rEgAgB8/1 (subunidad con mayor representación en la partícula nativa) se comportó en forma similar al EgAgB_{IP} en los cultivos de macrófagos. Además, pese a ser producida en un sistema libre de LPS, mostró contener niveles de LPS similares a los determinados para el EqAgB_{IP}, lo cual también podría explicar sus efectos pro-inflamatorios (inducción de IL-1ß en THP-1 a 20 μ g/mL y tendencia al aumento de IL-1 β en THP-1 y de IL-12p40 en BMDM a 10 μ g/mL). De todas formas, llamó la atención que los niveles de LPS detectados en las preparaciones del EgAgB nativo y rEqAgB8/1 (menores a 0.1 ng/ µg de proteína) indujeran cierta activación de los macrófagos a 20 µg/mL, cuando paralelamente se observó que las preparaciones de EgAgB provocaron una clara y fuerte inhibición sobre los efectos inducidos por concentraciones más altas de LPS (10 ng/mL, Figura 5.12). Estos resultados contrastantes sugieren que parte de la actividad proinflamatoria de las preparaciones podría ser inducida por el EgAgB per se y/o por complejos de EgAgB-LPS.

Los efectos pro-inflamatorios de las preparaciones de EgAgB nativo y rEgAgB8/1 se hicieron más evidentes en los ensayos in vivo, donde se administraron por vía intraperitoneal a una dosis de 50 µg/ratón. Se observó que ambas formas del EgAgB promovieron per se un reclutamiento celular más rápido y de mayor magnitud que el LPS, el cual se sostuvo durante 24 horas. Este reclutamiento se asoció a la infiltración de células compatibles con neutrófilos y monocitos inflamatorios, (dentro de éstos principalmente los monocitos Ly6C⁺⁺MHC-II⁻ y Ly6C⁺MCH-II⁺). Además, ambas preparaciones de EgAgB provocaron un descenso en la población de los macrófagos residentes LPM, fenómeno observado cuando se inyecta un estímulo inflamatorio²⁵⁶ y que se evidenció al inocular LPS. En contraste con el reclutamiento celular, que fue más intenso que para el LPS a corto plazo (4 horas p.e.), la desaparición de los macrófagos residentes inducida por el EgAgB nativo, pero no por el rEgAgB8/1, fue de menor magnitud que la provocada por el LPS. Adicionalmente, se observó la inducción de la expresión de MHC-II y de las moléculas coestimuladoras por el EgAgB/rEgAgB8/1 en algunas poblaciones celulares. Todos estos efectos de tipo pro-inflamatorio podrían ser consecuencia de la presencia de los mencionados niveles de LPS en las preparaciones. Sin embargo, algunos resultados obtenidos no parecen estar de acuerdo con esta posibilidad. Primero se observaron dinámicas poblacionales diferenciales (resumidas en la Figura 5.41) tras la inoculación de EgAgB y de LPS, con reclutamiento más rápido de neutrófilos y monocitos Ly6C⁺⁺MHC-II⁻ por el EgAgB que se hicieron evidentes con la estimulación con LPS recién a las 24 horas p.e.. Como la máxima cantidad de LPS que pudo ser inyectado junto con las preparaciones sería del orden de 5 ng, parece difícil que esto explicara el mayor reclutamiento inducido por el EgAgB en relación al obtenido por la dosis de LPS de 15 µg (3000 veces mayor). Más aún, dado que el EgAgB mostró capacidad de modular algunos parámetros de la respuesta inducida por LPS in vivo, como ser la secreción de las citoquinas IL-6 e IL-12p40, se esperaría que logre contrarrestar también aquellos generados por las pequeñas cantidades de LPS presente en las preparaciones. Por otra parte llama la atención que el EgAgB haya provocado mayor infiltración

celular en el peritoneo, pero menor secreción de citoquinas (IL-6 e IL-12p40) que la administración de cantidades mayores (15 µg) de LPS en la cavidad peritoneal. Sería esperable que el reclutamiento y activación celular correlacionaran con aumento de citoquinas vasoactivas y quimiotácticas que resultan claves para la promoción de una respuesta inflamatoria. Por tanto, estas inconsistencias sugieren que **los efectos pro-inflamatorios en las preparaciones de EgAgB son producto de una actividad intrínseca o la presencia de complejos EgAgB-LPS que actúan sobre los macrófagos y/o otras poblaciones peritoneales.**

Corresponde mencionar que se buscó evidencia de la participación de trazas de LPS en la actividad pro-inflamatoria del EqAqB observada in vitro mediante el tratamiento con polimixina B, un péptido capaz de unir y bloquear la actividad del LPS. En estos ensayos no hubo reducción de la secreción de IL-1β inducida por el EgAgB en macrófagos THP-1, en concordancia con experimentos utilizando células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón (BMDCs, por sus siglas en inglés, informe de pasaje de maestría a doctorado de Sofía Lagos). Esto indicaría que la actividad proinflamatoria del EgAgB no se debe a la presencia de LPS. Sin embargo, en paralelo observamos que la forma nativa (y posiblemente también el rEgAgB8/1) es capaz de unirse fuertemente a matrices de agarosa-PB, por lo que no se puede descartar que el EgAgB compitiera con el LPS por la unión a la PB impidiendo observar el efecto inhibidor. Por otra parte, la similitud que mostró el EgAgB con el LPS planteó la posibilidad de que también lo mimetice en el ensayo LAL, basado en la actividad del lípido A de producir la coagulación de la hemolinfa de L. polvphemus^{467,468}. Vale la pena considerar que las concentraciones a las cuales se ensayó el EgAgB (µg/mL) fueron muy superiores a la concentración mínima de LPS que induce actividad (0.003 ng/ml). Interferencias de lipoproteínas plasmáticas en el LAL se han observado en ambos sentidos. Por un lado se describió que la presencia de lípidos aumenta su sensibilidad en la detección de LPS pero también que concentraciones altas de triglicéridos, quilomicrones y VLDL directamente pueden dar resultados positivos⁴⁶⁹ (aunque la ausencia de LPS en las preparaciones de lipoproteínas podría ser cuestionable). Adicionalmente, la detección de endotoxinas por LAL puede verse inhibida por componentes que unan el LPS (como la PB)⁴⁶⁷. Bajo estas consideraciones, no puede descartarse que el EgAgB interfiera con el ensayo LAL o conduzca a un resultado falso positivo.

Con respecto al efecto proinflamatorio de las preparaciones observado *in vivo*, cabe mencionar que si bien la identificación de los neutrófilos se basó en su complejidad celular y marcadores fenotípicos ampliamente aceptados (CD19⁻F480⁻Gr-1⁺⁺), bajo esta definición podrían co-existir diferentes fenotipos/tipos celulares. Esto es porque las células mieloides supresoras (MDSC, por sus siglas en inglés *myeloid-derived suppressor cells*) también expresan Gr-1 en superficie (Gr-1⁺) y podrían haber quedado incluidas en la misma región (gate). Se trata de una población celular heterogénea a nivel morfológico, fenotípico y funcional pero relacionada con actividades inmunosupresoras⁴⁷⁰, incluso reportadas en infecciones parasitarias^{471,472} (y revisado por⁴⁷³) y particularmente en la infección crónica por *E. granulosus*^{123,474,475}. Las MDSC consisten en dos grandes grupos de células denominadas PMN-MDSC (granulocíticas o polimorfonucleares) y M-MDSC (monocíticas) que son fenotípica y morfológicamente similares a los neutrófilos y monocitos, respectivamente. En el humano, las PMN-MDSC se han descrito como células CD11b⁺CD15⁺HLA-DR^{+/-}CD66b⁺ y las M-MDSC como CD11b⁺CD14⁺CD33⁺HLA-DR^{+/-} mientras que sus contrapartes en el ratón se definieron como células CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{+/-}y CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{+/-}, respectivamente. Sin embargo, estos marcadores también se expresan en subconjuntos de

monocitos y neutrófilos, así como en linajes de precursores hematopoyéticos más amplios⁴⁷⁶ limitando las posibilidades de identificación por criterios fenotípicos solamente. De hecho, su definición continua siendo investigada activamente¹²⁴. Se han propuesto marcadores adicionales como LOX-1 y S100A9 para refinar la identificación de PMN-MDSC y M-MDSC en humanos⁴⁷⁷, pero la gran heterogeneidad dentro de las MDSC⁴⁷⁸ ha complejizado su definición. Por otra parte, la naturaleza inmunosupresora que las caracteriza se ha utilizado como complemento para alcanzar una identificación, pero tampoco las distingue de las células mieloides convencionales con funciones inmunorreguladoras durante la inflamación. En este escenario, la identificación de las MDSC requiere un análisis múltiple, incluyendo sus vías de desarrollo, la expresión de moléculas de superficie, genes marcadores estables e inducibles y la especialización funcional¹²⁴. Así, a futuro sería interesante estudiar si la población Gr-1⁺ reclutada rápidamente por el EgAgB adquiere propiedades inmunosupresoras (tipo MDSC) que pudieran contribuir a modular la respuesta inducida por el LPS, particularmente la regulación observada sobre la secreción de citoquinas (disminución de IL-6 e IL-12p40 y aumento de IL-10). Tomando en cuenta lo descripto por Gabrilovich⁴⁷⁹, el marcado de superficie para CD11b e intracelular para iNOS, COX2, IDO, TGF-ß e IL-10 podría ser informativo con el objetivo de identificar la presencia de MDSC⁴⁷⁹ en aquellas células Gr-1⁺. Recientemente se han identificado factores encargados de impulsar fenotipos mieloides inmunosupresores sobre una variedad de células mieloides en respuesta a señales del microambiente tumoral. Por ejemplo, la quinasa reguladora GCN2 sesga los linajes mieloides, incluidos los macrófagos diferenciados, hacia un fenotipo más inmunosupresor⁴⁸⁰. De manera similar, se ha reportado que el regulador epigenético TET2, que media la desmetilación del ADN, se regula positivamente en las células mieloides en respuesta a la señalización a través del receptor de interleuquina-1 (IL-1R) para impulsar un fenotipo inmunosupresor tanto en macrófagos como en MDSC⁴⁸¹. Por tanto, estos datos muestran que los programas inmunosupresores abarcan amplios cambios metabólicos y epigenéticos en poblaciones celulares que no son específicamente "MDSC". En este escenario, las MDSC podrían entenderse como fenotipos adquiridos por diversos tipos de células mieloides en respuesta a señales específicas del tejido y factores inflamatorios, más que como poblaciones discretas, diferenciables del resto. De hecho, ha surgido una visión emergente de las MDSC como una faceta de la hematopoyesis de emergencia, que trabaja sobre la heterogeneidad y la plasticidad de las células mieloides en su conjunto, para promover fenotipos supresores. Esta visión también considera la fuerte influencia del microambiente tisular, las señales inflamatorias proximales y la inmunidad entrenada o la memoria innata en el establecimiento de estados supresores¹²⁴.

A la luz de los resultados obtenidos, **una mejor comprensión de los efectos pro-inflamatorios del EgAgB observados** *in vivo* **requiere experimentos adicionales**. Por un lado, sería importante analizar el efecto de la dosis EgAgB sobre la respuesta pro-inflamatoria (minimizando el posible aporte de LPS) y realizar una caracterización más profunda de las poblaciones celulares y los mediadores solubles presentes en cavidad peritoneal. El marcado intracelular de citoquinas podría ser una buena forma de detectar su presencia dado que no siempre alcanzan niveles detectables por ELISA (por ejemplo IL-1β). Esto haría posible al mismo tiempo identificar la/s población/es celular/es productora/s de las citoquinas. El uso de herramientas moleculares (análisis transcriptómico) podría brindar información valiosa pero no permitiría la distinción de la población en la última parte de la sección Resultados, la presencia y cuantificación de citoquinas relacionadas

con el reclutamiento celular y su atracción hacia los sitios de acción, como IL-1 β y TNF- α o IL-8 y MCP-1, respectivamente aportaría información útil para comprender los efectos observados.

Respecto al mecanismo involucrado en la actividad pro-inflamatoria del EgAgB, Sofía Lagos en su trabajo de maestría observó que el EgAgB nativo y el rEgAgB8/1 indujeron un aumento de IL-6 e IL-12p40 en BMDCs que se vieron reducidos por el uso de un inhibidor de la señalización de TLR4 (TAK-242) o utilizando BMDC deficientes en TLR4, indicando que estos efectos dependen en gran medida del receptor TLR4. Tal información sugiere que la interacción con el TLR4 del LPS, EgAgB, o complejos EqAqB-LPS presentes en las preparaciones podría activar vías de señalización intracelular ligadas a este receptor. La activación tendría como consecuencia la síntesis de mediadores pro-inflamatorios, aunque no necesariamente iguales en sus características e intensidad a los gatillados sólo por el LP, visualizado más claramente en los experimentos in vivo. Si bien estos resultados no fueron confirmados en macrófagos, una hipótesis razonable es que el EqAgB una en forma estable el LPS, y los complejos EgAgB-LPS formados medien señales de activación vía TLR4 en BMDM, además de en BMDCs. Lamentablemente los intentos de evaluar la interacción del EgAgB con el CD14 y TLR4 en esta tesis no fueron fructíferos debido a que los anticuerpos adquiridos produjeron señales de fluorescencia muy bajas (CD14) o directamente nulas (TRL4) en relación a los respectivos controles, dificultando la evaluación de los posibles efectos sobre la expresión de dichas moléculas en presencia de EgAgB y LPS (Material Suplementario S5.1).

En suma, la información generada no permite concluir sobre el origen de la actividad proinflamatoria observada en las preparaciones de EgAgB. La presencia de trazas de LPS, que no son removidas luego de sucesivos pasos de purificación (incluyendo cromatografía de inmunoafinidad) no parece explicar la magnitud de las respuestas observadas *in vitro* e *in vivo*. Esto sugiere el establecimiento de interacciones estables entre el EgAgB y el LPS que expliquen la retención o secuestro del LPS por el EgAgB, con consecuencias a nivel de las interacciones que ambas macromoléculas establecen con las células. La hipótesis de la formación de complejos estables entre el LPS y el EgAgB se discute a continuación.

6.4.2. Sobre la interacción del EgAgB con el LPS

Varias evidencias experimentales apoyan la idea de que el EgAgB une en forma estable al LPS. En primer lugar, se detectaron niveles similares (del mismo orden) de LPS en las preparaciones de EqAgB nativo y rEqAgB8/1, indicando que la presencia de LPS no puede atribuirse al material parasitario de partida, sino que es probable que derive de la retención de cantidades traza que probablemente están presentes a lo largo del proceso de purificación. Segundo, las preparaciones de EgAgB se obtuvieron luego de varios pasos de purificación, incluyendo cromatografías de intercambio iónico e inmunoafinidad que utilizan pasos de elución basados en la aplicación de condiciones disociantes con alta concentración salina y pH ácido. Por tanto, de estas observaciones se desprende que el LPS debe de tener una buena afinidad por el EgAgB para mantenerse unido aún bajo estas condiciones disociativas. Tercero, en experimentos de competencia por la unión a los macrófagos, se observó que el EgAgB fue capaz de inhibir la unión del LPS preferentemente cuando se co-incubó o se agregó antes del LPS, siendo mucho menor la inhibición cuando se agregó luego del LPS, y perdiéndose el efecto cuando el EgAgB se incubó y se eliminó de la fase soluble por centrifugación antes del agregado del LPS. Este último resultado proviene de un único experimento por lo cual requiere verificación. En cualquier caso, los resultados sugieren que el EgAgB es capaz de inhibir la unión del LPS a los macrófagos.

Además el hecho que la inhibición más eficiente ocurrió cuando el EgAgB se pre- o co-incubó con el LPS, hace suponer que compite desde la fase soluble por la unión a los receptores celulares.

En concordancia con la idea de que el EgAgB una al LPS, existen varios reportes sobre la capacidad de las lipoproteínas humanas de unir esta endotoxina. Por un lado, se ha reportado que, además de su capacidad para transferir el LPS a CD14, la LBP también puede transferir el LPS a las lipoproteínas. La LBP se encuentra físicamente asociada con lipoproteínas en el plasma y este complejo podría desempeñar un papel importante en la neutralización del LPS⁴⁸². Primero, existe evidencia de que la LBP en asociación con LDL y VLDL mejora fuertemente la capacidad de estas lipoproteínas para unirse a LPS y que ambos componentes cooperan en la reducción de las propiedades tóxicas generadas por esta endotoxina⁴⁸². Segundo, se observó que el suero de pacientes sépticos contenía niveles aumentados de LBP y un espectro de lipoproteínas marcadamente alterado, donde la mayoría de la LBP estaba asociada a LDL y VLDL, sugiriendo un papel crucial para los complejos LBP-LDL/VLDL circulantes en la eliminación del LPS⁴⁸³. Más recientemente, un conjunto importante de datos muestra que el LPS se une preferentemente a las partículas de HDL en relación con otras lipoproteínas^{484,485} (y revisado por⁴⁸⁶). La HDL mostró una mayor capacidad de unión del LPS y evidenció saturación a concentraciones de 200 µg/ml, condición que no fue alcanzada por la VLDL o LDL⁴⁸⁵. En línea con estas observaciones, ratones transgénicos que expresan la Apo A-I humana exhiben menores niveles de citoquinas tras la invección de LPS en comparación con los ratones control⁴⁸⁷. La interacción entre el LPS y la HDL es facilitada por la LBP y otras proteínas capaces de transferir lípidos^{488,489}, y el lípido A parece ser la región clave en esta interacción, aunque los mecanismos subyacentes a la asociación entre el LPS y la HDL siguen sin esclarecerse completamente⁴⁹⁰. En la neutralización, la LBP formaría un complejo con CD14 y el LPS, favoreciendo luego la unión del LPS a las partículas de HDL³²³ (y revisado por^{491,492}). Finalmente se describió que el intestino produce la subespecie de HDL llamada HDL₃⁴⁶¹, que a diferencia de la HDL₂, secuestra el LPS de forma eficiente impidiendo su unión al TLR4 presente en los macrófagos hepáticos. Considerando el tamaño de las partículas, el EgAgB tiene más similitud con la HDL₃ que con la HDL₂ (375 y Figura 5.9), por lo cual, si el tamaño es un factor importante para el establecimiento de las interacciones entre estas lipoproteínas y el LPS, el EgAgB cumpliría con este requisito. La neutralización de este PAMP bacteriano derivado del intestino a nivel del hígado resultaría relevante considerando que es uno de los órganos principales de establecimiento de la hidátide y es una idea novedosa no planteada para ninguna HLBP hasta el momento. Para confirmar la capacidad del EgAgB de unir LPS es necesario evaluar de forma directa esta interacción. Durante este trabajo se tomó ventaja de la herramienta de DLS; los resultados no fueron fácilmente interpretables pero arrojaron la idea de que el LPS podría ser incorporado a la partícula de EgAgB, probablemente sin modificar significativamente el volumen de la partícula (Figura 5.21). De todas maneras es necesario confirmar esta interacción, por ejemplo inmovilizando a cualquiera de ellos sobre placas de ELISA y revelando la unión con ligandos marcados (ensayos de este tipo se han realizado para la HDL₃⁴⁶¹). Adicionalmente podrían llevarse e cabo ensayos de adsorción del LPS al EgAgB, evaluando pre y post-adsorción si disminuye su potencial de estimular macrófagos. Otra alternativa es el análisis por interacción de resonancia de plasmones de superficie (biacore).

6.4.2. Efectos moduladores del EgAgB sobre células innatas

En los estudios realizados en esta tesis observamos que varios parámetros inflamatorios (citoquinas pro-inflamatorias, nitrito, moléculas co-estimuladoras y presentadoras de

antígeno) fueron regulados por el EgAgB en presencia de agonistas de TLRs (in vitro y/o in vivo). En particular, en ensayos utilizando LPS el EgAgB y rEgAgB8/1 mostraron efectos inhibitorios sobre los niveles de IL-1 β e IL-6 en macrófagos, que como se comentó podría asociarse a la neutralización del LPS o a una activación ineficiente del TLR4, considerando que por sí solo el EqAqB no indujo niveles significativos de IL-1β e IL-6 a las concentraciones ensayadas. En contraste, el EgAgB aumentó los niveles de IL-1β e IL-6 inducidos por Pam3CSK4 y Poly (I:C), agonistas de los receptores TLR1/TLR2 y TLR3, respectivamente. La potenciación de estas respuestas podría explicarse si el EgAgB fuera capaz de señalizar a través de otro PRR que reforzara las vías de activación inflamatorias, como por ejemplo el TLR4. La eventual activación de este receptor por el EgAgB podría potenciar los efectos del Pam3CSK4 al reforzar la señálización de la vía TIRAP/MyD88 e inducir la vía TRIF/TRAM, que no se encendería en presencia del Pam3CSK4³⁰⁴. En el caso del Poly (I:C) la activación del TLR4 por el EgAgB sumaría a la señalización por la vía TRIF/TRAM inducida por este agonista y promovería el encendido de la vía TIRAP/MyD88 (Figura 6.1). Por otro lado, el efecto potenciador podría ser consecuencia de la interacción entre la partícula de EgAgB y los agonistas facilitando el reconocimiento por sus correspondientes receptores. En este sentido, el EgAgB funcionaría como un carrier o transportador del ligando, que en el caso del Poly (I:C) contruibuiría a su endocitosis y posterior asociación con TLR3, receptor de localización endosomal.



Figura 6.1. Vías de señalización a través de los TLR. Las vías de señalización de los TLR consisten en dos principales cascadas según los adaptadores que contienen el dominio TIR, como MyD88 y TRIF. MyD88 media la activación de NF- κ B y la subsiguiente inducción de genes de citoquinas inflamatorias a través de todos TLR excepto TLR3. TRIF media la activación de IRF3 y NF- κ B dependiente de TLR3 y TLR4, y posterior inducción de IFN- β . En células dendríticas plasmacitoides (pDC), MyD88 también es responsable de la activación de IRF7 dependiente de TLR7 y TLR9 que conduce a la inducción de IFN- α/β . Adaptado de³⁰⁴.

A continuación se discuten los efectos moduladores del EgAgB sobre la respuesta inducida por el LPS que son los que fueron analizados en mayor profundidad.

6.4.2.1. Modulación de las respuestas inducidas por LPS

EL LPS es un agonista de PRRs que ha sido y sigue siendo tomado como modelo para el análisis de mecanismos de modulación de la inflamación por componentes de diverso origen, incluyendo parásitos. Estrictamente, no parecería ser el componente o motivo molecular óptimo para analizar dichos efectos, considerando que no es un PAMP presente en parásitos sino en bacterias gram-negativas. De hecho, en el marco de una infección por un cestodo no sería esperable la exposición ni secreción de motivos similares al LPS bacteriano. En este trabajo comenzamos utilizando LPS como modelo por los antecedentes sobre activación y modulación del EgAgB y pensando que DAMPs generados como consecuencia de la infección pueden ser reconocidos por el TLR4 (como por ejemplo hialuronano⁴⁹³). Más recientemente, y a la luz de la posible interacción entre el LPS y las lipoproteínas, pensamos que este agonista es un protagonista importante en el hígado. De hecho, la vena porta recoge el drenaje venoso del intestino, transportando al hígado nutrientes, metabolitos y componentes de origen propio así como derivados de la microbiota²⁸⁵. Por tal motivo, este órgano cuenta con mecanismos de tolerancia frente a PAMPs provenientes del intestino que inhiben la activación y actividad pro-inflamatoria de sus células, y el LPS no es la excepción⁴⁹⁴.

En este trabajo encontramos varios efectos moduladores del EgAgB sobre células mieloides. El análisis utilizando macrófagos humanos y murinos mostró que el EgAgB nativo y recombinante provocó una fuerte disminución de las respuestas inducidas por LPS a nivel de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1β, IL-6) y reguladoras de la activación celular (IFN-β e IL-12p40), así como también de la síntesis de NO[.] (Figuras 5.12, 5.16 y 5.17). La modulación de la respuesta de IL-6 e IL-12p40 a la estimulación con LPS también se observó in vivo, y en este caso pareció acompañarse de una potenciación de la IL-10 (Figura 5.23). Por otra parte, el EgAgB nativo, pese a inducir per se reclutamiento y activación celular in vivo, moduló la respuesta inducida por el LPS en términos de CD86 y CD40 en los macrófagos SPM (Figura 5.27) y de MHC-II en macrófagos LPM y monocitos Ly6C⁺⁺ (Figura 5.25 y 5.33, respectivamente). Estos últimos efectos, fueron mínimamente reproducidos por rEgAgB8/1 (Figuras 5.26, 5.28 y 5.34). La capacidad del EgAgB de modular in vivo la expresión de moléculas co-estimuladoras/presentadoras es un aporte a la comprensión de sus propiedades ya que hasta el momento esta propiedad sólo se había reportado empleando DCs y el LPS como estímulo *in vitro*⁹⁰. En dicho estudio, además, observaron que el EgAgB interfirió con la diferenciación de monocitos a DCs y sobre DCs maduras inhibió los niveles de IL-6 e IL-12p70 y potenció la IL-10 en respuesta al LPS. Los efectos inmunomoduladores del EgAgB observados en esta tesis corresponden a la partícula nativa mientras que los antecedentes mencionados utilizaron preparaciones desnaturalizadas, lo cual sugiere que la porción proteica vuelve a adoptar una conformación funcionalmente activa tras la desnaturalización. En base a que rEgAgB8/1 reprodujo varios de los efectos moduladores de la partícula nativa (principalmente sobre las citoquinas y el NO·), EgAgB8/1 sería un componente proteico relevante en estas actividades. Más aún, la porción lipídica del EgAgB nativo por sí misma contribuiría, al menos en parte, a los efectos moduladores observados (Figura 5.13) y no sólo a la exposición de las subunidades proteicas en la lipoproteína y la generación de entornos favorables para su interacción con las células (Capítulo 4 de Resultados). Considerando la composición lipídica diferencial entre las formas nativa y recombinante, y el espectro restringido descripto para esta última, cobra interés la comparación de los efectos moduladores de ambas porciones lipídicas.

En cuanto a los mecanismos asociados a la modulación, como resultado de este trabajo surge la hipótesis que el EgAgB une al LPS en el medio extracelular, secuestrándolo y neutralizando su acción sobre las células, lo cual protegería al parásito de la inflamación y sus efectos nocivos. En el contexto de la infección natural, esta neutralización reproduciría el mecanismo fisiológico por el cual la HDL₃ producida a nivel intestinal protege al hígado de la inflamación y la fibrosis (observaciones en una variedad de modelos murinos de lesión hepática⁴⁶¹). En el caso de la HDL esta función no es despreciable; de hecho, la administración de un fármaco oral dirigido al factor de transcripción del receptor X del hígado (LXR), el principal regulador de los genes asociados con la biogénesis de HDL, elevó los niveles de HDL entérica y protegió a los ratones de la patología hepática⁴⁶¹. Adicionalmente, esta protección se perdió si los ratones no expresaban HDL de origen entérico. Corresponde mencionar que el papel barrendero extracelular de la HDL se extendería a otros PAMPs bacterianos. Por ejemplo, el ácido lipoteicoico (LTA) presente en las bacterias gram positivas, también es capaz de asociarse con lipoproteínas de forma muy similar al LPS (revisado por⁴⁸⁶) y aparentemente con mayor afinidad⁴⁹⁵. Además, en concordancia con la idea de la neutralización de PAMPs, se ha demostrado que la HDL puede inhibir la activación de macrófagos en cultivo inducida por LPS o LTA⁴⁹⁴. No conocemos qué concentración puede alcanzar el EgAgB en el tejido que rodea a la hidátide, ni cómo puede variar a lo largo de la infección, pero es altamente probable que sea inferior (2 órdenes de magnitud) a la HDL₃ en el hígado (estimamos 1 orden de magnitud menor que en el plasma³⁸⁷).

Si la neutralización del LPS por el EgAgB explicara el conjunto de los efectos observados, deberían afectarse todas las respuestas derivadas de la activación del TLR4/MD2, tanto por la vía MyD88/TIRAP como por la vía de TRIF/TRAM (asociada a la endocitosis de este receptor, Figura 6.1 A). Dentro de las consecuencias de la activación del TLR4, la vía MyD88/TIRAP induce la expresión de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, TNF- α y de la NOS2, principalmente a través de la activación de NF- κ B, mientras que la vía TRIF/TRAM activa el factor regulador IRF3, esencial para la expresión de IFN- β y potenciación de la producción de NO· así como también refuerza de forma retardada la activación de NF- κ B para la síntesis y liberación de los mediadores inflamatorios mencionados⁴⁹⁶⁻⁵⁰². Considerando los resultados obtenidos en este trabajo, el EgAgB redujo los niveles de citoquinas (IL-6, IL-1 β ^{#6}, IL-12p40) y de NO· inducidos por LPS en macróafsgos por lo que en principio las dos vías de activación mencionadas podrían estar siendo afectadas, dado que ambas activan NF- κ B (aunque MyD88/TIRAP sería más relevante en la inducción de las citoquinas). Además, la inhibición de la secreción de IFN- β observada en THP-1, Ileva a postular que en estos macrófagos el EgAgB interfiere sobre la vía de TRIF/TRAM. Si esto se cumpliera también en las

^{#6} Los efectos sobre la IL-1β se detectaron solamente en macrófagos THP-1. La secreción de esta citoquina requiere la maduración de la proteína mediada por la activación de la caspasa-1 dependiente del inflamasoma. A diferencia de lo que sucede en las BMDM, en las THP-1 no es necesaria la estimulación con agonistas de NLRs además del LPS para lograr esta maduración; aunque el mecanismo molecular involucrado sigue siendo un tema de debate.

BMDM, la disminución en la producción de IFN-β también podría contribuir a la menor producción de NO· registrada. Por tanto, la neutralización podría explicar el conjunto de estas observaciones. En contraste, la neutralización del LPS por el EgAgB no explicaría la ausencia de modulación de la expresión de las moléculas coestimuladoras CD86 y CD40 inducida por el LPS, ya que su expresión depende de NF-KB y es notoriamente amplificada en los macrófagos por la vía TRIF/TRAM^{335,337,498,501}, de forma dependiente de la activación de STAT1 por IFN-B (efecto autócrino)⁵⁰³. Esto sugiere la existencia de algún mecanismo adicional al neutralizante y compensatorio (señalización por otro receptor no identificado, Figura 6.1 D) que enmascare la pérdida de señalización por la vía TRIF/TRAM. Similarmente en BMDCs, Sofía Lagos observó que las preparaciones de EgAgB poseen un fuerte efecto inhibitorio sobre la secreción inducida por LPS de citoquinas mayormente dependientes de la vía MyD88/TIRAP (IL-6 e IL-12p40) como de la vía de TRIF/TRAM (IFN- β), pero no una clara modulación de la expresión CD86 y CD40. En estas células también se observó que el EgAgB provocó una reducción parcial de la dimerización/endocitosis del TLR4 mediada por LPS, que inhibiría la señalización, compatible con la hipótesis del efecto neutralizante que proponemos que ocurre en los macrófagos. Los complejos EgAgB-LPS generados como consecuencia de la neutralización serían pobres activadores del TLR4 (Figura 6.1 B) y no se puede descartar que promuevan algún efecto proinflamatorio per se sobre las células. Una hipótesis alternativa es que la formación de estos complejos conduzca a una más rápida internalización del TLR4, disminuyendo la activación de NF- κ B inducida por el LPS, y por tanto la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias y la generación de NO \cdot . Un mecanismo de este tipo ha sido descripto para la anexina 2⁵⁰⁴.

Aún cuando se determine que el EgAgB, al igual que otras lipoproteínas plasmáticas, puede unir LPS ciertos efectos inmunomoduladores no parecerían explicarse por su papel como barrendero soluble. En particular, no se explicarían los efectos inhibitorios del EgAgB sobre la quimiotaxis de neutrófilos dirigida por C5a/PFA¹⁸³ y de monocitos por MCP-1/CCL-2²⁰³ ya que estos péptidos quimioatrayentes no comparten en principio las características de los ligandos hidrofóbicos del EgAgB. En el caso del efecto inhibitorio sobre el estallido respiratorio de neutrófilos precondicionados con PAF y estimulados con PMA⁷⁴, no se podría descartar el secuestro del PMA si se une al EgAgB a través de su cadena carbonada. **Los efectos moduladores que no son claramente asociados al posible papel como molécula barrendera, podrían ser consecuencia de la interacción con otros receptores celulares lo cual se apoya en la capacidad de unión específica a monocitos y macrófagos. En particular estos receptores podrían estar asociados al eflujo de colesterol mediado por el EgAgB (nativo y recombinante), de acuerdo a los resultados obtenidos en macrófagos THP-1 y J774. La remoción de colesterol celular podría afectar la composición de las balsas lipídicas (ensamblajes de esfingolípidos saturados, colesterol y proteínas^{#7}) que conforman plataformas con relevancia funcional a nivel del tráfico de membrana y**

^{#7} Las balsas lipídicas o *lipid rafts* se ensamblan preferencialmente por interacciones entre el colesterol y las cadenas acilo largas y saturadas de los esfingolípidos, y también por la capacidad de los esfingolípidos para establecer enlaces de hidrógeno intermoleculares^{519–521}. La composición de la membrana plasmática es mucho más compleja y multiforme ya que las interacciones lípido-lípido, lípido-proteína y proteína-proteína también participan en la formación de estos dominios, facilitando su agrupación en plataformas funcionales más estables y con bioactividad selectiva^{522–524}.

de la señalización de diferentes grupo de receptores, incluyendo aquellos involucrados en el reconocimiento de PAMPs y citoquinas (revisado por⁵⁰⁵⁻⁵⁰⁷). En particular, se conoce que cambios a nivel del colesterol y los esfingolípidos resultan en alteraciones en la señalización gatillada por el LPS vía TLR4. Por ejemplo, la extracción o el secuestro de colesterol (con ciclodextrina o nistatina) induce cambios en la agrupación del TLR4 y de proteínas accesorias en las balsas lipídicas que resultan en la inhibición de la producción de TNF- α inducida por LPS en macrófagos⁵⁰⁸. Además, el eflujo de colesterol celular orquestado por la HDL tiene consecuencias supresoras de la activación, afectando directamente las vías de señalización dependientes de MyD88/TIRAP y TRIF/TRAM asociadas a la activación del TLR4⁵⁰⁹ (y revisado por⁵¹⁰). En macrófagos y DCs la toma de colesterol altera su nivel en las balsas lipídicas, interfiriendo con la activación por TLRs y la capacidad presentadora de antígeno^{464,511–513}. Por otro lado la interacción con receptores asociados al eflujo de colesterol (SR-B1, ABCA1 y ABCG1) podría promover mecanismos anti-inflamatorios⁴⁶⁴⁻⁴⁶⁶. Por ejemplo, en macrófagos SR-B1 activa Akt y reduce la activación de NF-ƙB, incrementando la producción de citoquinas anti-inflamatorias (IL-10/TGF-beta)⁴⁴⁶. En suma sería posible que la adquisición de colesterol celular llevada a cabo por el EgAgB afecte las balsas lipídicas y la señalización por el TLR4 e imprima simultáneamente señales anti-inflamatorias o inmunomoduladoras en células innatas, posiblemente mediante los transportadores ABC mencionados (Figura 6.1 C).



Figura 6.1. Posibles mecanismos involucrados en la modulación del EgAgB sobre la activación del TLR4 inducida por LPS. El EgAgB podría actuar como una lipoproteína barrendera uniendo al LPS a través del lípido A (dada su naturaleza hidrofóbica) e interferir -al menos parcialmente- con la interacción entre el LPS y el TLR4, reduciendo la producción de mediadores solubles (A). Esta idea no descarta la posibilidad de que la interacción entre el EgAgB y el LPS (complejos) modifique la interacción con el TLR4, interfiriendo/modificando la dimerización y llevando a una pobre señalización (B). Ambos mecanismos, que

no son excluyentes, podrían potencialmente explicar la inhibición de la producción de citoquinas proinflamatorias y moduladoras inducida por el LPS sobre macrófagos. La toma de colesterol que promueve el EgAgB de los macrófagos, posiblemente asociada a la unión con los receptores ABCA1/ABCG1/SR-B1, podría alterar la composición de las balsas lipídicas (bicapa lipídica en verde) afectando la activación de distintos receptores celulares incluyendo el TLR4 (C). El contacto del EgAgB con receptores celulares adicionales a los mencionados podría encender vías intracelulares que contribuyan a sostener la expresión de CD86 y CD40 en superficie (D).

En relación a la capacidad del EgAgB de inducir mecanismos anti-inflamatorios, en los experimentos in vivo se constató que potenció los niveles de IL-10 inducidos en respuesta al LPS, (este efecto no se detectó in vitro). Resultados previos del grupo mostraron que el EgAgB potenció la producción de IL-10 por macrófagos THP-1 en presencia de la proteína C reactiva (PCR), un componente sérico de fase aguda que resulta aumentado en condiciones de inflamación. Se determinó que el EgAgB es capaz de unirse a la PCR, de forma análoga a otras lipoproteínas ricas en PC, y con alta afinidad, lo que significa podrían formar complejos incluso a bajas concentraciones de ambas proteínas. La formación de este complejo alteró las propiedades moduladoras del EgAgB sobre macrófagos, atenuando su capacidad de reducir los niveles de IL-1ß pero aumentando, como se mencionó, los de IL-10, lo que sugiere que la unión de la PCR a un ligando específico, como el EgAgB, puede afectar la activación de los macrófagos. La inducción de la PCR durante la infección por CE podría, por tanto, influir en las interacciones entre el EgAgB y los macrófagos a través de la promoción de la secreción de IL-10 que contribuya a resolver la inflamación. Por tanto, más allá de las funciones moduladoras que el EgAgB induce per se, otros actores de la respuesta inmune en el contexto de la infección podrían indirectamente influenciar sus acciones sobre las células del hospedero presente en la interfaz con el parásito.

6.5. Conclusiones y principales comentarios del trabajo

En conjunto, en esta tesis logramos generar un conjunto de herramientas y metodologías que permiten continuar con el estudio de las propiedades bioquímicas y biológicas del EgAgB. Además, describimos algunos efectos novedosos del EgAgB nativo sobre la activación inflamatoria y el metabolismo lipídico de los monocitos/macrófagos que podrían estar relacionados, y contribuir en alguna medida a la adaptación de la hidátide a su hospedero.

En primer lugar, se alcanzó una comprensión más detallada de la composición proteica y lipídica del EgAgB producido por la larva y volcado al LH, que resulta valiosa para la comprensión de sus propiedades. Confirmamos que el EgAgB8/1 es la subunidad predominante en el EgAgB nativo del LH proveniente del hidátides bovinas (genotipos G1/G3/G5) y suinas (genotipo G7) de *E. granulosus* s.l, y además que esta predominancia se mantiene más allá de la fertilidad de la hidátide. Dicha información fue valiosa a la hora de diseñar una lipoproteína que modele al EgAgB nativo, expresando una de sus subunidades proteicas en células de insecto. Además, confirmamos la ausencia de la subunidad EgAgB8/2 en el genotipo G7 de *E. canadensis*. Dado el valor de EgAgB8/2 para el diagnóstico de CE humana, nuestros hallazgos indican que su uso como antígeno en inmunoensayos podría contribuir a resultados falsos negativos en áreas donde *E.*

canadensis circula. Más aún, la presencia de anticuerpos anti-EgAgB8/2 en suero puede representar un parámetro útil para descartar la infección por dicha especie. A nivel de la composición lipídica, los estudios describieron una amplia heterogeneidad de lípidos neutros y polares presentes en la partícula nativa que no se apreció en la partícula recombinante.

En lo que respecta a las propiedades funcionales, los resultados obtenidos refuerzan la hipótesis de que esta lipoproteína parasitaria es mucho más que un antígeno inmunodominante, cumpliendo un papel probablemente relevante en la biología de E. granulosus. Por un lado, es posible que actúe como una proteína barrendera, limitando la inflamación promovida por el LPS y, quizás por otros PAMPs de naturaleza hidrofóbica presentes en el sitio de la infección. Como el hígado es el principal órgano de localización de la hidátide, y hay un arrastre/trasporte en condiciones fisiológicas de componentes bacterianos desde el intestino al hígado (vía vena porta), esta acción neutralizante podría no ser despreciable. Además de su acción barredera, se encontró que el EgAgB es potencialmente capaz de eflujar colesterol de los macrófagos -lípido esencial para el parásito- lo cual no sólo vincula este antígeno parasitario al metabolismo lipídico del hospedero, sino que también plantea la posibilidad de que parte de sus efectos inmnomoduladores deriven de alteraciones en las balsas lipídicas y/o señalización por receptores celulares involucrados en el eflujo de colesterol. Asimismo, la liberación de lípidos del EgAgB tras su interacción y/o internalización por los monocitos/macrófagos es otro factor que puede sumar complejidad a la comprensión de sus efectos sobre la activación celular, ya que la composición lipídica podría variar notoriamente en el EgAgB nativo según el estadio, edad, vitalidad y/o fertilidad del parásito y las características del hospedero (especie, edad, inmunocompetencia, entre otros factores). Si bien la complejidad puede ser muy grande, algunas interrogantes sobre los mecanismos asociados a los efectos podrán examinarse mejor en la medida que se logren dilucidar qué receptores celulares son blanco del EgAgB. Con este fin, surgen como estrategias más claras ensayos con células TLR4 KO y el uso de métodos de modulación de la expresión de los candidatos a receptor más interesantes (por ejemplo, SR-BI y los transportadores ABC).

Las propiedades del EgAgB descriptas en esta tesis provienen de la lipoproteína derivada del LH, pero a nivel del desarrollo de la CE no debemos de perder de vista que el EgAgB se expresa también en la oncósfera y el PE, por lo cual estas propiedades podrían ser relevantes tanto para la hidátide establecida como para las formas infectivas durante la fase de pre-enquistamiento, lo cual contribuiría a favorecer el establecimiento del parásito (Figura 6.2). Su acción temprana durante la fase previa a la diferenciación en una hidátide miniatura con capa laminar podría ser más factible; es razonable suponer que el EgAgB pueda ser secretado por el tegumento que es similar a la capa germinativa y carece de una capa laminar que atravesar. Su acción temprana también sería relevante considerando el desarrollo de la respuesta infamatoria inicial que podría perjudicar la viabilidad parasitaria en ausencia de control. Cualquiera sea el escenario, aún no conocemos cómo el EqAgB alcanza la interfaz con el hospedero, pero el desarrollo de una respuesta de anticuerpos específica en el hospedero indica que en algún punto esto sucede. Tampoco podemos estimar que concentración de EgAgB se podría alcanzar localmente en la interfaz. Por otra parte, pensando en su papel de transportador lipídico, el EgAgB debería tomar contacto con las células del hospedero que suministren los lípidos esenciales (tráfico de ida), para luego de esa interacción retornar a las estructuras parasitarias a volcar los lípidos adquiridos (tráfico de vuelta). El "tráfico de ida" podría involucrar la transcitosis del EgAgB, tal como ocurre para la HDL a través del receptor SR-B1 en células endoteliales⁴⁴⁶, y/o el transporte via exosomas, dado que se detectó EgAgB en vesículas

extracelulares del LH¹⁴⁵, aunque no en exosomas secretados por hidátides⁵¹⁴ o presentes en el plasma de pacientes con CE⁵¹⁵. Por otro lado, el "tráfico de vuelta" podría implicar que el EgAgB cediera los lípidos al tegumento o la CG (cara exofacial de la bicapa), por un mecanismo independiente⁵¹⁶ o dependiente de transportadores (aún no-identificados). Eventualmente podría ceder los lípidos a lipoproteínas plasmáticas, por ejemplo la HDL, las cuales alcanzan el interior de la hidátide de alguna manera ya que se ha identificado a la la Apo-AI en el LH (esta tesis³⁸² y otros grupos^{40,210}). Una vez dentro de la hidátide el EgAgB o las lipoproteínas plasmáticas podrían ceder el colesterol a células del parásito.

El desarrollo de la forma recombinante EgAgB8/1 expresada en células de insecto representa un aporte importante de esta tesis. Por un lado, es una alternativa para el avance de los estudios dada las limitaciones para obtener material parasitario. Por otro, funcionalmente mostró similitudes con el EgAgB nativo ya que reprodujo varios efectos moduladores (inhibición de la producción de citoquinas pro-inflamatorias y de NO· inducida por el LPS) y la capacidad de remover colesterol de los macrófagos. De todos modos existieron algunas diferencias en el comportamiento respecto a la partícula nativa (principalmente observadas en los experimentos in vivo) posiblemente como consecuencia de su mayor tamaño y/o composición proteica y lipídica diferencial. De existir liberación de lípidos con propiedades moduladoras, las diferencias descriptas en los componentes hidrofóbicos presentes en rEgAgB8/1 podrían explicar que no reprodujera ciertas actividades de la partícula nativa. Por otra parte, la comparación de los efectos promovidos por formas recombinantes en relación a la nativa podrá aportar también a establecer la relación entre los componentes del EgAgB y su actividad. En este sentido resulta interesante estudiar a futuro el comportamiento de lipoproteínas generadas a partir de la expresión del EgAgB8/3, que mostró el mayor índice de unión a macrófagos, y del EgAgB8/2 o EgAgB8/4, con menor similitud a las subunidades EgAgB8/1 y EgAgB8/3.

Globalmente, los resultados de esta tesis aportan al conocimiento de la composición y funciones del EgAgB de *E. granulosus* s.l. y de las HLBPs en general, apoyando la hipótesis de que el EgAgB cumple un rol metabólico e inmunorregulador.



Figura 1.13. Posible papel del EgAgB durante el desarrollo de la hidátide de E. granulosus. La presencia de anticuerpos anti-EqAqB demuestra que este componente parasitario logra alcanzar la interfaz con el hospedero durante la infección larvaria, hecho que podría ocurrir tanto en la fase previa o posterior al enquistamiento. Allí podría actuar como proteína barrendera, uniéndose al LPS y quizás otros PAMPs de naturaleza hidrofóbica presentes en el hígado, limitando la inflamación que promueven que resultaría nociva para el parásito. La interacción del EgAgB con células del sistema inmune, como los monocitos y macrófagos, podría dar lugar a la generación de fenotipos anti-inflamatorios/inmunomoduladores por el contacto con receptores que transduzcan señales de apagado de la inflamación, por alteración de las balsas lipídicas como consecuencia de la toma de colesterol o eventualmente por transferencia de lípidos moduladores. Adicionalmente, en la interfaz con el hospedero la toma de lípidos podría lograrse por la interacción del EgAgB con lipoproteínas plasmáticas. Este último mecanismo podría tener lugar también en el interior de la hidátide, con la posterior transferencia de los lípidos adquiridos a la CG, posiblemente a través de receptores similares a los de las lipoproteínas de mamíferos (receptor violeta). En paralelo, las lipoproteínas plasmáticas presentes en el LH podrían transferir directamente los lípidos a la hidátide a través de receptores (receptor naranja). La transferencia de los lípidos adquiridos por el EgAgB a la hidátide requeriría el contacto con posibles receptores en la CG o la existencia de un transporte reverso, todos mecanismos hipotéticos.

ANEXOS

ANEXO - Capítulo 2



В

С





Figura S2.1. (A) Esquema del vector pINQ-H6HA y secuencia proteica del VHH anti-EgAgB8/1. Se observa el fragmento stuffer flanqueado por sitios Sfil entre los cuales posteriormente se clonaran los VHHs. Se destaca la presencia de las etiquetas 6His y HA corriente abajo del fragmento stuffer, la secuencia OmpA responsable de la exportación del VHH al periplasma y la resistencia a kanamicina que presenta el vector. La expresión del VHH se encuentra regulada por el promotor T7 inducible con IPTG. (B) Secuencia aminoacídica de los CDRs y FRs del clon 1 del VHH anti-EgAgB8/1. (C) Análisis por SDS-PAGE y Western blot (utilizando medio del hibridoma de ratón conteniendo el anticuerpo monoclonal Mo-EB7 y revelando con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa) de la fracción eluída tras la purificación de EgAgB a partir de LH, donde Alvez y colaboradores³⁶⁸ comprobaron la especificidad de la columna de Sefarosa-VHH anti-EgAgB8/1.



Figura S2.2. Esquema del vector pTM/BiP/V5-His modificado. Vector disponible en el Laboratorio de Inmunovirología del Instituto Pasteur de Montevideo utilizado para la expresión de rEgAgB8/1 en *D. melanogaster.*



Figura S2.4. Comparación del grado de biotinilación de las preparaciones de EgAgB y de la OVA. Las proteínas biotiniladas se adsorbieron en microplacas de ELISA en una amplia gama de concentraciones y la presencia de biotina se determinó usando estreptavidina-peroxidasa y TMB/H₂O₂ para el desarrollo de color. Se grafica la Abs₄₅₀ (corregida por la Abs₅₆₀) en función de la concentración de proteína biotinilada (µg/mL). (A) Comparación del grado de biotinilación entre OVA y EgAgB nativo. B) Comparación del grado de biotinilación entre las subunidades rEgAgB8. Los datos se expresan como el promedio ± SEM de triplicados analíticos.

Material suplementario S2.4

Productos proteicos putativos de E. canadensis AgB2

La secuencia de nucleótidos de AgB2 (ECANG7_10984) se obtuvo del genoma de *E. canadensis* disponible en http://parasite.wormbase.org.

Los productos putativos de ECANG7_10984 se predijeron utilizando la herramienta de traducción Expasy (http://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna_aa). Dado que ECANG7_10984 contenía una sustitución en el sitio de empalme (GT-TG en lugar de GT-AG), la traducción de los productos proteicos se realizó considerando dos posibilidades: 1- utilizando el par de empalme TG-GT no canónico, 2- utilizando un dinucleótido AG presente en el segundo exón como sitio aceptor de empalme. Los productos proteicos previstos se enumeran a continuación:

1- Utilizando el par de empalme TG-GT no canónico

5'3'	Marco <u>1</u>
MetRTYILLSLALVAFVAVVQA	
KDEPERCKCLITRKLSELRDFFRSDPLGQRLVALG	RDLTAICQKLHLKIHEVLKKYVKDLLEEEEEDDSK Stop
5'3'	Marco 2
StopGPTSFSLLLSWLSWPSFKLKMetSPRDASA	SStopRGNStopANFETSLEVIHWVKDLLLLAGTStopLPSARSCI
StopRFTKCStopRNMetSRICWKKKKKRMetIQ	S
5'3'	Marco 3
EDLHPSLSCSRGFRGRRSS Stop R Stop ARE	QVPHNEEIERTSRLLStopKStopSTGSKTCCSWQGPDCHLPEAA
FEDSRSVEEICQGFVGRRRRRG Stop FKV	· · ·
	Maura
	MARCO I IGSOVPAKSNKSI TOWITSKEVSKEAOEPRYEALASI GLIESI NDG
HESHESKREKDVGPH	
3'5'	
SI AStonTTATKATRARERR MetStonVI	1etAVRSLPRATSLStopPSGSLLKKSKSSLNFLVMetRnLnLSGS
<u>3'5'</u>	Marco 3
TLNHPLLLLLPTNP Stop HISSTLRESSNAASGRW	QSGPCQEQQVFDPVDHF Stop RSLEVRSISSL Stop GTCISRAHL
StopLERRERRERLQLREGCRSS	
2- Utilizando un dinucleótido AG presente	en el segundo exón como sitio aceptor de empalme
	5
5'3'	Marco 1
MetrIYILLSLALVAFVAVVQAStopAREMetQVP SPSVEEICOGEVGPPPPGStopEKV	HNEEIER I SRLL Stop K Stop S I GSK I CCSWQGPDCHLPEAAFED
SKSVELICQGI VGKKKKKG Stop i KV	
<u>5'3'</u>	Marco 2
StopGPTSFSLLLSWLSWPSFKHEPERCKCLITRK	LSELRDFFRSDPLGQRLVALGRDLTAICQKLHLKIHEVLKKYVKDL
LEEEEEDDSK Stop	
5'3'	Marco 3
EDLHPSLSCSRGFRGRRSSMetSPRDASASStop	RGN Stop ANFETSLEVIHWVKDLLLLAGT Stop LPSARSCI Stop R
FTKC Stop RN Met SRICWKKKKKR Met IQS	
2151	Marco 1
<u>5 5</u> 11 Stop III FEFEFOOILDIELOHEVNLO Met OLLAC	
RKPREQEREGCRSS	
CINDGHESHESKREKDVGPH	TELAVKOLPKATOLOOPPOGOLLKKOKOSOLINELVMETRHLHLOGO

<u>3'5' Marco</u> <u>3</u> TLNHPLLLLLPTNP**Stop**HISSTLRESSNAASGRWQSGPCQEQQVFDPVDHF**Stop**RSLEVRSISSL**Stop**GTCISRAHA **Stop**TTATKATRARERR**MetStop**VL

Los marcos abiertos de lectura se muestran en gris.

ANEXO - Capítulo 3

Tabla S3.1. Caracterización proteómica de bQS_f y sQS_f por 2D-electroforesis y MALDI-TOF/TOF. Se analizaron las fracciones bQS_f y sQS_f por 2D-electroforesis utilizando un gradiente 3-10 de pH lineal en la primera dimensión y SDS-PAGE en 15% de acrilamida en la segunda dimensión, y realizando tinción con Coomassie coloidal para visualizar las proteínas. Se presentan las proteínas identificadas en cada spot ilustrado en los geles bidimensionales de la Figura 3.6 (contorno fino y contorno grueso) para bQS_f (A) y sQS_f (B) junto con el puntaje, el número de péptidos y el porcentaje de cobertura (% cobertura) que hicieron posible su identificación.

Α

Spot	Proteina	Puntaje	N° peptidos	Cobertura (%)
1	EgAgB8/2 [E. granulosus]	154	3	39
T	EgAgB8/1 [E. granulosus]	126	3	26
2	EgAgB8/1 [E. granulosus]	125	4	34
2	EgAgB8/2 [E. granulosus]	98	2	28
3	EgAgB8/1 [E. granulosus]	125	4	34
4	EgAgB8/1 [E. granulosus]	137	4	34
5	EgAgB8/1 [E. granulosus]	133	5	43
6	EgAgB8/4 [E. granulosus]	235	5	64
0	EgAgB8/1 [E. granulosus]	107	3	31
7	EgAgB8/4 [E. granulosus]	155	4	56
/	EgAgB8/1 [E. granulosus]	146	4	34
8	EgAgB8/1 [E. granulosus]	154	4	34
0	EgAgB8/4 [E. granulosus]	259	5	64
9	EgAgB8/1 [E. granulosus]	102	3	31
10	EgAgB8/1 [E. granulosus]	148	4	34
11	EgAgB8/1 [E. granulosus]	97	3	26
12	EgAgB8/1 [E. granulosus]	112	3	26
13	EgAgB8/1 [E. granulosus]	137	4	34
14	EgAgB8/1 [E. granulosus]	134	4	34
14	EgAgB8/4 [E. granulosus]	93	4	43
45	EgAgB8/4 [E. granulosus]	169	5	48
15	EgAgB8/1 [E. granulosus]	135	3	26
16	EgAgB8/1 [E. granulosus]	114	3	26
47	EgAgB8/4 [E. granulosus]	207	5	72
17	EgAgB8/1 [E. granulosus]	118	3	26
10	EgAgB8/1 [E. granulosus]	175	3	26
18	EgAgB8/4 [E. granulosus]	130	5	49
10	EgAgB8/4 [E. granulosus]	90	5	70
19	EgAgB8/4 [E. granulosus]	165	4	58
20	EgAgB8/1 [E. granulosus]	99	3	26
24	EgAgB8/1 [E. granulosus]	151	5	39
21	EgAgB8/4 [E. granulosus]	107	5	64
22	EgAgB8/1 [E. granulosus]	90	3	26
22	EgAgB8/1 [E. granulosus]	157	4	34
23	EgAgB8/4 [E. granulosus]	94	5	48
24	EgAgB8/1 [E. granulosus]	155	4	34
25	EgAgB8/1 [E. granulosus]	139	4	34
26	EgAgB8/4 [E. granulosus]	108	5	48
26	EgAgB8/1 [E. granulosus]	93	4	39
27	Apolipoproteina A-I [Bos taurus]	261	15	58
28	Antígeno 5, 22 kDa [E. granulosus]	312	8	57
29	Antígeno 5, 22 kDa [E. granulosus]	268	8	57
30	Antígeno 5, 38 kDa [E. granulosus]	333	13	52
31	Antígeno 5, 38 kDa [E. granulosus]	298	13	52
32	Antígeno 5, 38 kDa [E. granulosus]	276	10	39
33	Antígeno 5, 38 kDa [E. granulosus]	108	9	34
34	Antígeno 5, 38 kDa [E. granulosus]	108	9	34
35	Albúmina [Bos taurus]	233	15	47

Spot	Proteina	Puntaie	N° peptidos	Cobertura (%)
	FgAgB8/1 [F_canadensis]	121	2	27
1	FgAgB8/3 [F. canadensis]	121	2	25
	EgAgB8/1 [E. canadensis]	164	5	43
2	EgAgB8/3 [E. canadensis]	157	2	26
3	EgAgB8/1 [E. canadensis]	109	3	24
4	EgAgB8/1 [E. canadensis]	121	3	26
5	EgAgB8/1 [E. canadensis]	123	2	27
c	EgAgB8/4 [E. canadensis]	330	6	66
6	EgAgB8/1 [E. canadensis]	185	4	32
7	EgAgB8/1 [E. canadensis]	159	3	28
Q	EgAgB8/4 [E. canadensis]	330	5	66
0	EgAgB8/1 [E. canadensis]	164	3	26
٩	EgAgB8/4 [E. canadensis]	134	3	29
5	EgAgB8/1 [E. canadensis]	128	2	26
10	EgAgB8/4 [E. canadensis]	228	6	62
	EgAgB8/1 [E. canadensis]	185	3	26
11	EgAgB8/1 [E. canadensis]	102	2	29
12	EgAgB8/1 [E. canadensis]	161	3	26
13	EgAgB8/1 [E. canadensis]	126	2	26
14	EgAgB8/1 [E. canadensis]	111	2	29
15	EgAgB8/1 [E. canadensis]	103	2	29
16	EgAgB8/1 [E. canadensis]	129	2	26
47	EgAgB8/4 [E. canadensis]	101	5	51
1/	EgAgB8/1 [E. canadensis]	105	3	39
18	EgAgB8/4 [E. canadensis]	395	5	60
	EgAgB8/1 [E. canadensis]	1/2	3	26
19	EgAgB8/4 [E. canadensis]	169	4	45
20	EgAgB8/1 [E. canadensis]	103	3	39
20	EgAgB8/1 [E. canadensis]	98	2	26
21	EgAgB8/1 [E. canadonsis]	110	2	29
22	EgAgB8/1 [E. canadensis]	96	2	29
25	$E_{gAgB0/1}[E. canadensis]$	204	5	51
24	$E_{gAgB8/1}$ [E. canadensis]	149	3	33
	FgAgB8/4 [F canadensis]	395	4	43
25	FgAgB8/1 [F canadensis]	116	2	26
26	Antígeno 5, 22 kDa [E. canadensis]	173	8	54
27	Antígeno 5, 22 kDa [E. canadensis]	130	7	39
28	Antígeno 5, 22 kDa [E. canadensis]	224	4	32
29	Antígeno 5, 22 kDa [E. canadensis]	511	11	61
	Apolipoproteína A-I [Sus scrofa]	684	20	63
30	Antígeno 5, 22 kDa [E. canadensis]	256	7	40
21	Apolipoproteína A-I [Sus scrofa]	465	17	63
51	Antígeno 5, 22 kDa [E. canadensis]	131	5	32
32	Inmunoglobulina, cadena kappa [Sus scrofa]	159	2	24
33	Inmunoglobulina, cadena kappa [Sus scrofa]	148	2	26
34	Inmunoglobulina, cadena lambda [Sus scrofa]	192	4	38
35	Inmunoglobulina, cadena lambda [Sus scrofa]	124	5	51
36	Inmunoglobulina, cadena kappa [Sus scrofa]	118	2	24
37	Inmunoglobulina, cadena lambda [Sus scrofa]	270	6	54
38	Inmunoglobulina, cadena lambda [Sus scrofa]	152	5	51
39	Inmunoglobulina, cadena kappa [Sus scrofa]	118	1	21
40	Antígeno 5, 38 kDa [E. canadensis]	375	11	44
41	Antígeno 5, 38 kDa [E. canadensis]	230	9	38
42	Antígeno 5, 38 kDa [E. canadensis]	202	9	38
43	Antígeno 5, 38 kDa [E. canadensis]	157	6	25
44	Antígeno 5, 38 kDa [E. canadensis]	113	6	23
45	Albúmina [Sus scrofa]	563	19	58

Tabla S3.2. Componentes hidrofóbicos presentes en Ld_f **derivado de hidátides fértiles y no fértiles.** Se extrajeron con solventes orgánicos los componentes hidrofóbicos de Ld_f provenientes de hidátides fértiles y no fértiles y se analizaron por espectrometría de masa mediante el uso de una columna HILIC (duplicados analíticos). Se nombran los 50 ácidos grasos (y sus fórmulas moleculares) y fosfolípidos principales, ordenados de mayor a menor según la abundancia relativa promedio de los componentes identificados en Ld_f de hidátides fértiles (Tablas A y B, respectivamente). Además, se asocian los valores correspondientes a m/z, tiempo de retención y relación de abundancia relativa entre Ld_f de hidátides fértiles y no fértiles (F/NF). PC: fosfatidiletanolamina.

Α

	m/z	Tiempo de retención	Fórmula molecular	Lípido neutro	FÉRTIL	NO FÉRTIL	F/NF
1	329.25	3.29	C22H34O2	Ácido docosapentaenoico	1.11E+08	6.72E+06	16.45
2	303.23	3.24	C20H32O2	Ácido eicosatetraenoico	7.86E+07	1.66E+06	47.44
3	281.25	3.35	C18H34O2	Ácido octadecenoico	6.01E+07	6.96E+06	8.63
4	331.26	3.26	C22H36O2	Ácido docosatetraenoico	5.08E+07	5.75E+06	8.84
5	297.24	3.39	C18H34O3	Ácido oxo-octadecanoico	5.02E+07	1.36E+07	3.68
6	283.26	3.35	C18H36O2	Ácido octadecanoico	3.04E+07	2.25E+07	1.35
7	345.24	3.28	C22H34O3	Ácido hidroxi-docosapentaenoico	2.74E+07	1.10E+07	2.49
8	305.25	3.30	C20H34O2	Ácido eicosatrienoico	2.52E+07	2.52E+06	9.99
9	295.23	3.41	C18H32O3	Ácido hidroxi-octadecadienoico	2.37E+07	4.91E+06	4.84
10	377.23	3.32	C22H34O5	Ácido trihidroxi-neuroprostatetraenoico	2.17E+07	7.35E+06	2.96
11	171.10	4.07	C9H16O3	Ácido oxo-nonanoico	2.01E+07	1.62E+07	1.24
12	319.23	3.24	C20H32O3	Ácido hidroxi-eicosatetraenoico	1.97E+07	6.88E+06	2.86
13	361.24	3.30	C22H34O4	Ácido dihidroxi-docosapentaenoico	1.90E+07	1.04E+07	1.82
14	299.20	3.16	C20H28O2	Ácido trans-retinoico	1.80E+07	5.97E+06	3.01
15	327.23	3.30	C22H32O2	Ácido docosahexaenoico	1.79E+07	1.39E+06	12.83
16	365.34	3.30	C24H46O2	Ácido tetracosenoico	1.68E+07	9.15E+06	1.83
17	255.23	3.38	C16H32O2	Ácido hexadecanoico	1.66E+07	6.80E+06	2.44
18	375.22	3.41	C22H32O5	Ácido trihidroxi-docsahexaenoico	1.52E+07	4.01E+06	3.78
19	145.09	5.03	C7H14O3	Ácido hidroxi-heptanoico	1.51E+07	1.04E+07	1.44
20	379.25	3.38	C22H36O5	Ácido dinor-trihidroxi-colanoico	1.49E+07	4.13E+06	3.61
21	335.22	3.27	C20H32O4	Leucotrieno B4	1.39E+07	6.03E+06	2.30
22	317.21	3.26	C20H30O3	Leucotrieno A4	1.33E+07	6.04E+06	2.20
23	343.23	3.24	C22H32O3	Ácido oxo-dihidroxi-prostadienoico	1.26E+07	9.87E+06	1.28
24	351.22	3.27	C20H32O5	Prostaglandina A2	1.26E+07	4.26E+06	2.96
25	333.21	3.21	C20H30O4	Quinurenato	1.24E+07	1.08E+04	1145.57
26	188.04	3.43	C10H7NO3	Ácido eicosenoico	1.24E+07	7.27E+06	1.71
27	309.28	3.30	C20H38O2	Ácido metil-oxo-pentanoico	1.23E+07	7.09E+06	1.74
28	129.06	4.17	C6H10O3	Ácido docosapentaenoico	1.23E+07	1.66E+07	0.74
29	349.20	3.33	C20H30O5	Ceto-prostaglandina E2	1.11E+07	3.09E+06	3.60
30	321.24	3.31	C20H34O3	Ácido hidroxi-eicosatrienoico	1.08E+07	5.76E+06	1.88
31	313.24	3.48	C18H34O4	Ácido dihidroxi-octadecenoico	1.06E+07	5.31E+06	2.00
32	157.09	4.34	C8H14O3	Ácido 3-oxo-octanoico	1.02E+07	1.62E+07	0.63
33	315.25	3.48	C18H36O4	Ácido dihidroxi-octadecanoico	1.02E+07	3.94E+06	2.59
34	301.22	3.10	C20H30O2	Ácido eicosapentaenoico	1.00E+07	8.65E+06	1.16
35	279.23	3.32	C18H32O2	Ácido octadecadienoico	9.29E+06	7.16E+05	12.96
36	271.23	4.59	C16H32O3	Hidroxi-palmitato	9.02E+06	4.79E+06	1.88
37	311.22	3.41	C18H32O4	Ácido hidroperoxi-octadecadienoico	8.95E+06	2.58E+06	3.48
38	359.22	3.31	C22H32O4	Ácido dihidroxi-docosahexaenoico	8.90E+06	4.46E+06	2.00
39	115.04	5.14	C5H8O3	Ácido metil-oxo-butanoico	8.72E+06	9.08E+06	0.96
40	299.26	4.51	C18H36O3	Ácido hidroxi-octadecanoico	8.26E+06	6.43E+06	1.29
41	337.24	3.32	C20H34O4	Ácido dihidroxi-eicosatrienoico	8.18E+06	2.81E+06	2.91
42	353.23	3.41	C20H34O5	Ácido trihidroxi-prostadienoico	7.50E+06	2.08E+06	3.61
43	363.25	3.27	C22H36O4	Ácido oxo-hidroxi-dimetil-prostadienoico	7.50E+06	6.72E+06	1.12
44	293.21	3.36	C18H30O3	Ácido oxo-ciclo-pentaneoctanoico	6.93E+06	2.84E+06	2.44
45	173.12	4.89	C9H18O3	Ácido hidroxi-nonanoico	6.60E+06	1.11E+07	0.59
46	333.28	3.30	C22H38O2	Ácido docosatrienoico	6.51E+06	2.54E+06	2.56
47	269.21	3.55	C16H30O3	Ácido oxo-hexadecanoico	6.31E+06	7.86E+06	0.80
48	363.33	3.30	C24H44O2	Ácido tetracosadienoico	6.16E+06	1.69E+06	3.65
49	337.31	3.30	C22H42O2	Ácido docosenoico	6.13E+06	3.61E+06	1.70
50	357 28	3 24	C24H38O2	Ácido dodecanoico	5.80E±06	1 30E±06	4.46

	m/z	Tiempo de retención	Fórmula molecular	Lípido polar	FÉRTIL	NO FÉRTIL	F/NF
1	788,62	17,50	C44H86NO8P	PC (18:0/18:1)	4,85E+08	5,28E+08	0,92
2	734,57	17,69	C40H80NO8P	PC (16:0/16:0)	4,31E+08	4,73E+08	0,91
3	786,60	17,37	C44H84NO8P	PC (18:1/18:1)	3,35E+08	3,76E+08	0,89
4	810,60	17,04	C46H84NO8P	PC (18:1/20:3)	3,00E+08	3,48E+08	0,86
5	706,54	17,73	C38H76NO8P	PC (15:0/15:0)	2,80E+08	3,18E+08	0,88
6	760,59	17,56	C42H82NO8P	PC (16:0/18:1)	2,53E+08	2,77E+08	0,91
7	762,60	17,66	C42H84NO8P	PC (18:0/16:0)	2,44E+08	2,76E+08	0,88
8	836,62	17,12	C48H86NO8P	PC (18:0/22:5)	2,21E+08	2,49E+08	0,89
9	732,55	17,58	C40H78NO8P	PC (14:0/18:1)	1,90E+08	2,04E+08	0,93
10	814,63	17,32	C46H88NO8P	PC (18:0/20:2)	1,50E+08	1,57E+08	0,95
11	838,63	17,12	C48H88NO8P	PC (18:0/22:4)	1,20E+08	1,26E+08	0,95
12	508,38	19,38	C26H54NO6P	PC (18:1)	1,00E+08	9,80E+07	1,03
13	746,61	17,79	C42H84NO7P	PC (16:0/18:0)	1,00E+08	1,09E+08	0,92
14	812,62	17,26	C46H86NO8P	PC (16:1/22:2)	1,00E+08	1,08E+08	0,93
15	808,59	17,00	C46H82NO8P	PC (18:1/20:4)	8,86E+07	9,02E+07	0,98
16	784,59	17,32	C44H82NO8P	PC (18:2/18:1)	8,16E+07	9,24E+07	0,88
17	482,36	19,51	C24H52NO6P	PC (16:2)	7,79E+07	8,07E+07	0,97
18	892,68	16,88	C52H94NO8P	PC (20:4/24:1)	7,78E+07	8,30E+07	0,94
19	692,56	17,91	C38H78NO7P	PC (14:2/16:0)	7,62E+07	9,21E+07	0,83
20	758,57	17,48	C42H80NO8P	PC (16:0/18:2)	7,61E+07	8,22E+07	0,93
21	720,59	17,89	C40H82NO7P	PC (14:2/18:0)	7,16E+07	7,35E+07	0,97
22	834,60	16,96	C48H84NO8P	PC (18:1/22:5)	6,96E+07	8,14E+07	0,85
23	720,55	17,71	C39H78NO8P	PC (15:0/16:0)	6,89E+07	7,64E+07	0,90
24	870,70	17,29	C50H96NO8P	PC (18:1/24:1)	6,44E+07	6,66E+07	0,97
25	703,58	17,93	C39H79N2O6P	SP (16:0)	6,41E+07	8,05E+07	0,80
26	748,59	17,69	C41H82NO8P	PE (16:0/20:0)]	6,13E+07	6,57E+07	0,93
27	782,57	17,12	C44H80NO8P	PC (16:0/20:4)	6,03E+07	7,36E+07	0,82
28	718,58	17,80	C40H80NO7P	PC (14:0/18:0)	5,05E+07	5,33E+07	0,95
29	868,68	17,23	C50H94NO8P	PC (18:2/24:1)	4,45E+07	4,29E+07	1,04
30	866,66	17,05	C50H92NO8P	PC (18:3/24:1)	4,41E+07	4,90E+07	0,90
31	842,66	17,25	C48H92NO8P	PC (20:0/20:2)	4,40E+07	4,16E+07	1,06
32	918,70	16,95	C54H96NO8P	PC (22:5/24:1)	4,38E+07	4,06E+07	1,08
33	894,70	16,86	C52H96NO8P	PC (20:3/24:1)	4,19E+07	4,26E+07	0,98
34	774,64	17,78	C44H88NO7P	PC (18:0/18:0)	4,10E+07	3,65E+07	1,12
35	920,71	16,95	C54H98NO8P	PC (22:4/24:1)	4,06E+07	3,75E+07	1,08
36	414,32	3,05	C23H43NO5	Hidroxi-hexadecenoilcarnitina	4,05E+07	3,82E+07	1,06
37	844,68	17,56	C48H94NO8P	PC (18:0/22:1)	3,98E+07	4,19E+07	0,95
38	840,65	17,24	C48H90NO8P	PC (18:1/22:2)	3,77E+07	3,87E+07	0,97
39	678,51	17,79	C36H72N08P	PC (14:0/14:0)	3,72E+07	3,84E+07	0,97
40	864,65	16,99	C50H90NO8P	PC (20:0/22:5)	3,60E+07	3,68E+07	0,98
41	746,57	17,57	C41H80NO8P	PC (15:0/18:1)	3,45E+07	3,64E+07	0,95
42	774,60	17,52	C43H84NO8P	PE (16:0/22:1)	3,30E+07	3,70E+07	0,89
43	772,62	17,64	C44H86NO7P	PC (18:1/18:0)	2,84E+07	2,98E+07	0,95
44	370,30	3,03	C21H39NO4	Tetradecenoilcarnitina	2,14E+07	1,89E+07	1,13
45	748,62	17,87	C42H86NO7P	PC (16:2/18:0)	2,09E+07	2,23E+07	0,94
46	744,59	17,66	C42H82NO7P	Hexadecanoil-glicero-fosfonocolina	2,03E+07	2,20E+07	0,92
47	794,61	17,21	C46H84NO7P	PC (18:1/20:4)	2,00E+07	2,13E+07	0,94
48	552,40	18,53	C28H58NO7P	PC (20:0)	1,93E+07	1,93E+07	1,00
49	862,63	16,98	C50H88NO8P	PC (20:0/22:6)	1,93E+07	1,89E+07	1,02
50	890,66	16,90	C52H92NO8P	PC (20:5/24:1)	1,91E+07	1,79E+07	1,07

Tabla S3.3. Componentes hidrofóbicos presentes en Ld_f obtenido por una o dos rondas de ultracentrifugación en gradiente de KBr. Se extrajeron con solventes orgánicos los componentes hidrofóbicos Ld_f (proveniente de hidátides fértiles) sometida a una o dos rondas de ultracentrifugación (1^{ra} UC y 2^{da} UC) y se analizaron por espectrometría de masa mediante el uso de las columnas HILIC y C4. Se nombran los 50 ácidos grasos (y sus fórmulas moleculares, triplicados analíticos) y fosfolípidos (duplicados analíticos) principales, ordenados de mayor a menor según la abundancia relativa promedio de los componentes identificados en Ld_f de hidátides fértiles (Tablas A y B, respectivamente). Además, se asocian los valores correspondientes a m/z, tiempo de retención y relación de abundancia relativa entre Ld_f con una o dos rondas de ultracentrifugación (1^{ra} UC/2^{da} UC). PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina.

Α

	m/z	Tiempo de retención	Fórmula molecular	Lípido neutro	1 ^{ra} UC	2 ^{da} UC	1 ^{ra} UC/2 ^{da} UC
1	255.233101	13.94	C16H32O2	Ácido hexadecanoico	8.37E+07	7.98E+07	1.05
2	281.248695	14.82	C18H34O2	Ácido octadecenoico	6.88E+07	1.27E+08	0.54
3	329.249001	13.05	C22H34O2	Ácido docosapentaenoico	4.80E+07	1.01E+08	0.47
4	303.23317	12.42	C20H32O2	Ácido eicosatetraencoico	3.10E+07	8.59E+07	0.36
5	279.233083	12.46	C18H32O2	Ácido octadecadienoico	2.72E+07	5.42E+07	0.50
6	331.264575	14.93	C22H36O2	Ácido docosatetraenoico	1.88E+07	4.26E+07	0.44
7	305.248818	13.73	C20H34O2	Ácido eicosatrienoico	1.76E+07	5.36E+07	0.33
8	227.20185	10.47	C14H28O2	Ácido tetradecanoico	1.39E+07	9.18E+06	1.51
9	269.24881	15.79	C17H34O2	Ácido heptadecanoico	1.13E+07	8.83E+06	1.28
10	241.217532	12.15	C15H30O2	Ácido metil-tetradecanoico	1.02E+07	1.01E+07	1.01
11	309.28014	18.26	C20H38O2	Ácido eicosenoico	9.87E+06	2.71E+07	0.36
12	311.295823	21.29	C20H40O2	Ácido eicosanoico	6.88E+06	8.63E+06	0.80
13	253.217449	11.53	C16H30O2	Ácido hexadecenoico	6.38E+06	8.24E+06	0.77
14	367.358342	27.62	C24H48O2	Ácido tetracosanoico	6.20E+06	7.52E+06	0.82
15	301.217473	10.60	C20H30O2	Ácido eicosapentaenoico	4.94E+06	4.28E+06	1.15
16	365.342572	24.82	C24H46O2	Ácido tetracosenoico	4.47E+06	6.72E+06	0.67
17	327.233076	12.11	C22H32O2	Ácido docosahexaenoico	4.31E+06	1.63E+07	0.26
18	339.326953	24.65	C22H44O2	Ácido docosanoico	3.78E+06	4.26E+06	0.89
19	395.389566	30.17	C26H52O2	Ácido hexacosanoico	3.32E+06	3.11E+06	1.07
20	297.243582	7.09	C18H34O3	Ácido oxo-octadecanoico	3.00E+06	7.22E+05	4.16
21	199.170491	7.56	C12H24O2	Ácido dodecanoico	2.87E+06	1.81E+06	1.59
22	299.201945	8.39	C20H28O2	Ácido trans-retinoico	2.85E+06	1.29E+06	2.21
23	333.280414	17.26	C22H38O2	Ácido docosatrienoico	2.73E+06	8.01E+06	0.34
24	219.175556	8.76	C15H24O	Trans-farnesal	2.61E+06	3.03E+05	8.61
25	337.311545	21.65	C22H42O2	Ácido docosenoico	2.53E+06	5.07E+06	0.50
26	267.233088	13.16	C17H32O2	Ácido ciclohexil-undecanoico	2.43E+06	5.41E+06	0.45
27	357.280119	15.94	C24H38O2	Ácido dodecanoico	2.35E+06	6.48E+06	0.36
28	157.12345	4.57	C9H18O2	Ácido nonanoico	2.33E+06	1.71E+06	1.36
29	295.264357	16.57	C19H36O2	Ácido metilen-octadecanoico	2.18E+06	5.30E+06	0.41
30	335.29601	19.20	C22H40O2	Ácido docosadienoico	1.88E+06	5.31E+06	0.35
31	355.322011	14.49	C22H44O3	Ácido hidroxi-docosanoico	1.75E+06	9.43E+05	1.86
32	295.228213	7.92	C18H32O3	Ácido hidroxi-octadecadienoico	1.73E+06	4.28E+05	4.03
33	297.243594	9.14	C18H34O3	Ácido oxo-octadecanoico	1.70E+06	7.80E+05	2.19
34	297.280062	19.48	C19H38O2	Ácido nonadecanoico	1.65E+06	1.63E+06	1.01
35	311.295801	19.25	C20H40O2	Ácido eicosanoico	1.56E+06	4.44E+06	0.35
36	353.342787	26.21	C23H46O2	Ácido tricosanoico	1.55E+06	1.41E+06	1.10
37	363.327273	22.46	C24H44O2	Ácido tetracosadienoico	1.50E+06	2.78E+06	0.54
38	359.295856	17.94	C24H40O2	Ácido dodecanoico	1.50E+06	3.94E+06	0.38
39	393.37422	27.68	C26H50O2	Ácido hexacosenoico	1.50E+06	2.33E+06	0.65
40	381.374066	28.93	C25H50O2	Ácido pentacosanoico	1.39E+06	1.10E+06	1.26
41	277.217392	10.62	C18H30O2	Ácido octadecatrienoico	1.23E+06	4.01E+06	0.31
42	383.353377	18.14	C24H48O3	Ácido hidroxi-tetracosanoico	1.13E+06	8.70E+05	1.30
43	325.31149	23.00	C21H42O2	Ácido heneicosanoico	9.92E+05	8.13E+05	1.22
44	143.10785	3.89	C8H16O2	Ácido octanoico	9.86E+05	5.86E+05	1.68
45	171.139182	5.37	C10H20O2	Ácido decanoico	6.90E+05	5.75E+05	1.20
46	257.176148	5.51	C14H26O4	Ácido tetradecanedioico	5.61E+05	2.83E+05	1.98
47	299.259713	8.08	C18H36O3	Ácido hidroxi-octadecanoico	4.45E+05	2.16E+05	2.06
48	383.353384	25.34	C24H48O3	Ácido hidroxi-tetracosanoico	4.22E+05	5.98E+05	0.71
49	411.384644	21.70	C26H52O3	Ácido hidroxi-hexacosanoico	4.18E+05	3.15E+05	1.33
50	315,2542	4.94	C18H36O4	Ácido dihidroxi-octadecanoico	2.12E+05	1.53E+05	1.39

	m/z	Tiempo de retención	Lípido polar	1 ^{ra} UC	2 ^{da} UC	1 ^{ra} UC/2 ^{da} UC
1	788.61	3.81	PC (18:0/18:1)	2.41E+08	2.99E+08	0.80
2	734.57	3.87	PC (16:0/16:0)	1.71E+08	1.90E+08	0.90
3	762.60	3.85	PC (18:0/16:0)	1.30E+08	1.44E+08	0.91
4	786.60	3.83	PC (18:1/18:1)	1.14E+08	2.04E+08	0.56
5	760.58	3.84	PC (16:0/18:1	1.02E+08	1.89E+08	0.54
6	706.54	3.90	PC (15:0/15:0)	8.89E+07	1.48E+08	0.60
7	732.55	3.88	PC (14:0/18:1)	7.71E+07	1.40E+08	0.55
8	810.60	3.80	PC (18:1/20:3)	7.40E+07	2.04E+08	0.36
9	836.61	3.81	PC (18:0/22:5)	7.14E+07	1.02E+08	0.70
10	274.27	6.12	Hexadecaesfingosina	6.56E+07	1.09E+08	0.60
11	816.65	3.80	PC (18:0/20:2)	4.95E+07	8.39E+07	0.59
12	814.63	3.99	PC (14:0/24:1)	4.87E+07	6.63E+07	0.73
13	812.61	3.80	PC (16:1/22:2)	4.37E+07	6.68E+07	0.65
14	838.63	4.29	1-Oleoilglicerofosfocolina	3.74E+07	7.77E+07	0.48
15	522.35	3.86	PC (16:0/18:2)	3.63E+07	7.30E+07	0.50
16	758.57	3.81	PC (18:0/22:4)	3.50E+07	5.51E+07	0.64
17	808.58	3.82	PC (18:2/18:1)	3.13E+07	7.22E+07	0.43
18	784.58	3.82	PC (18:1/20:4)	3.11E+07	6.81E+07	0.46
19	288.29	5.43	SP (17:0)	3.01E+07	2.92E+07	1.03
20	892.68	3.81	PC (20:4/24:1)	2.57E+07	1.95E+07	1.32
21	496.34	4.35	PC (16:0)	2.38E+07	4.05E+07	0.59
22	834.60	3.80	PC (18:1/22:5)	2.32E+07	4.42E+07	0.52
23	720.55	4.16	PC (18:1/24:1)	2.22E+07	1.94E+07	1.14
24	870.69	3.87	PC (15:0/16:0)	2.17E+07	6.29E+07	0.35
25	104.11	3.82	PC (16:0/18:0)	2.17E+07	2.12E+07	1.02
26	746.60	3.91	PC (20:0/20:2)	2.06E+07	2.29E+07	0.90
27	842.66	3.83	PE (16:0/20:0)	2.02E+07	5.96E+07	0.34
28	844.68	7.43	Colina	1.96E+07	1.90E+07	1.03
29	748.58	3.90	PC (18:2/24:1)	1.95E+07	1.43E+07	1.36
30	868.68	4.16	PC (18:0/22:1)	1.88E+07	1.97E+07	0.95
31	782.57	4.26	PC (18:0)	1.85E+07	3.21E+07	0.58
32	482.36	4.40	PC (16:2)	1.83E+07	5.78E+07	0.32
33	920.71	3.98	PC (22:4/24:1)	1.78E+07	1.40E+07	1.27
34	524.37	3.83	PC (16:0/20:4)	1.78E+07	4.36E+07	0.41
35	414.32	3.95	Hidroxi-hexadecenoilcarnitina	1.73E+07	1.11E+07	1.55
36	371.31	3.86	Monooleoilglicerol	1.67E+07	9.63E+06	1.74
37	746.57	5.59	SP (18:0)	1.65E+07	2.70E+07	0.61
38	302.30	3.89	PC (14:0/18:0)	1.60E+07	1.76E+07	0.91

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

692.56

718.57

537.16

720.59

840.65

894.69

524.37

730.54

866.66

774.60

496.34

678.51

3.86

3.71

3.90

3.84

7.61

3.80

3.82

7.62

3.88

3.92

3.81

4.17

PC (15:0/18:1)

Beta-D-Glucano

PC (14:2/16:0)

PC (14:2/18:0)

PC(18:3/24:1)

PE (16:0/22:1)

PC (14:0/18:2)

PC (14:0/14:0)

PC(18:1/22:2)

PC(20:3/24:1)

PC (18:0)

PC (16:0)

0.34

1.03

0.57

0.76

0.70

0.68

0.48

0.75

0.60

0.67

0.68

0.59

1.58E+07

1.50E+07

1.49E+07

1.48E+07

1.45E+07

1.44E+07

1.42E+07

1.41E+07

1.41E+07

1.32E+07

1.32E+07

1.31E+07

4.67E+07

1.45E+07

2.59E+07

1.95E+07

2.07E+07

2.13E+07

2.96E+07

1.89E+07

2.35E+07

1.97E+07

1.93E+07

2.23E+07

ANEXO - Capítulo 4



EgAgB no fértil

Figura S4.1. Ensayos de saturación de la unión de EgAgB nativo a macrófagos THP-1. Las células se incubaron con cantidades crecientes de EgAgB nativo-B derivado de LH no fértil (A y B) o fértil (C y D) u OVA-B como control (20 a 350 µg/mL) y se reveló la unión por citometría de flujo empleando estreptavidina-FITC. (A) y (C) Índice de unión de EgAgB (naranja) y OVA (gris) para macrófagos correspondiente al promedio \pm SEM de triplicados analíticos; las figuras son representativas de tres y dos experimentos independientes, respectivamente. (*) Indica diferencias estadísticamente significativas respecto al control con OVA (ANOVA de dos vías y prueba de Tukey, p < 0.05). (B) y (D) Curvas de titulación obtenidas para la unión de EgAgB (•) y OVA (\blacktriangle) a macrófagos, utilizando el mejor ajuste obtenido con el modelo de "saturación con unión a un sitio específico" (Graph Pad Prism). La línea sólida corresponde a la curva teórica obtenida para cada proteína.
ANEXO - Capítulo 5

Tabla S5.1. Abudancia de las especies lípidicas presentes en EgAgB_{IP} y rEgAgB8/1_{S2} en relación al EgAgB_{UC}. Se extrajeron con solventes orgánicos los componentes hidrofóbicos de las preparaciones EgAgB_{UC} (obtenida luego de dos rondas de UC), EgAgB_{IP} y rEgAgB8/1_{S2} y se analizó su composición en términos de lípidos neutros (triplicados analíticos) y polares (duplicados analíticos) por HPLC-MS/MS utilizando las columnas C4 y HILIC, respectivamente. Se indican los 50 lípidos (fórmulas moleculares) neutros y polares más abundantes, ordenados de mayor a menor según la abundancia relativa promedio de los componentes identificados en 2^{da} UC (Tablas A y B, respectivamente). Además, se asocian los valores correspondientes a m/z, tiempo de retención y relación de abundancia relativa entre 2^{da} UC y EgAgB_{1P} o rEgAgB8/1_S. PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina.

	m/z	Tiempo de retención	Fórmula molecular	Lípido neutro	2 ^{da} UC	EgAgB _{IP}	EgAgB8/1 _{s2}	2 ^{da} UC/ EgAgB _{IP}	2 ^{da} UC/ EgAgB8/1 _{S2}	EgAgB _{IP} / EgAgB8/1 _{S2}
1	281.25	14.82	C18H34O2	Ácido octadecenoico	1.27E+08	3.11E+07	1.48E+07	4.10	8.60	2.10
2	329.25	13.05	C22H34O2	Ácido docosapentaenoico	1.01E+08	2.20E+07	2.04E+03	4.61	49767.58	10784.15
3	303.23	12.42	C20H32O2	Ácido eicosatetraencoico	8.59E+07	2.07E+07	3.10E+05	4.15	277.16	66.86
4	255.23	13.94	C16H32O2	Ácido hexadecanoico	7.98E+07	3.41E+07	2.58E+07	2.34	3.09	1.32
5	279.23	12.46	C18H32O2	Ácido octadecadienoico	5.42E+07	1.55E+07	8.86E+05	3.50	61.21	17.46
6	305.25	13.73	C20H34O2	Ácido eicosatrienoico	5.36E+07	8.48E+06	1.59E+04	6.32	3364.94	532.76
7	331.26	14.93	C22H36O2	Ácido docosatetraenoico	4.26E+07	6.99E+06	4.32E+02	6.09	98481.42	16163.24
8	309.28	18.26	C20H38O2	Ácido eicosenoico	2.71E+07	4.01E+06	1.83E+05	6.75	147.67	21.88
9	327.23	12.11	C22H32O2	Ácido docosahexaenoico	1.63E+07	2.68E+06	6.75E+03	6.10	2421.47	396.64
10	241.22	12.15	C15H30O2	Ácido metil-tetradecanoico	1.01E+07	3.87E+06	2.41E+06	2.61	4.18	1.60
11	227.20	10.47	C14H28O2	Ácido tetradecanoico	9.18E+06	6.93E+06	4.36E+06	1.32	2.11	1.59
12	269.25	15.79	C17H34O2	Ácido heptadecanoico	8.83E+06	2.87E+06	1.81E+06	3.08	4.87	1.58
13	311.30	21.29	C20H40O2	Ácido eicosanoico	8.63E+06	3.57E+06	1.05E+06	2.42	8.23	3.40
14	253.22	11.53	C16H30O2	Ácido hexadecenoico	8.24E+06	4.81E+06	1.13E+07	1.71	0.73	0.42
15	333.28	17.26	C22H38O2	Ácido docosatrienoico	8.01E+06	1.08E+06	9.93E+02	7.42	8057.99	1086.39
16	367.36	27.62	C24H48O2	Ácido tetracosanoico	7.52E+06	2.82E+06	1.66E+06	2.67	4.54	1.70
17	365.34	24.82	C24H46O2	Ácido tetracosenoico	6.72E+06	1.48E+06	3.09E+04	4.54	217.33	47.91
18	357.28	15.94	C24H38O2	Ácido dodecanoico	6.48E+06	8.71E+05	-	7.44	-	-
19	267.23	13.16	C17H32O2	Ácido ciclohexil-undecanoico	5.41E+06	1.23E+06	4.40E+05	4.41	12.30	2.79
20	335.30	19.20	C22H40O2	Ácido docosadienoico	5.31E+06	7.07E+05	2.00E+03	7.52	2659.39	353.76
21	295.26	16.57	C19H36O2	Ácido metilen-octadecanoico	5.30E+06	6.81E+05	1.08E+05	7.78	49.25	6.33
22	337.31	21.65	C22H42O2	Ácido docosenoico	5.07E+06	8.30E+05	3.24E+04	6.11	156.40	25.59
23	311.30	19.25	C20H40O2	Ácido eicosanoico	4.44E+06	6.16E+05	1.32E+04	7.20	337.22	46.81
24	301.22	10.60	C20H30O2	Ácido eicosapentaenoico	4.28E+06	2.59E+06	6.85E+05	1.65	6.25	3.78
25	339.33	24.65	C22H44O2	Ácido docosanoico	4.26E+06	1.73E+06	1.74E+06	2.46	2,44	0.99
26	277.22	10.62	C18H30O2	Ácido octadecatrienoico	4.01E+06	2.35E+06	3.82E+04	1.71	104.93	61.36
27	359.30	17.94	C24H40O2	Ácido dodecanoico	3.94E+06	4.59E+05	-	8.58	-	-
28	395.39	30.17	C26H52O2	Ácido hexacosanoico	3.11E+06	1.68E+06	9.71E+05	1.85	3.20	1.73
29	363.33	22.46	C24H44O2	Ácido tetracosadienoico	2.78E+06	4.48E+05	1.31E+02	6.22	21258.86	3418.36
30	393.37	27.68	C26H50O2	Ácido hexacosenoico	2.33E+06	4.58E+05	9.30E+03	5.08	250.39	49.31
31	199.17	7.56	C12H24O2	Ácido dodecanoico	1.81E+06	1.03E+06	8.66F+05	1.76	2.09	1.19
32	157.12	4.57	C9H18O2	Ácido nonanoico	1.71E+06	1.27E+06	1.60E+06	1.35	1.07	0.80
33	297.28	19.48	C19H38O2	Ácido nonadecanoico	1.63E+06	5.99E+05	1.56E+05	2.72	10.44	3.85
34	353.34	26.21	C23H46O2	Ácido tricosanoico	1.41E+06	6.13E+05	4.21E+05	2.29	3.33	1.46
35	299.20	8.39	C20H28O2	Ácido trans-retinoico	1.29E+06	5.86E+05	9.12E+05	2.20	1.42	0.64
36	381.37	28.93	C25H50O2	Ácido pentacosanoico	1.10E+06	8.06E+05	3.05E+05	1.37	3.62	2.64
37	355.32	14.49	C22H44O3	Ácido hidroxi-docosanoico	9.43E+05	2.44E+05	2.11E+05	3.86	4,47	1.16
38	383.35	18.14	C24H48O3	Ácido hidroxi-tetracosanoico	8.70E+05	3.73E+05	3.53E+05	2.33	2.47	1.06
39	325.31	23.00	C21H42O2	Ácido heneicosanoico	8.13E+05	3.77E+05	2.24E+05	2.16	3.64	1.69
40	297.24	9.14	C18H34O3	Ácido oxo-octadecanoico	7.80E+05	3.35E+05	2.39E+05	2.32	3.27	1.41
41	297.24	7.09	C18H34O3	Ácido oxo-octadecanoico	7.22E+05	3.93E+05	2.46E+05	1.84	2.94	1.60
42	383.35	25.34	C24H48O3	Ácido hidroxi-tetracosanoico	5.98E+05	1.09E+05	2.09E+04	5.48	28.67	5.24
43	143.11	3.89	C8H16O2	Ácido octanoico	5.86E+05	2.74E+05	3.22E+05	2.14	1.82	0.85
44	171.14	5.37	C10H20O2	Ácido decanoico	5.75E+05	2.97E+05	3.08E+05	1.93	1.87	0.96
45	295.23	7,92	C18H32O3	Ácido hidroxi-octadecadienoico	4.28F+05	1.89F+05	1.38F+05	2,27	3,10	1.36
46	411.38	21.70	C26H52O3	Ácido hidroxi-hexacosanoico	3.15E+05	1.55E+05	1.73E+05	2.03	1.82	0.90
47	219.18	8 76	C15H240	Trans-farnesal	3.03E+05	1 21E+05	3.04E+04	2.55	9.98	3.97
48	257.18	5 51	C14H26O4	Ácido tetradecanedioico	2.83E+05	1.95E+05	7 15E+04	1 45	3.96	2 72
49	299.26	8,08	C18H36O3	Ácido hidroxi-octadecanoico	2.16F+05	1.23E+05	2.87E+05	1.76	0.75	0.43
50	315.25	4 94	C18H36O4	Ácido dibidroxi-octadecanoico	1.53E+05	4 76E+04	1 50E+05	3 20	1.02	0.32

1	Δ
'	~

	m/z	Tiempo de retención	Lípido polar	2 ^{da} UC	EgAgB _{IP}	EgAgB8/1 _{s2}	2 ^{da} UC/ EgAgB _{IP}	2 ^{da} UC/ EgAgB8/1 _{S2}	EgAgB _{IP} / EgAgB8/1 _{S2}
1	788.61	3.81	PC (18:0/18:1)	2.99E+08	2.84E+08	-	1.05	-	-
2	810.60	3.80	PC (18:1/20:3)	2.04E+08	1.46E+08	-	1.40	-	-
3	786.60	3.83	PC (18:1/18:1)	2.04E+08	1.71E+08	2.08E+07	1.19	9.81	8.23
4	734.57	3.87	PC (16:0/16:0)	1.90E+08	3.09E+08	-	0.61	-	-
5	760.58	3.84	PC (16:0/18:1	1.89E+08	1.81E+08	1.51E+07	1.04	12.50	11.97
6	706.54	3.90	PC (15:0/15:0)	1.48E+08	2.09E+08	-	0.71	-	-
7	762.60	3.85	PC (18:0/16:0)	1.44E+08	2.07E+08	-	0.69	-	-
8	732.55	3.88	PC (14:0/18:1)	1.40E+08	1.65E+08	2.62E+07	0.85	5.33	6.30
9	274.27	6.12	Hexadecaesfingosina	1.09E+08	5.75E+07	4.87E+07	1.89	2.23	1.18
10	836.61	3.81	PC (18:0/22:5)	1.02E+08	9.04E+07	-	1.13	-	-
11	814.63	3.80	PC (18:0/20:2)	8.39E+07	7.33E+07	-	1.14	-	-
12	522.35	4.29	1-Oleoilglicerofosfocolina	7.77E+07	8.95E+06	-	8.68	-	-
13	758.57	3.86	PC (16:0/18:2)	7.30E+07	6.15E+07	5.13E+07	1.19	1.42	1.20
14	784.58	3.82	PC (18:2/18:1)	7.22E+07	5.19E+07	-	1.39	-	-
15	808.58	3.82	PC (18:1/20:4)	6.81E+07	5.48E+07	-	1.24	-	-
16	812.61	3.80	PC (16:1/22:2)	6.68E+07	5.71E+07	-	1.17	-	-
17	816.65	3.99	PC (14:0/24:1)	6.63E+07	5.97E+07	-	1.11	-	-
18	720.55	3.87	PC (15:0/16:0)	6.29E+07	7.40E+07	-	0.85	-	-
19	748.58	3.83	PE (16:0/20:0)	5.96E+07	7.96E+07	-	0.75	-	-
20	482.36	4.40	PC (16:2)	5.78E+07	8.76E+06	-	6.59	-	-
21	838.63	3.81	PC (18:0/22:4)	5.51E+07	5.27E+07	-	1.05	-	-
22	746.57	3.86	PC (15:0/18:1)	4.67E+07	3.69E+07	-	1.27	-	-
23	834.60	3.80	PC (18:1/22:5)	4.42E+07	3.66E+07	-	1.21	-	-
24	782.57	3.83	PC (16:0/20:4)	4.36E+07	2.77E+07	-	1.57	-	-
25	496.34	4.35	PC (16:0)	4.05E+07	1.22E+07	2.65E+05	3.33	152.94	45.98
26	524.37	4.26	PC (18:0)	3.21E+07	1.16E+07	_	2.77	-	-
27	774 60	3.82	PE (16:0/22:1)	2 96E+07	2 65E+07	-	1.12	-	-
28	288.29	5.43	SP (17:0)	2 92E+07	1.05E+07	7 40E+06	2.79	3.95	1.41
29	302.30	5.59	SP (18:0)	2.70E+07	1.48E+07	-	1.82	-	-
30	692 56	3.90	PC (14:2/16:0)	2 59E+07	4 11F+07	-	0.63	-	-
31	730 54	3.88	PC (14:0/18:2)	2 35E+07	2 27E+07	3 26E+07	1.03	0.72	0.70
32	842.66	3.91	PC (20:0/20:2)	2.35E+07	1 78E+07	-	1.28	-	-
33	894 69	4 17	PC(20:3/24:1)	2 23E+07	1 38E+07	_	1.61	-	-
34	866.66	3.80	PC(18:3/24:1)	2.13E+07	1.50E+07	-	1.39	-	-
35	746.60	3.82	PC (16:0/18:0)	2.13E+07	2 58E+07	_	0.82	-	_
36	524.37	7.61	PC (18:0)	2.07E±07	8.07E±06	-	2.56	-	_
37	844.68	1 16	PC (18:0/22:1)	1.97E+07	1.55E±07	_	1.27	-	-
38	678 51	3.02	PC (14:0/14:0)	1.97E+07	3.52E±07	-	0.56	-	_
39	720 59	3.92	PC (14:2/18:0)	1.972+07	3.595±07	_	0.50	_	_
40	902.69	2.04	PC (20:4/24:1)	1.95E+07	0.00E+00		-	-	_
41	092.00	3.81	PC (20:4/24:1)	1.95E+07	1.28E+07	-	1 52		_
42	070.09 040.6F	4.10	PC (18:1/24:1)	1.94E+07	1.20E+07	-	1.52		
42	104 11	3.01	Colina	1.950+07	1.700+07	4 215:07	1.13	0.45	0.44
45	104.11	7.43		1.90E+07	1.0/E+U/	4.21E+U/	3.44	0.45	0.44
44	490.34	7.02	PC (14:0/19:0)	1.89E+07	3.49E+06	-	0.75		-
45	/10.5/	3.89	Poto D Chuope	1.70E+U7	2.33E+U/	2.005 : 07	0.75	0.72	1 50
40	337.16	3.71		1.45E+07	3.00E+07	2.00E+07	1.52	0.75	1.50
4/	020.71	3.90	PC (18:2/24:1)	1.43E+U/	9.45E+06	-	1.52	-	-
48	920.71	3.98		1.40E+07	0.00E+00	-	1 25	1.45	1 16
49	414.32	3.95	muroxi-nexadecenoilcarnitina	1.11E+0/	8.92E+06	7.65E+06	1.25	1.45	1.10
50	371.31	3.86	Monooleoilglicerol	9.63E+06	5.15E+06	4.96E+06	1.87	1.94	1.04

Material suplementario S5.1

Buscando profundizar en la interferencia observada entre el EgAgB y el LPS por la unión a los macrófagos se intentó evaluar la expresión del receptor TLR4 y el co-receptor CD14, claves para la unión y señalización del LPS en macrófagos. Para ello, se incubaron macrófagos THP-1 con el LPS (10 y 5000 ng/mL) en ausencia o presencia de EgAgB (10 y 100 µg/mL) o en medio como control. La estimulación se realizó por distintos tiempos (15, 30 y 60 min) y posteriormente las células se marcaron con anticuerpos anti-CD14 y anti-TLR4 determinando la emisión de fluorescencia por citometría de flujo. El anticuerpo anti-CD14 permitió detectar y cuantificar el nivel de CD14 sobre los macrófagos (Figura 5.21 A y C para estímulos a baja concentración, y B y D para estímulos a alta concentración) pero la señal correspondiente al anticuerpo anti-TLR4 fue siempre igual a la determinada para el respectivo control FMO (se hicieron pruebas con diferente concentración aunque sin éxito). En cuanto a la expresión de CD14, se observó dispersión en el nivel de expresión entre experimentos independientes por lo cual los niveles de CD14 se normalizaron por la expresión de CD14 no varió a los tiempos analizados tanto con dosis bajas o altas de EgAgB o LPS, ni en presencia de ambos estímulos a la vez.



Figura S5.1. Niveles de CD14 sobre macrófagos THP-1 en presencia de EgAgB y LPS. Se incubaron macrófagos THP-1 con EgAgB (10 µg/mL y 100 µg/mL) o PBE_{E-B-AbAm} (control) en presencia/ausencia de LPS (100 µg/mL y 5000 ng/mL). Luego de 15, 30 y 60 minutos (min) a 37° C las células se marcaron con el anticuerpo anti-CD14-PE o su respectivo control FMO y se analizó la fluorescencia d las células por citometría de flujo. (A y B) Histogramas representativos de la IF para CD14 (detector FL-2) en un experimento con triplicados analíticos para los estímulos a baja y alta concentración, respectivamente. (C y D) Se grafica la expresión promedio de CD14 (media geométrica corregida por el control FMO) ± SEM correspondiente a tres experimentos independientes utilizando triplicados analíticos.







Figura S5.2. El EgAgB nativo aumentó los niveles de CD86 y CD40 en LPM en relación al control a las 24 horas p.e.. Se estimularon hembras Balb/c por vía intraperitoneal con EgAgB (50 μg/ratón) o PBS_{E-B-AbAm} (control de vehículo) en ausencia o presencia de LPS (15 μg/ratón). Las inyecciones de EgAgB y de LPS se realizaron en forma secuencial y en este orden sin mezclar las preparaciones. A las 24 horas p.e. se recuperaron las células mediante lavado peritoneal y se marcaron con anticuerpos específicos conjugados a fluorocromos para su análisis por citometría de flujo (sección 2.10.3). Utilizando el programa FlowJo se definieron los LPM como aquellas células CD19⁻Ly6C⁻F4/80⁺⁺ y se determinó sobre esta población el nivel de expresión de las moléculas CD86 (A) y CD40 (B). Se grafica la IF para CD86 (PE) y CD40 (FITC) en función de la IF para F4/80 (PE-Cy7) de los eventos CD19⁻Ly6C⁻F4/80⁺⁺. La IF de cada control FMO se representa con una línea sólida. Los gráficos corresponden a un experimento con 5 individuos por lote y sus respectivos FMO y son representativos de tres experimentos independientes.



В



Α

Figura S5.3. El EgAgB nativo potenció los niveles de CD86 y moduló los niveles de MHC-II inducidos por LPS en LPM a las 4 y 24 horas p.e., respectivamente. Se estimularon hembras Balb/c por vía intraperitoneal con EgAgB (50 μg/ratón) o PBS_{E-B-AbAm} (control de vehículo) en ausencia o presencia de LPS (15 μg/ratón). Las inyecciones de EgAgB y de LPS se realizaron en forma secuencial y en este orden sin mezclar las preparaciones. A las 4 y 24 horas p.e. se recuperaron las células mediante lavado peritoneal y se marcaron con anticuerpos específicos conjugados a fluorocromos para su análisis por citometría de flujo (sección 2.10.3). Utilizando el programa FlowJo se definieron los LPM como aquellas células CD19⁻Ly6C⁻ F4/80⁺⁺ y se determinó sobre esta población el nivel de expresión de las moléculas CD86 (A) y MHC-II (B), a las 4 y 24 horas p.e., respectivamente. Se grafica en A la IF para CD86 (PE) y en B la IF para MHC-II (APC) en función de la IF para F4/80 (PE-Cy7) de los eventos CD19⁻Ly6C⁻F4/80⁺⁺. La IF de cada control FMO se representa con una línea sólida. Los gráficos corresponden a un experimento con 5 individuos por lote y sus respectivos FMO y son representativos de tres experimentos independientes.







Figura S5.4. El EgAgB nativo moduló los niveles de CD86 y CD40 inducidos por LPS en SPM a las 4 horas p.e.. Se estimularon hembras Balb/c por vía intraperitoneal con EgAgB (50 μg/ratón) o PBS_{E-B-AbAm} (control de vehículo) en ausencia o presencia de LPS (15 μg/ratón). Las inyecciones de EgAgB y de LPS se realizaron en forma secuencial y en este orden sin mezclar las preparaciones. A las 4 horas p.e. se recuperaron las células mediante lavado peritoneal y se marcaron con anticuerpos específicos conjugados a fluorocromos para su análisis por citometría de flujo (sección 2.10.3). Utilizando el programa FlowJo se definieron los SPM como aquellas células CD19⁻Ly6C⁻F4/80^{-/+}MHC-II⁺⁺ descartando los eosinófilos en base a su menor tamaño y mayor complejidad (FSC bajo, SSC alto) y se determinó sobre esta población el nivel de expresión de las moléculas CD86 (A) y CD40 (B). Se grafica en A la IF para CD86 (PE) y en B la IF para CD40 (APC), ambas en función de la IF para Ly6C (eF450) de los eventos CD19⁻Ly6C⁻F4/80^{-/+}MHC-II⁺⁺ sin eosinófilos. La IF de cada control FMO se representa con una línea sólida. Los gráficos corresponden a un experimento con 5 individuos por lote y sus respectivos FMO y son representativos de dos experimentos independientes.







Figura S5.5. El EgAgB nativo moduló los niveles de CD86 y CD40 inducidos por LPS en SPM a las 24 horas p.e.. Se estimularon hembras Balb/c por vía intraperitoneal con EgAgB (50 μg/ratón) o PBS_{E-B-AbAm} (control de vehículo) en ausencia o presencia de LPS (15 μg/ratón). Las inyecciones de EgAgB y de LPS se realizaron en forma secuencial y en este orden sin mezclar las preparaciones. A las 24 horas p.e. se recuperaron las células mediante lavado peritoneal y se marcaron con anticuerpos específicos conjugados a fluorocromos para su análisis por citometría de flujo (sección 2.10.3). Utilizando el programa FlowJo se definieron los SPM como aquellas células CD19⁻Ly6C⁻F4/80^{-/+}MHC-II⁺⁺ descartando los eosinófilos en base a su menor tamaño y mayor complejidad (FSC bajo, SSC alto) y se determinó sobre esta población el nivel de expresión de las moléculas CD86 (A) y CD40 (B). Se grafica en A la IF para CD86 (PE) y en B la IF para CD40 (APC), ambas en función de la IF para Ly6C (eF450) de los eventos CD19⁻Ly6C⁻F4/80^{-/+}MHC-II⁺⁺ sin eosinófilos. La IF de cada control FMO se representa con una línea sólida. Los gráficos corresponden a un experimento con 5 individuos por lote y sus respectivos FMO y son representativos de dos experimentos independientes.



В



Α

Figura S5.6. El rEgAg8/1 moduló los niveles de CD86 pero no de CD40 inducidos por LPS en SPM a las 4 horas p.e.. Se estimularon hembras Balb/c por vía intraperitoneal con rEgAgB8/1 (50 μg/ratón) o PBS_{E-B-AbAm} (control de vehículo) en ausencia o presencia de LPS (15 μg/ratón). Las inyecciones de rEgAgB8/1 y de LPS se realizaron en forma secuencial y en este orden sin mezclar las preparaciones. A las 4 horas p.e. se recuperaron las células mediante lavado peritoneal y se marcaron con anticuerpos específicos conjugados a fluorocromos para su análisis por citometría de flujo (sección 2.10.3). Utilizando el programa FlowJo se definieron los SPM como aquellas células CD19⁻Ly6C⁻F4/80^{-/+}MHC-II⁺⁺ descartando los eosinófilos en base a su menor tamaño y mayor complejidad (FSC bajo, SSC alto) y se determinó sobre esta población el nivel de expresión de las moléculas CD86 (A) y CD40 (B). Se grafica en A la IF para CD86 (PE) y en B la IF para CD40 (APC), ambas en función de la IF para Ly6C (eF450) de los eventos CD19⁻Ly6C⁻F4/80^{-/+}MHC-II⁺⁺ sin eosinófilos. La IF de cada control FMO se representa con una línea sólida. Los gráficos corresponden a un experimento con 5 individuos por lote y sus respectivos FMO y son representativos de dos experimentos independientes.





Α



Figura S5.7. El rEgAgB8/1 aumentó los niveles de CD86 y CD40 en SPM a las 24 horas p.e.. Se estimularon hembras Balb/c por vía intraperitoneal con rEgAgB8/1 (50 μg/ratón) o PBS_{E-B-AbAm} (control de vehículo) en ausencia o presencia de LPS (15 μg/ratón). Las inyecciones de rEgAgB8/1 y de LPS se realizaron en forma secuencial y en este orden sin mezclar las preparaciones. A las 24 horas p.e. se recuperaron las células mediante lavado peritoneal y se marcaron con anticuerpos específicos conjugados a fluorocromos para su análisis por citometría de flujo (sección 2.10.3). Utilizando el programa FlowJo se definieron los SPM como aquellas células CD19⁻Ly6C⁻F4/80^{-/+}MHC-II⁺⁺ descartando los eosinófilos en base a su menor tamaño y mayor complejidad (FSC bajo, SSC alto) y se determinó sobre esta población el nivel de expresión de las moléculas CD86 (A) y CD40 (B). Se grafica en A la IF para CD86 (PE) y en B la IF para CD40 (APC), ambas en función de la IF para Ly6C (eF450) de los eventos CD19⁻Ly6C⁻F4/80^{-/+}MHC-II⁺⁺ sin eosinófilos. La IF de cada control FMO se representa con una línea sólida. Los gráficos corresponden a un experimento con 5 individuos por lote y sus respectivos FMO y son representativos de dos experimentos independientes.



Figura S5.8 A. Efectos *in vivo* en la expresión del CD19 sobre la población de linfocitos B peritoneales. Se estimularon hembras Balb/c por vía intraperitoneal con EgAgB (50 µg/ratón) o PBS_{E-B-AbAm} (control de vehículo) en ausencia o presencia de LPS (15 µg/ratón). Las inyecciones de EgAgB y de LPS se realizaron en forma secuencial y en este orden sin mezclar las preparaciones. A las 4 y 24 horas p.e. se recuperaron las células mediante lavado peritoneal y se marcaron con anticuerpos específicos conjugados a fluorocromos para su análisis por citometría de flujo (sección 2.10.3). Utilizando el programa FlowJo se definieron los linfocitos B totales como aquellas células CD19⁺F4/80⁻ y se determinó sobre esta población el nivel de expresión del marcador fenotípico CD19. Se grafica el nivel de expresión de CD19 para experimentos con EgAgB nativo y rEgAgB8/1, determinado como la media geométrica de la IF normalizada por el nivel del grupo control, a las 24 horas p.e.. Cada punto del gráfico representa un individuo y se indica la mediana por lote correspondiente a cada experimento (línea horizontal fina y corta) y al conjunto de experimentos independientes (línea horizontal gruesa y larga). Los gráficos corresponden a tres y dos experimentos independientes para EgAgB nativo y rEgAgB8/1, respectivamente, con 5 individuos por lote. Se aplicó la prueba exacta no paramétrica de dos vías de Mack Skillings seguido de la prueba basada en el test T de Student, sobre la cual se realizó la corrección de Benjamini y Hochberg (* p < 0.05).

EgAgB nativo



Figura S5.8 B. Efectos in vivo de EgAgB sobre la población de linfocitos B total y la sub-población de linfocitos B1 peritoneales. Se estimularon hembras Balb/c por vía intraperitoneal con EgAgB (50 µg/ratón) o PBS_{E-B-AbAm} (control de vehículo) en ausencia o presencia de LPS (15 µg/ratón). Las inyecciones de EgAgB y de LPS se realizaron en forma secuencial y en este orden sin mezclar las preparaciones. A las 4 y 24 horas p.e. se recuperaron las células mediante lavado peritoneal y se marcaron con anticuerpos específicos conjugados a fluorocromos para su análisis por citometría de flujo (sección 2.10.3). Utilizando el programa FlowJo se definieron los linfocitos B totales y la sub-población B1, como aquellas células CD19⁺F4/80⁻ y CD19⁺F4/80⁻ Cd11b⁺, respectivamente y se determinó sobre esta población el nivel de expresión de las moléculas MHC-II y CD86. Se grafica el número total de linfocitos B y B1 (A y B) y los niveles de expresión de MHC-II (C y D) y CD86 (E y F), determinados como la media geométrica de la IF normalizada por el nivel del lote control, a las 24 horas p.e.. Cada punto del gráfico representa un individuo y se indica la mediana por lote correspondiente a cada experimento (línea horizontal fina y corta) y al conjunto de experimentos independientes (línea horizontal gruesa y larga). La IF del control FMO se representa con una línea punteada. Los gráficos corresponden a dos experimentos independientes para 4 horas y a tres experimentos independientes para 24 horas, con 5 individuos por lote. Se aplicó la prueba exacta no paramétrica de dos vías de Mack Skillings seguido de la prueba basada en el test T de Student, sobre la cual se realizó la corrección de Benjamini y Hochberg (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).



Figura S5.9. El EgAgB nativo moduló los niveles de CD86 inducidos por LPS en células dendríticas peritoneales. Se estimularon hembras Balb/c por vía intraperitoneal con EgAgB (50 μg/ratón) o PBS_{E-B-AbAm} (control de vehículo) en ausencia o presencia de LPS (15 μg/ratón). Las inyecciones de EgAgB y de LPS se realizaron en forma secuencial y en este orden sin mezclar las preparaciones. A las 4 y 24 horas p.e. se recuperaron las células mediante lavado peritoneal y se marcaron con anticuerpos específicos conjugados a fluorocromos para su análisis por citometría de flujo (sección 2.10.3). Utilizando el programa FlowJo se definieron las células dendríticas como aquellas células CD11c⁺⁺MHC-II⁺⁺ y se determinó sobre esta población el nivel de expresión de CD86. Se grafica la IF para CD86 (PE) en función de la IF para CD11c (PE-Cy7) de los eventos CD11c⁺⁺MHC-II⁺⁺. La IF de cada control FMO se representa con una línea sólida. Los gráficos corresponden a un experimento con 5 individuos por lote y sus respectivos FMO y son representativos de tres experimentos independientes.



В



Figura S5.10. El EgAgB nativo moduló los niveles de MCH-II y CD86 inducidos por LPS en la población de monocitos CD19⁻F4/80⁻Ly6C⁺⁺ a las 24 horas p.e.. Se estimularon hembras Balb/c por vía intraperitoneal con EgAgB (50 µg/ratón) o PBS_{E-B-AbAm} (control de vehículo) en ausencia o presencia de LPS (15 µg/ratón). Las inyecciones de EgAgB y de LPS se realizaron en forma secuencial y en este orden sin mezclar las preparaciones. A las 24 horas p.e. se recuperaron las células mediante lavado peritoneal y se marcaron con anticuerpos específicos conjugados a fluorocromos para su análisis por citometría de flujo (sección 2.10.3). Utilizando el programa FlowJo se definieron los monocitos como aquellas células CD19⁻F4/80⁻Ly6C⁺⁺ y se determinó sobre esta población el nivel de expresión de MHC-II (A) y CD86 (B). Se grafica en A la IF para MHC-II (APC) y en B la IF para CD86 en función de la IF para Ly6C (Pacific-Blue) de los eventos CD19⁻F4/80⁻Ly6C⁺⁺. Los gráficos corresponden a un experimento con 5 individuos por lote y sus respectivos FMO y son representativos de tres experimentos independientes. La IF de cada control FMO se representa con una línea sólida. Se representa con gráficos de contorno (y no de puntos) para una mejor visualización, por tratarse de una población minoritaria.



В



Figura S5.11. El EgAgB indujo un rápido reclutamiento de neutrófilos a cavidad peritoneal a las 4 horas p.e.. Se estimularon hembras Balb/c por vía intraperitoneal con EgAgB nativo/rEgAgB8/1 (50 µg/ratón) o PBS_{E-B-AbAm} (control de vehículo) en ausencia o presencia de LPS (15 µg/ratón). Las inyecciones de EgAgB y de LPS se realizaron en forma secuencial y en este orden sin mezclar las preparaciones. A las 4 horas p.e. se recuperaron las células mediante lavado peritoneal y se marcaron con anticuerpos específicos conjugados a fluorocromos para su análisis por citometría de flujo (sección 2.10.3). Utilizando el programa FlowJo se definieron los neutrófilos como aquellas células CD19⁻F4/80⁻CD11c⁻MHCII⁻SiglecF⁻Gr-1⁺⁺. Se grafica la IF para Gr-1 (FITC), el marcador fenotípico de neutrófilos utilizado, en función de la IF para SiglecF (PE). Los gráficos corresponden a un experimento con 5 individuos por lote y sus respectivos FMO y son representativos de tres experimentos independientes. La IF de cada control FMO se representa con una línea sólida.

ANEXO - Capítulo 6

Material suplementario S6.1

Análisis *in sílico* de posibles modificaciones post-traduccionales en variantes de las subunidades detectadas en el EgAgB nativo de origen bovino

1. >tr_Q5EKQ4_Q5EKQ4_ECH EgAgB8/1

1.1. Predicción de sitios de fosforilación utilizando NetPhos-3.1 (https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1)

>tr_Q5EKQ4_Q5EKQ4_ECH	78	8 aminoácidos			
Secuencia	# x	Contexto	Score	Quinasa	Predicción
# tr_Q5EKQ4_Q5EKQ4_ECH	11 T	FVVVTQADD	0.534	DNAPK	Si
<pre># tr_Q5EKQ4_Q5EKQ4_ECH</pre>	18 T	DDGLTSTSR	0.636	PKC	Si
<pre># tr_Q5EKQ4_Q5EKQ4_ECH</pre>	19 S	DGLTSTSRS	0.980	unsp	Si
<pre># tr_Q5EKQ4_Q5EKQ4_ECH</pre>	19 S	DGLTSTSRS	0.532	PKC	Si
<pre># tr_Q5EKQ4_Q5EKQ4_ECH</pre>	20 T	GLTSTSRSV	0.891	unsp	Si
<pre># tr_Q5EKQ4_Q5EKQ4_ECH</pre>	20 T	GLTSTSRSV	0.822	PKC	Si
<pre># tr_Q5EKQ4_Q5EKQ4_ECH</pre>	21 S	LTSTSRSVM	0.549	unsp	Si
<pre># tr_Q5EKQ4_Q5EKQ4_ECH</pre>	21 S	LTSTSRSVM	0.516	cdc2	Si
<pre># tr_Q5EKQ4_Q5EKQ4_ECH</pre>	23 S	STSRSVMKM	0.953	unsp	Si
<pre># tr_Q5EKQ4_Q5EKQ4_ECH</pre>	23 S	STSRSVMKM	0.651	PKC	Si
<pre># tr_Q5EKQ4_Q5EKQ4_ECH</pre>	68 S	MALRSHFRG	0.672	unsp	Si
# tr_Q5EKQ4_Q5EKQ4_ECH	68 S	MALRSHFRG	0.534	PKC	Si
ALALVSFVVVTQADDGLTSTSRS	VMKM	FGEVKYFFERDF	PLGQKVV	DLLKE # 50	
LEEVFQLLRKKLRMALRSHFRGL	# 100				
%1TSTS.S				# 50	
%1S					

En rojo se indica el péptido señal y por tanto el sitio predicho en la T11 no tendría consecuencias a nivel de la proteína madura

1.2. Predicción del PM y pI en las variantes fosforiladas correspondientes a la proteína madura (en hasta 5 sitios) utilizando Scansite 4.0

(http	s:/	//sca	ansit	e4.	mit	.edı	/#(calc	:Mo	٥W	eig	ht;	s=4	4f1	7aC)42	-d7	734	-4	32t	o-al	ba6	-93	3ad2	256t	o2be	9)
	_											_																_

Número de sitios fosforilados	PM	pI
0	7590.775	8.31
1	7668.746	6.56
2	7746.717	5.78
3	7824.688	5.33
4	7902.659	5.04
5	7980.631	4.83

2. tr_Q9UA06_Q9UA06_ECH EgAgB8/1

2.1 Predicción de sitios de fosforilación utilizando NetPhos-3.1 (https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1)

tr_Q9UA06_Q9UA06_ECH 81 aminoácidos

Secuencia	# x	Contexto	Score	Quinasa	Predicción
# tr_Q9UA06_Q9UA06_ECH	14 T	FVVVTQADD	0.534	DNAPK	Si
# tr_Q9UA06_Q9UA06_ECH	21 T	DDGLTSTSR	0.636	PKC	Si
# tr_Q9UA06_Q9UA06_ECH	22 S	DGLTSTSRS	0.980	unsp	Si
# tr_Q9UA06_Q9UA06_ECH	22 S	DGLTSTSRS	0.532	PKC	Si
# tr_Q9UA06_Q9UA06_ECH	23 T	GLTSTSRSV	0.891	unsp	Si
# tr_Q9UA06_Q9UA06_ECH	23 T	GLTSTSRSV	0.822	PKC	Si
# tr_Q9UA06_Q9UA06_ECH	24 S	LTSTSRSVM	0.549	unsp	Si
# tr_Q9UA06_Q9UA06_ECH	24 S	LTSTSRSVM	0.516	cdc2	Si
# tr_Q9UA06_Q9UA06_ECH	26 S	STSRSVMKM	0.953	unsp	Si
# tr_Q9UA06_Q9UA06_ECH	26 S	STSRSVMKM	0.651	PKC	Si
# tr_Q9UA06_Q9UA06_ECH	71 S	MALRSHLRG	0.522	unsp	Si
MLLALALVSFVVVTQADDGLTS	TSRSVI	4 KMFGEVKYFFE	RDPLGQKVVD	L # 50	
LKELEEVFQLLRKKLRMALRSHL	RGLIA	EGE		# 100)
%1TSTS.S				# 50	
%1					

En rojo se indica el péptido señal y por tanto el sitio predicho en la T14 no tendría consecuencias a nivel de la proteína madura

2.2. Predicción del PM y pI en las variantes fosforiladas correspondientes a la proteína madura (en hasta 5 sitios) utilizando Scansite 4.0

(https://scansite4.mit.edu/#calcMolWeight;s=4f17a042-d734-432b-aba6-93ad256b2be9)

Número de sitios fosforilados	PM	pI
0	7556.758	8.31
1	7634.729	6.56
2	7712.700	5.78
3	7790.671	5.33
4	7868.642	5.04
5	7946.613	4.83

3. Q6UZE2_Q6UZE2_ECH EgAgB8/4

3.1. Predicción de sitios de fosforilación utilizando NetPhos-3.1 (<u>https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1</u>)

>tr_Q6UZE2_Q6UZE2_ECH	81	amino ácidos				
Secuencia	# x	Contexto	Score	Quina	asa	Predicción
# tr_Q6UZE2_Q6UZE2_ECH	50 T	GRDLTAICQ	0.504		PKG	Si
ALVAFVAVVQAKAEPERCKCLIM AICQKLQLKVHEVLKKYVKDLLE %1 %1	IRKLGE EEDED	EIRDFFRSDPLG DLK T	GQKLVALGRDLT	- # # #	50 100 50	

Los aminoácidos en rojo corresponden al péptido señal

3.2. Predicción del PM y pI en la variante fosforilada correspondiente a la proteína madura utilizando Scansite 4.0

(https://scansite4.mit.edu/#calcMolWeight;s=4f17a042-d734-432b-aba6-93ad256b2be9)

Número de sitios fosforilados PM

0	8200.625	6.78
1	8278.597	5.81

4. Q6UZE3_Q6UZE2_ECH EgAgB8/4

4.1. Predicción de sitios de fosforilación utilizando NetPhos-3.1 (https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1)

>tr_Q6UZE2_Q6UZE3_ECH 81 amino ácidos

Secuencia	# x	Contexto	Score	Quina	sa	Predicción
# tr_Q6UZE3_Q6UZE3_ECH	50 T	GRDLTAICQ	0.504	PKC	3	Si
ALVAFVAVVQAKAEPERCKCLIM AICQKLQLKVHEVLKKYVKDLLE %1 %1	RKLGE EEDED	IRDFFRSDPLG DLK T	QKLAALGRDLT	- # # #	50 100 50	

Los aminoácidos en rojo corresponden al péptido señal

4.2. Predicción del PM y pI en la variante fosforilada correspondiente a la proteína madura utilizando Scansite 4.0

(https://scansite4.mit.edu/#calcMolWeight;s=4f17a042-d734-432b-aba6-93ad256b2be9)

Número de sitios fosforilados	PM	pI	
0	8172.572	6.78	
1	8250.543	5.81	

3. Q6UZD8_Q6UZD8_ECH EgAgB8/4

5.1. <u>(https://s</u>	Predicción c ervices.healthtech	le <u>dtu.dk/</u> s	sitios service.php?	de <u>NetPhos-</u>	fosforila 3.1)	ación	utilizando	0	NetPhos-3.1
>tr_Q6U2	ZD8_Q6UZD8_ECH	81	. aminoácido	S					
Secuencia	1	# x	Contexto	Scor	e	Quinasa	Predico	ción	
# tr_Q6U	ZD8_Q6UZD8_ECH	50 T	GRDLTAICO	Q 0.	504	PKG	Si		
ALVAFVAV AICQKLQI %1 %1	/VQAKAEPERCKRLI _KVHEVLKKYVKDLI	MRKLGE EEEDED	EIRDFFRSDP DLK T	LGQKLVA	LGRDLT	- # # #	50 100 50		

5.2. Predicción del PM y pI en la variante fosforilada correspondiente a la proteína madura utilizando Scansite 4.0

(https://scansite4.mit.edu/#calcMolWeight;s=4f17a042-d734-432b-aba6-93ad256b2be9)

Número de sitios fosforilados	PM	pI
0	8253.674	7.96
1	8331.645	6.56

BIBLIOGRAFÍA

- 1. Rohde, K. The origins of parasitism in the platyhelminthes: An introduction. Int. J. Parasitol. 27, 677 (1997).
- Olson, P. D. & Tkach, V. V. Advances and trends in the molecular systematics of the parasitic platyhelminthes. Adv. Parasitol. 60, 165–243 (2005).
- Benesh, D. P., Parker, G. & Chubb, J. C. Life-cycle complexity in helminths: What are the benefits? *Evolution* 75, 1936–1952 (2021).
- 4. Majewska, A. A., Huang, T., Han, B. & Drake, J. M. Predictors of zoonotic potential in helminths. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 376, (2021).
- 5. Raj, E., Calvo-Urbano, B., Heffernan, C., Halder, J. & Webster, J. P. Systematic review to evaluate a potential association between helminth infection and physical stunting in children. *Parasites and Vectors* 15, 1–19 (2022).
- 6. Koziol, U. Evolutionary developmental biology (evo-devo) of cestodes. Exp. Parasitol. 180, 84–100 (2017).
- Thompson, R. C. A. Biology and systematics of Echinococcus. in *Echinococcus and Hydatid Disease* (eds. Thompson, R. C. A. & Lymbery, A. J.) 1–50 (CAB International, 1995).
- Preza, M. Estudio de los diferentes roles que cumplen los Neuropéptidos en el ciclo de vida del cestodo modelo Hymenolepis microstoma. (Universidad de la República, 2021).
- 9. Rovid Spickler, A. Echinococcosis. (2020).
- Kern, P. *et al.* The Echinococcoses: Diagnosis, Clinical Management and Burden of Disease. *Adv. Parasitol.* 96, 259– 369 (2017).
- 11. Kern, P. Advanced alveolar echinococcosis in a new geographic area. Clin. Infect. Dis. 9–25 (2020).
- 12. Woolsey, I. D. & Miller, A. L. Echinococcus granulosus sensu lato and Echinococcus multilocularis: A review. *Res. Vet. Sci.* 135, 517–522 (2021).
- 13. Wen, H. et al. Echinococcosis: Advances in the 21st Century. Clin. Microbiol. Rev. 32, 1–39 (2019).
- 14. Cucher, M. A. *et al.* Cystic echinococcosis in South America: systematic review of species and genotypes of Echinococcus granulosus sensu lato in humans and natural domestic hosts. *Trop. Med. Int. Heal.* 21, 166–175 (2016).
- 15. Nakao, M., Lavikainen, A., Yanagida, T. & Ito, A. Phylogenetic systematics of the genus Echinococcus (Cestoda: Taeniidae). *Int. J. Parasitol.* 43, 1017–1029 (2013).
- 16. Tsai, I. J. et al. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. Nature 496, 57–63 (2013).
- 17. Romig, T., Ebi, D. & Wassermann, M. Taxonomy and molecular epidemiology of Echinococcus granulosus sensu lato. *Vet. Parasitol.* 213, 76–84 (2015).
- 18. Dominique A. Vuitton, D. P. M. *et al.* International consensus on terminology to be used in the field of echinococcoses. *Parasite* 27, (2020).
- 19. Andrew Thompson, R. C. The molecular epidemiology of echinococcus infections. *Pathogens* 9, 1–9 (2020).
- 20. Lymbery, A. J. *Phylogenetic Pattern , Evolutionary Processes and Species Delimitation in the Genus Echinococcus. Advances in Parasitology* 95, (Elsevier Ltd, 2017).
- 21. Thompson, R. C. A. The taxonomy, phylogeny and transmission of Echinococcus. *Exp. Parasitol.* 119, 439–446 (2008).
- 22. Thompson, R. C. a. & Jenkins, D. J. Echinococcus as a model system: biology and epidemiology. *Int. J. Parasitol.* 44, 865–877 (2014).
- 23. Thompson, R. C. A. Biology and Systematics of Echinococcus. Advances in Parasitology 95, (Elsevier Ltd, 2017).
- 24. Casulli, A., Siles-Lucas, M. & Tamarozzi, F. Echinococcus granulosus sensu lato. *Trends Parasitol.* 35, 663–664 (2019).

- 25. Tamarozzi, F., Deplazes, P. & Casulli, A. Reinventing the Wheel of Echinococcus granulosus sensu lato Transmission to Humans. *Trends Parasitol.* 36, 427–434 (2020).
- 26. Higuita, N. I. A., Brunetti, E. & McCloskey, C. Cystic Echinococcosis. J. Clin. Microbiol. 54, 518–523 (2016).
- 27. Casulli, A. *et al.* Species and genotypes belonging to Echinococcus granulosus sensu lato complex causing human cystic echinococcosis in Europe (2000-2021): a systematic review. *Parasit. Vectors* 15, 109 (2022).
- Alvarez Rojas, C. A., Romig, T. & Lightowlers, M. W. Echinococcus granulosus sensu lato genotypes infecting humans--review of current knowledge. *Int. J. Parasitol.* 44, 9–18 (2014).
- 29. Alvarez Rojas, C. a., Romig, T. & Lightowlers, M. W. Echinococcus granulosus sensu lato genotypes infecting humans review of current knowledge. *Int. J. Parasitol.* 44, 9–18 (2014).
- 30. Casulli, A. *et al.* Molecular evidence of the camel strain (G6 genotype) of Echinococcus granulosus in humans from Turkana, Kenya. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 104, 29–32 (2010).
- Cardona, G. A. & Carmena, D. A review of the global prevalence, molecular epidemiology and economics of cystic echinococcosis in production animals. *Vet. Parasitol.* 192, 10–32 (2013).
- 32. Díaz, Á. Immunology of cystic echinococcosis (hydatid disease). Br. Med. Bull. 124, 121–133 (2017).
- 33. Brehm, K. & Koziol, U. Echinococcus–Host Interactions at Cellular and Molecular Levels. *Adv. Parasitol.* 95, 147–212 (2017).
- 34. Gottstein, B. et al. Immunology of Alveolar and Cystic Echinococcosis (AE and CE). Adv. Parasitol. 96, 1–54 (2017).
- 35. Silva-Alvarez, V. *et al.* Echinococcus granulosus antigen B: A Hydrophobic Ligand Binding Protein at the host parasite interface. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* 93, 17–23 (2015).
- 36. Díaz, A., Casaravilla, C., Allen, J. E., Sim, R. B. & Ferreira, A. M. Understanding the laminated layer of larval Echinococcus II: immunology. *Trends Parasitol.* 27, 264–73 (2011).
- Coltorti, E. A. & Varela-Díaz, V. M. Echinococcus granulosus: Penetration of macromolecules and their localization on the parasite membranes of cysts. *Exp. Parasitol.* 35, 225–231 (1974).
- Koziol, U., Krohne, G. & Brehm, K. Anatomy and development of the larval nervous system in Echinococcus multilocularis. Front. Zool. 10, 1–17 (2013).
- 39. Frayha, G. J. & Haddad, R. Comparative chemical composition of protoscolices and hydatid cyst fluid of Echinococcus granulosus (Cestoda). *Int. J. Parasitol.* 10, 359–364 (1980).
- 40. Aziz, A. *et al.* Proteomic characterisation of Echinococcus granulosus hydatid cyst fluid from sheep, cattle and humans. *J. Proteomics* 74, 1560–1572 (2011).
- 41. Ahn, C. S. *et al.* Alteration of immunoproteome profile of Echinococcus granulosus hydatid fluid with progression of cystic echinococcosis. *Parasites and Vectors* 8, 1–10 (2015).
- 42. Dos Santos, G. B. do. *et al.* Excretory/secretory products in the Echinococcus granulosus metacestode: is the intermediate host complacent with infection caused by the larval form of the parasite? *Int. J. Parasitol.* 46, 843–856 (2016).
- 43. dos Santos, G. B. *et al.* Proteomic profiling of hydatid fluid from pulmonary cystic echinococcosis. *Parasites and Vectors* 15, 1–19 (2022).
- 44. Sultan Sheriff, D., El Fakhri, M. & Kidwai, S. A. Lipids in hydatid fluid collected from lungs and livers of sheep and man. J. Helminthol. 63, 266–268 (1989).
- 45. Obal, G. *et al.* Characterisation of the native lipid moiety of echinococcus granulosus antigen B. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, (2012).
- 46. Smyth, J. D. & McManus, D. P. *The adult: proteins and nucleic acids. The Physiology and Biochemistry of Cestodes* (1989). doi:10.1017/cbo9780511525841.007
- 47. Breijo, M., Spinelli, P., Sim, R. B. & Ferreira, A. M. Echinococcus granulosus: An intraperitoneal diffusion chamber model of secondary infection in mice. *Exp. Parasitol.* 90, 270–276 (1998).

- 48. Rickard, M. D. & Williams, J. F. Hydatidosis/Cysticercosis: Immune Mechanisms and Immunization Against Infection. *Adv. Parasitol.* 21, 229–296 (1982).
- 49. Tamarozzi, F., Mariconti, M., Neumayr, A. & Brunetti, E. The intermediate host immune response in cystic echinococcosis. *Parasite Immunol.* 38, 170–181 (2016).
- Heath, D. D. & Lawrence, S. B. Antigenic polypeptides of Echinococcus granulosus oncospheres and definition of protective molecules. *Parasite Immunol.* 18, 347–357 (1996).
- 51. Dempster, R. P., Berridge, M. V., Harrison, G. B. L. & Heath, D. D. Echinococcus granulosus: Development of an intermediate host mouse model for use in vaccination studies. *Int. J. Parasitol.* 21, 549–554 (1991).
- Dempster, R. P., Harrison, G. B. L., Berridge, M. V. & Heath, D. D. Echinococcus granulosus: Use of an intermediate host mouse model to evaluate sources of protective antigens and a role for antibody in the immune response. *Int. J. Parasitol.* 22, 435–441 (1992).
- 53. David D. Heath, Stanton N. Parmeter, P. J. O. and S. B. L. Resistance to Echinococcus granulosus Infection in Lambs. *J. Parasitol.* 67, 797–799 (1981).
- 54. Lightowlers, M. W. *et al.* Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. *Parasite Immunol.* 18, 457–462 (1996).
- 55. Huang, L. *et al.* An agent-based model for control strategies of Echinococcus granulosus. *Vet. Parasitol.* 179, 84–91 (2011).
- 56. Gauci, C., Heath, D., Chow, C. & Lightowlers, M. W. Hydatid disease: Vaccinology and development of the EG95 recombinant vaccine. *Expert Rev. Vaccines* 4, 103–112 (2005).
- 57. Dempster, R. P., Harrison, G. B. L. & Berridge, M. V. Maternal transfer of protection from Echinococcus granulosus infection in sheep. *Res. Vet. Sci.* 58, 197–202 (1995).
- Heath, D. D., Holcman, B. & Shaw, R. J. Echinococcus granulosus: the mechanism of oncosphere lysis by sheep complement and antibody. *Int. J. Parasitol.* 24, 929–935 (1994).
- 59. Rogan, M. T. *et al.* In vitro killing of taeniid oncospheres, mediated by human sera from hydatid endemic areas. *Acta Trop.* 51, 291–296 (1992).
- 60. Abebe, A., Beyene, D. & Kumsa, B. Cystic echinococcosis in cattle slaughtered at gondar elfora export abattoir, northwest ethiopia. *J. Parasit. Dis.* 38, 404–409 (2014).
- 61. Ferragut, G. & Nieto, A. Antibody response of Echinococcus granulosus infected mice: Recognition of glucidic and peptidic epitopes and lack of avidity maturation. *Parasite Immunol.* 18, 393–392 (1996).
- Breijo, M., Anesetti, G., Martínez, L., Sim, R. B. & Ferreira, A. M. Echinococcus granulosus: the establishment of the metacestode is associated with control of complement-mediated early inflammation. *Exp. Parasitol.* 118, 188–96 (2008).
- 63. Mc Manus, D. P. Current status of the genetics and molecular taxonomy of echinococcus species. *Parasitology* 140, 1617–1623 (2013).
- 64. Thompson, R. C. A., Kumaratilake, L. M. & Eckert, J. Observations on echinococcus granulosus of cattle origin in switzerland. *Int. J. Parasitol.* 14, 283–291 (1984).
- 65. Guarnera, E. A., Parra, A., Kamenetzky, L., García, G. & Gutiérrez, A. Cystic echinococcosis in Argentina: Evolution of metacestode and clinical expression in various Echinococcus granulosus strains. *Acta Trop.* 92, 153–159 (2004).
- 66. Varcasia, A. et al. Cystic echinococcosis in equids in Italy. Parasitol. Res. 102, 815–818 (2008).
- 67. Cucher, M. *et al.* Echinococcus granulosus pig strain (G7 genotype) protoscoleces did not develop secondary hydatid cysts in mice. *Vet. Parasitol.* 193, 185–192 (2013).
- 68. Mourglia-Ettlin, G., Marqués, J. M., Chabalgoity, J. A. & Dematteis, S. Early peritoneal immune response during echinococcus granulosus establishment displays a biphasic behavior. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, 1–11 (2011).
- 69. Ferreira, A. M., Breijo, M., Sim, R. B. & Nieto, A. Contribution of C5-mediated mechanisms to host defence against Echinococcus granulosus hydatid infection. *Parasite Immunol.* 22, 445–453 (2000).

- Ferreira, A. M., Irigoián, F., Breijo, M., Sim, R. B. & Diáaz, A. How echinococcus granulosus deals with complement. Parasitol. Today 16, 168–172 (2000).
- 71. Irigoín, F., Würzner, R., Sim, R. B. & Ferreira, A. M. Comparison of complement activation in vitro by different Echinococcus granulosus extracts. *Parasite Immunol.* 18, 371–375 (1996).
- Riley, E. M., Dixon, J. B., Kelly, D. F. & Cox, D. A. The immune response to Echinococcus granulosus: Sequential histological observations of lymphoreticular and connective tissues during early murine infection. J. Comp. Pathol. 95, 93–104 (1985).
- 73. Riley, E. M., Dixon, J. B., Jenkins, P. & Ross, G. Echinococcus Granulosus Infection In Mice: Host Responses During Primary And Secondary Infection. *Parasitology* 92, 391–403 (1986).
- 74. Virginio, V. G. *et al.* Effects of protoscoleces and AgB from Echinococcus granulosus on human neutrophils: Possible implications on the parasite's immune evasion mechanisms. *Parasitol. Res.* 100, 935–942 (2007).
- 75. Amri, M., Aissa, S. A., Belguendouz, H., Mezioug, D. & Touil-Boukoffa, C. In vitro antihydatic action of IFN-γ is dependent on the nitric oxide pathway. J. Interf. Cytokine Res. 27, 781–787 (2007).
- 76. Jenkins, P., Dixon, J. B., Rakha, N. K. & Carter, S. D. Regulation of macrophage-Mediated larvicidal activity in echinococcus granulosus and mesocestoides corti (cestoda) infection in mice. *Parasitology* 100, 309–315 (1990).
- 77. Ramos, A. L., Discipio, R. G. & Ferreira, A. M. Eosinophil cationic protein damages protoscoleces in vitro and is present in the hydatid cyst. *Parasite Immunol.* 28, 347–355 (2006).
- Baz, A., Richieri, A., Puglia, A., Nieto, A. & Dematteis, S. Antibody response in CD4-depleted mice after immunization or during early infection with Echinococcus granulosus. *Parasite Immunol.* 21, 141–150 (1999).
- 79. Baz, A. *et al.* Echinococcus granulosus: Induction of T-independent antibody response against protoscolex glycoconjugates in early experimental infection. *Exp. Parasitol.* 119, 460–466 (2008).
- 80. Mourglia-Ettlin, G. *et al.* Echinococcus granulosus glycoconjugates induce peritoneal B cell differentiation into antibody-secreting cells and cytokine production. *Parasite Immunol.* 33, 621–631 (2011).
- 81. Dematteis, S. *et al.* Antibody and Th1/Th2-type responses in BALB/c mice inoculated with live or dead Echinococcus granulosus protoscoleces. *Parasite Immunol.* 21, 19–26 (1999).
- Allen, J. E. & Sutherland, T. E. Host protective roles of type 2 immunity: Parasite killing and tissue repair, flip sides of the same coin. Semin. Immunol. 26, 329–340 (2014).
- HARALABIDIS, S., ARAGOUNI, E. K., FRYDAS, S. & DOTSIKA, E. Immunoglobulin and cytokine profile in murine secondary hydatidosis. *Parasite Immunol.* 17, 625–630 (1995).
- 84. Yin, S. *et al.* The effect of Echinococcus granulosus on spleen cells and TGF-b expression in the perpheral blood of BALB7c mice. *Int. J. Lab. Hematol.* 38, 42–49 (2017).
- 85. Cox, D. A., Marshall-Clarke, S. & Dixon, J. B. Activation of normal murine B cells by Echinococcus granulosus. Immunology 67, 16–20 (1989).
- Cardozo, G., Tucci, P. & Hernández, A. Characterization of the immune response induced by a carbohydrate enriched fraction from Echinococcus granulosus protoscoleces in patients with cystic hydatid disease. *Parasitol. Res.* 88, 984–990 (2002).
- 87. Dematteis, S. *et al.* Modulation of the cellular immune response by a carbohydrate rich fraction from Echinococcus granulosus protoscoleces in infected or immunized Balb/c mice. *Parasite Immunol.* 23, 1–9 (2001).
- Ortona, E. *et al.* Screening of an Echinococcus granulosus cDNA library with IgG4 from patients with cystic echinococcosis identifies a new tegumental protein involved in the immune escape. *Clin. Exp. Immunol.* 142, 528–538 (2005).
- Shepherd, J. C., Aitken, A. & McManus, D. P. A protein secreted in vivo by Echinococcus granulosus inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44, 81–90 (1991).
- 90. Riganò, R. *et al.* Echinococcus granulosus antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response. *Infect. Immun.* 75, 1667–1678 (2007).

- C Carmona, R Perdomo, A Carbo, C Alvarez, J Monti, R Grauert, D Stern, G Perera, S Lloyd, R Bazini, M A Gemmell, L. Y. Risk factors associated with human cystic echinococcosis in Florida, Uruguay: results of a mass screening study using ultrasound and serology. *Am J Trop Med Hyg*. May, 599–506 (1998).
- 92. Wang, H. *et al.* Echinococcus granulosus sensu stricto: Silencing of thioredoxin peroxidase impairs the differentiation of protoscoleces into metacestodes. *Parasite* 25, (2018).
- 93. Kassis, A. I. & Tanner, C. E. The role of complement in hydatid disease: In vitro studies. *Int. J. Parasitol.* 6, 25–35 (1976).
- 94. Zhang, W., Li, J. & McManus, D. P. Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 18–36 (2003).
- 95. Zhang, W., Ross, A. G. & McManus, D. P. Mechanisms of Immunity in Hydatid Disease: Implications for Vaccine Development. J. Immunol. 181, 6679–6685 (2008).
- Rogan, M. T., Bodell, A. J. & Craig, P. S. Post-encystment/established immunity in cystic echinococcosis: Is it really that simple? *Parasite Immunol.* 37, 1–9 (2015).
- 97. Díaz, A. *et al.* Understanding the laminated layer of larval Echinococcus I: Structure. *Trends Parasitol.* 27, 204–213 (2011).
- Rogan, M. T. T-cell activity associated with secondary infections and implanted cysts of Echinococcus granulosus in BALB/c mice. *Parasite Immunol.* 20, 527–533 (1998).
- 99. Biranvand, E. *et al.* Cytokine profiles in peripheral blood mononuclear cells from patients with cystic echinococcosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 70, (2020).
- 100. Atkinson, J. A. M. *et al.* Environmental changes impacting Echinococcus transmission: Research to support predictive surveillance and control. *Glob. Chang. Biol.* 19, 677–688 (2013).
- 101. Tuxun, T. *et al.* Th17/Treg imbalance in patients with liver cystic echinococcosis. *Parasite Immunol.* 34, 520–527 (2012).
- 102. Wang, H. *et al.* Echinococcus granulosus infection reduces airway inflammation of mice likely through enhancing IL-10 and down-regulation of IL-5 and IL-17A. *Parasites and Vectors* 7, 1–13 (2014).
- 103. Vismarra, A. *et al.* Immuno-histochemical study of ovine cystic echinococcosis (Echinococcus granulosus) shows predominant T cell infiltration in established cysts. *Vet. Parasitol.* 209, 285–288 (2015).
- 104. Vatankhah, A. *et al.* Characterization of the inflammatory cell infiltrate and expression of costimulatory molecules in chronic echinococcus granulosus infection of the human liver. *BMC Infect. Dis.* 15, 1–12 (2015).
- 105. Peng, X. *et al.* Detection of Osteopontin in the pericyst of human hepatic Echinococcus granulosus. *Acta Trop.* 100, 163–171 (2006).
- 106. Hidalgo, C. *et al.* Response patterns in adventitial layer of Echinococcus granulosus sensu stricto cysts from naturally infected cattle and sheep. *Vet. Res.* 52, 1–7 (2021).
- 107. Allen, J. E. & Maizels, R. M. Diversity and dialogue in immunity to helminths. Nat. Rev. Immunol. 11, 375–388 (2011).
- Stein, M., Keshav, S., Harris, N. & Gordon, S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: A marker of alternative immunologic macrophage activation. J. Exp. Med. 176, 287–292 (1992).
- 109. Doyle, A. G. *et al.* Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: Comparison with interleukin-4 and interferon-γ. *Eur. J. Immunol.* 24, 1441–1445 (1994).
- 110. Petrone, L. *et al.* Polyfunctional Specific Response to Echinococcus Granulosus Associates to the Biological Activity of the Cysts. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, 1–14 (2015).
- Pang, N. *et al.* Th9/IL-9 profile in human echinococcosis: Their involvement in immune response during infection by Echinococcus granulosus. *Mediators Inflamm.* 2014, 5–7 (2014).
- 112. Nahrevanian, H. Involvement of nitric oxide and its up/down stream molecules in the immunity against parasitic infections. *Brazilian J. Infect. Dis.* 13, 440–448 (2009).

- 113. Díaz, A., Casaravilla, C., Barrios, A. A. & Ferreira, A. M. Parasite molecules and host responses in cystic echinococcosis. *Parasite Immunol.* 38, 193–205 (2016).
- 114. Díaz, A. & Allen, J. E. Mapping immune response profiles: The emerging scenario from helminth immunology. *Eur. J. Immunol.* 37, 3319–3326 (2007).
- 115. Maizels, R. M. Parasitic helminth infections and the control of human allergic and autoimmune disorders. *Clin. Microbiol. Infect.* 22, 481–486 (2016).
- 116. Nutman, T. B. Looking beyond the induction of Th2 responses to explain immunomodulation by helminths. *Parasite Immunol.* 37, 304–313 (2015).
- 117. Díaz, A. & Allen, J. E. Mapping immune response profiles: The emerging scenario from helminth immunology. *Eur. J. Immunol.* 37, 3319–3326 (2007).
- 118. Liu, Y. *et al.* Increased expression of TGF-β1 in correlation with liver fibrosis during Echinococcus granulosus infection in mice. *Korean J. Parasitol.* 54, 519–525 (2016).
- 119. Amri, M. & Touil-Boukoffa, C. A protective effect of the laminated layer on Echinococcus granulosus survival dependent on upregulation of host arginase. *Acta Trop.* 149, 186–194 (2015).
- 120. Soufli, I. *et al.* Crude extract of hydatid laminated layer from Echinococcus granulosus cyst attenuates mucosal intestinal damage and inflammatory responses in Dextran Sulfate Sodium induced colitis in mice. *J. Inflamm.* (*United Kingdom*) 12, 1–12 (2015).
- 121. Wang, J. *et al.* Depletion of Foxp3+ tregs improves control of larval echinococcus multilocularis infection by promoting co-stimulation and TH1/17 immunity. *Immunity, Inflamm. Dis.* 5, 435–447 (2017).
- 122. Pan, W. *et al.* Surveillance on the Status of Immune Cells after Echinnococcus granulosus Protoscoleces Infection in Balb/c Mice. *PLoS One* 8, 4–11 (2013).
- 123. Zhou, X. *et al.* Myeloid-derived suppressor cells exert immunosuppressive function on the T helper 2 in mice infected with Echinococcus granulosus. *Exp. Parasitol.* 215, 107917 (2020).
- 124. Hegde, S., Leader, A. M. & Merad, M. MDSC: Markers, development, states, and unaddressed complexity. Immunity 54, 875–884 (2021).
- 125. Ferreira, A. M., Diaz, A., Fernandez, C. & Sim, R. B. Assessment of in vivo complement activation on the Echinococcus granulosus hydatid cyst wall. *Parasite Immunol.* 23, 655–658 (2001).
- 126. Díaz, A., Ferreira, A. & Sim, R. B. Complement evasion by Echinococcus granulosus: sequestration of host factor H in the hydatid cyst wall. *J. Immunol.* 158, (1997).
- 127. Barrios, A. A. *et al.* Inefficient and abortive classical complement pathway activation by the calcium inositol hexakisphosphate component of the Echinococcus granulosus laminated layer. *Immunobiology* 224, 710–719 (2019).
- 128. Richards, K. S., Arme, C. & Bridges, J. Echinococcus Granulosus Equinus: An Ultrastructural Study of Murine Tissue Response to Hydatid Cysts. *Parasitology* 86, 407–417 (1983).
- 129. Casaravilla, C. *et al.* Unconventional maturation of dendritic cells induced by particles from the laminated layer of larval Echinococcus granulosus. *Infect. Immun.* 82, 3164–3176 (2014).
- 130. A, D. Immunology... Protein Cell 4, 1–2 (2022).
- 131. Pittini, Á. *et al.* Particles from the echinococcus granulosus laminated layer inhibit CD40 upregulation in dendritic cells by interfering with akt activation. *Infect. Immun.* 87, 1–19 (2019).
- 132. Casaravilla, C., Pittini, Á., Rückerl, D., Allen, J. E. & Díaz, Á. Activation of the NLRP3 Inflammasome by Particles from the Echinococcus granulosus Laminated Layer. *Infect. Immun.* 88, (2020).
- 133. Chong, S. *et al.* Echinococcus multilocularis drives the polarization of macrophages by regulating the RhoA-MAPK signaling pathway and thus affects liver fibrosis. *Bioengineered* 13, 8747–8758 (2022).
- 134. Vendelova, E., Lutz, M. B. & Hrčková, G. Immunity and immune modulation elicited by the larval cestode Mesocestoides vogae and its products. *Parasite Immunol.* 37, 493–504 (2015).

- 135. Zawistowska-Deniziak, A., Basalaj, K., Strojny, B. & Mlocicki, D. New data on human macrophages polarization by Hymenolepis diminuta tapeworm-An in vitro study. *Front. Immunol.* 8, 1–15 (2017).
- 136. Aira, N., Andersson, A. M., Singh, S. K., McKay, D. M. & Blomgran, R. Species dependent impact of helminthderived antigens on human macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis: Direct effect on the innate anti-mycobacterial response. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, 1–23 (2017).
- 137. Guo, X. *et al.* Molecular cloning and functional characterization of a thioredoxin peroxidase gene in Echinococcus multilocularis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 245, 111408 (2021).
- 138. Peón, A. N., Espinoza-Jiménez, A. & Terrazas, L. I. Immunoregulation by taenia crassiceps and its antigens. *Biomed Res. Int.* 2013, (2013).
- 139. Becerra-Díaz, M. & Terrazas, L. I. Taenia crassiceps infection and its excreted/secreted products inhibit STAT1 activation in response to IFN-γ. *Int. J. Parasitol.* 44, 613–623 (2014).
- 140. Tamarozzi Id, F. *et al.* Serology for the diagnosis of human hepatic cystic echinococcosis and its relation with cyst staging: A systematic review of the literature with meta-analysis. (2021). doi:10.1371/journal.pntd.0009370
- 141. Edwards, R. Immunodiagnostics a practical approach. (Oxford University Press, UK, 1999).
- 142. Siles-Lucas, M., Casulli, A., Conraths, F. J. & Muller, N. Laboratory Diagnosis of Echinococcus spp . in Human Patients and Infected Animals. 159–257 (2017). doi:10.1016/bs.apar.2016.09.003
- 143. Higuita, N. I. A., Brunetti, E. & McCloskey, C. Cystic Echinococcosis. J. Clin. Microbiol. 54, 518–523 (2016).
- 144. Brunetti, E., Kern, P. & Vuitton, D. A. Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Trop.* 114, 1–16 (2010).
- 145. Siles-Lucas, M. *et al.* Isolation and characterization of exosomes derived from fertile sheep hydatid cysts. *Vet. Parasitol.* 236, 22–33 (2017).
- 146. Lorenzo, C. *et al.* Comparative analysis of the diagnostic performance of six major Echinococcus granulosus antigens assessed in a double-blind, randomized multicenter study. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2764–2770 (2005).
- 147. Díaz, A., Casaravilla, C., Barrios, A. A. & Ferreira, A. M. Parasite molecules and host responses in cystic echinococcosis. *Parasite Immunol.* 38, 193–205 (2016).
- 148. Siracusano, A. *et al.* Molecular cross-talk in host-parasite relationships: The intriguing immunomodulatory role of Echinococcus antigen B in cystic echinococcosis. *Int. J. Parasitol.* 38, 1371–1376 (2008).
- 149. Thompson, R. C. A. Neglected zoonotic helminths: Hymenolepis nana, Echinococcus canadensis and Ancylostoma ceylanicum. *Clin. Microbiol. Infect.* 21, 426–432 (2015).
- 150. Brunetti, E. Cystic Echinococcosis. Trop. Dis. Travel. 12, 264–274 (2010).
- 151. Larrieu, E. & Zanini, F. Critical analysis of cystic echinococcosis control programs and praziquantel use in South America, 1974-2010. *Rev. Panam. Salud Publica/Pan Am. J. Public Heal.* 31, 81–87 (2012).
- 152. Tielens AGM; Hellemond IJ, Tielens, A. & Hellemond, IJ. Unusual Aspects of Metabolism in Flatworm Parasites. in Parasitic Flatworms Molecular Biology, Biochemistry, Immunology and Physiology (eds. Maule, A. G. & Marks, N. J.) 387–407 (CAB International., 2006).
- 153. Mc Manus, D. P. & Smyth, J. D. Intermediary Carbohydrate Metabolism in Protoscoleces of Echinococcus Granulosus (Horse and Sheep Strains) and E. Multilocularis. *Parasitology* 84, 351–366 (1982).
- 154. Ritler, D. *et al.* In vitro metabolomic footprint of the Echinococcus multilocularis metacestode. *Sci. Rep.* 9, 1–13 (2019).
- 155. Otero, L., Martínez-Rosales, C., Barrera, E., Pantano, S. & Salinas, G. Complex I and II Subunit Gene Duplications Provide Increased Fitness to Worms. *Front. Genet.* 10, 1–10 (2019).
- 156. Zheng, H. et al. The genome of the hydatid tapeworm Echinococcus granulosus. Nat. Genet. 45, 1168–77 (2013).
- 157. Bahr, J. ., Frayha, G. & Hajjar, J. MECHANISM OF CHOLESTEROL ABSORPTION BY THE HYDATID CYSTS OF ECHINOCOCCUS GRANULOSUS (CESTODA) JURJUS. *Comp Biochem. Physiol* 62A, 485–490 (1979).

- 158. Frayha, G. J. Synthesis of certain cholesterol precursors by hydatid protoscoleces of Echinococcus granulosus and cysticerci of Taenia hydatigena. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 49, 93–98 (1974).
- 159. Frayha, G. J. A study on the synthesi and absorption of cholesterol in hydatid cysts (Echinococcus granulosus). *Comp. Biochem. Physiol.* 27, (1968).
- 160. Cockcroft, S. Mammalian lipids: Structure, synthesis and function. Essays Biochem. 65, 813–845 (2021).
- 161. Feingold, K. R. & Grunfeld, C. Introduction to Lipids and Lipoproteins. Endotext (2021).
- 162. Alvite, G. & Esteves, A. Lipid binding proteins from parasitic platyhelminthes. Front. Physiol. 3 SEP, 1–8 (2012).
- 163. Alvite, G., Canclini, L., Corvo, I. & Esteves, A. Two novel Mesocestoides vogae fatty acid binding proteins -Functional and evolutionary implications. *FEBS J.* 275, 107–116 (2008).
- 164. Xu, A. *et al.* Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin. Chem.* 52, 405–413 (2006).
- 165. Ishimura, S. *et al.* Circulating levels of fatty acid-binding protein family and metabolic phenotype in the general population. *PLoS One* 8, 2–8 (2013).
- 166. González-Sapienza, G., Lorenzo, C. & Nieto, A. Improved immunodiagnosis of cystic hydatid disease by using a synthetic peptide with higher diagnostic value than that of its parent protein, Echinococcus granulosus antigen B. J. Clin. Microbiol. 38, 3979–3983 (2000).
- 167. Ortona, E. *et al.* Native and recombinant antigens in the immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. *Parasite Immunol.* 22, 553–559 (2000).
- Saghir, N., Conde, P. J., Brophy, P. M. & Barrett, J. A new diagnostic tool for neurocysticercosis is a member of a cestode specific hydrophobic ligand binding protein family. *FEBS Lett.* 487, 181–184 (2000).
- 169. Saghir, N., Conde, P. J., Brophy, P. M. & Barrett, J. Biochemical characterisation of a hydrophobic ligand binding protein from the tapeworm Hymenolepis diminuta. *Int. J. Parasitol.* 31, 653–660 (2001).
- 170. Chemale, G., Ferreira, H. B., Barrett, J., Brophy, P. M. & Zaha, A. Echinococcus granulosus antigen B hydrophobic ligand binding properties. *Biochim. Biophys. Acta* 1747, 189–94 (2005).
- 171. Barrett, J., Saghir, N., Timanova, a, Clarke, K. & Brophy, P. M. Characterisation and properties of an intracellular lipid-binding protein from the tapeworm Moniezia expansa. *Eur. J. Biochem.* 250, 269–275 (1997).
- 172. Kim, S. H., Bae, Y. A., Yang, Y., Hong, S. T. & Kong, Y. Paralogous proteins comprising the 150kDa hydrophobicligand-binding-protein complex of the Taenia solium metacestode have evolved non-overlapped binding affinities toward fatty acid analogs. *Int. J. Parasitol.* 41, 1207–1215 (2011).
- 173. Rahman, M. *et al.* Characterization of hydrophobic-ligand-binding proteins of Taenia solium that are expressed specifically in the adult stage. *Parasitology* 139, 1361–1374 (2012).
- 174. Janssen, D. & Barrett, J. A novel lipid-binding protein from the cestode Moniezia expansa. *Biochem. J.* 311, 49–57 (1995).
- 175. Saghir, N., Conde, P. J., Brophy, P. M. & Barrett, J. A new diagnostic tool for neurocysticercosis is a member of a cestode specific hydrophobic ligand binding protein family. *FEBS Lett.* 487, 181–4 (2000).
- 176. Lee, E. G. *et al.* A hydrophobic ligand-binding protein of the Taenia solium metacestode mediates uptake of the host lipid: Implication for the maintenance of parasitic cellular homeostasis. *Proteomics* 7, 4016–4030 (2007).
- 177. Bae, Y. A., Xue, Y., Lee, E. G., Kim, S. H. & Kong, Y. Bioactive molecules of Taenia solium metacestode, a causative agent of neurocysticercosis. *Expert Rev. Proteomics* 7, 691–707 (2010).
- 178. Lee, E. G. *et al.* Proteomic analysis of a 120 kDa protein complex in cyst fluid of Taenia solium metacestode and preliminary evaluation of its value for the serodiagnosis of neurocysticercosis. *Parasitology* 131, 867–879 (2005).
- 179. Ferrer, E. *et al.* Molecular cloning and characterisation of Ts8B1, Ts8B2 and Ts8B3, three new members of the Taenia solium metacestode 8 kDa diagnostic antigen family. *Mol. Biochem. Parasitol.* 152, 90–100 (2007).
- 180. Frosch, P. M., Mühlschlegel, F., Sygulla, L., Hartmann, M. & Frosch, M. Identification of a cDNA clone from the larval

stage of Echinococcus granulosus with homologies to the E. multilocularis antigen EM10-expressing cDNA clone. *Parasitol. Res.* 80, 703–705 (1994).

- 181. Chemale, G., Haag, K., Ferreira, H. & Zaha, A. Echinococcus granulosus antigen B is encoded by a gene family. *Mol. Biochem. Parasitol.* 116, 233–237 (2001).
- 182. Fernández, V., Ferreira, H., Fernández, C., Zaha, A. & Nieto, A. Molecular characterisation of a novel 8-kDa subunit of Echinococcus granulosus antigen B. *Mol. Biochem. Parasitol.* 77, 247–250 (1996).
- 183. Shepherd, J. C., Aitken, A. & McManus, D. P. A protein secreted in vivo by Echinococcus granulosus inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44, 81–90 (1991).
- 184. Barrett, J., Saghir, N., Timanova, A., Clarke, K. & Brophy, P. M. Characterisation and properties of an intracellular lipid-binding protein from the tapeworm Moniezia expansa. *Eur. J. Biochem.* 250, 269–275 (1997).
- 185. Zhang, W. *et al.* The Echinococcus granulosus antigen B gene family comprises at least 10 unique genes in five subclasses which are differentially expressed. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, (2010).
- 186. Oriol, R., Williams, J. F., Pérez Esandi, M. V & Oriol, C. Purification of lipoprotein antigens of Echinococcus granulosus from sheep hydatid fluid. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20, 569–74 (1971).
- Oriol, C. & Oriol, R. Physiocochemical properties of a lipoprotein antigen of Echinococcus granulosus. Am. J. Trop. Med. Hyg. 24, 96–100 (1975).
- 188. Williams, J. F., Pérez Esandi, M. V & Oriol, R. Evaluation of purified lipoprotein antigens of Echinococcus granulosus in the immunodiagnosis of human infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20, 575–9 (1971).
- 189. Leggatt, G. & DP, M. Identification and diagnostic value of a major antibody epitope on the I 2 kDa antigen from Echinococcus granulosus (hydatid disease) cyst fluid. (1994).
- 190. Barbieri, M., Fernández, V., González, G., Luaces, V. M. & Nieto, A. Diagnostic evaluation of a synthetic peptide derived from a novel antigen B subunit as related to other available peptides and native antigens used for serology of cystic hydatidosis. *Parasite Immunol.* 20, 51–61 (1998).
- 191. González-Sapienza, G. & Cachau, R. E. Identification of critical residues of an immunodominant region of Echinococcus granulosus antigen B. *J. Biol. Chem.* 278, 20179–20184 (2003).
- 192. Lightowlers, M. W., Liu, D. Y., Haralambous, A. & Rickard, M. D. Subunit composition and specificity of the major cyst fluid antigens of Echinococcus granulosus. *Mol. Biochem. Parasitol.* 37, 171–82 (1989).
- 193. González, G. *et al.* Two different 8 kDa monomers are involved in the oligomeric organization of the native Echinococcus granulosus antigen B. *Parasite Immunol.* 18, 587–596 (1996).
- 194. Rott, M. B. *et al.* Comparative analysis of two different subunits of antigen B from Echinococcus granulosus: Gene sequences, expression in Escherichia coli and serological evaluation. *Acta Trop.* 75, 331–340 (2000).
- 195. Arend, a. C., Zaha, a., Ayala, F. J. & Haag, K. L. The Echinococcus granulosus antigen B shows a high degree of genetic variability. *Exp. Parasitol.* 108, 76–80 (2004).
- 196. Kamenetzky, L. *et al.* High polymorphism in genes encoding antigen B from human infecting strains of Echinococcus granulosus. *Parasitology* 131, 805–815 (2005).
- 197. Muzulin, P. M., Kamenetzky, L., Gutierrez, A. M., Guarnera, E. A. & Rosenzvit, M. C. Echinococcus granulosus antigen B gene family : Further studies of strain polymorphism at the genomic and transcriptional levels. 118, 156–164 (2008).
- 198. Silva-Álvarez, V. *et al.* Lipid-Free Antigen B Subunits from Echinococcus granulosus: Oligomerization, Ligand Binding, and Membrane Interaction Properties. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003552 (2015).
- 199. Olson, P. D., Zarowiecki, M., Kiss, F. & Brehm, K. Cestode genomics progress and prospects for advancing basic and applied aspects of flatworm biology. *Parasite Immunol.* 34, 130–150 (2012).
- 200. Monteiro, K. M., Zaha, A. & Ferreira, H. B. Recombinant subunits as tools for the structural and functional characterization of Echinococcus granulosus antigen B. *Exp. Parasitol.* 119, 490–498 (2008).
- 201. Mamuti, W. et al. Recent advances in characterization of Echinococcus antigen B. Parasitol. Int. 55, 57–62 (2006).

- 202. Monteiro, K. M. *et al.* Self-assembly and structural characterization of Echinococcus granulosus antigen B recombinant subunit oligomers. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* 1774, 278–285 (2007).
- 203. Silva-Álvarez, V. *et al.* Echinococcus granulosus antigen B: A Hydrophobic Ligand Binding Protein at the hostparasite interface. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids* 93, 17–23 (2015).
- 204. Monteiro, K. M. *et al.* Echinococcus granulosus Antigen B structure: Subunit composition and oligomeric states. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, (2012).
- 205. Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G. . A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem* 497–509 (1957).
- Sánchez, F. et al. Ultrastructural localization of major hydatid fluid antigens in brood capsules and protoscoleces of Echinococcus granulosus of human origin. Parasite Immunol. 15, 441–7 (1993).
- 207. Riganò, R. *et al.* Modulation of Human Immune Response by Echinococcus granulosus Antigen B and Its Possible Role in Evading Host Defenses Modulation of Human Immune Response by Echinococcus granulosus Antigen B and Its Possible Role in Evading Host Defenses. 69, 288–296 (2001).
- 208. Ramos, A. L. Avances en la estructura y función de la lipoproteína B de Echinococcus granulosus. (2007).
- 209. Fielding, C. J. & Fielding, P. E. Dynamics of lipoprotein transport in the circulatory system. in *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (ed. Vance, D. E. V. and J. E.) 533–553 (Elsevier B.V., 2008). doi:10.1016/B978-044453219-0.50021-0
- 210. Monteiro, K. M., de Carvalho, M. O., Zaha, A. & Ferreira, H. B. Proteomic analysis of the Echinococcus granulosus metacestode during infection of its intermediate host. *Proteomics* 10, 1985–1999 (2010).
- 211. Odegaard, J. I. & Chawla, A. The immune system as a sensor of the metabolic state. Immunity 38, 644–54 (2013).
- 212. Davies, L. C., Jenkins, S. J., Allen, J. E. & Taylor, P. R. Tissue-resident macrophages. *Nat. Immunol.* 14, 986–995 (2013).
- 213. Davies, L. C. & Taylor, P. R. Tissue-resident macrophages: Then and now. Immunology 144, 541–548 (2015).
- 214. De Maeyer, R. P. H. & Chambers, E. S. The impact of ageing on monocytes and macrophages. *Immunol. Lett.* 230, 1–10 (2021).
- 215. van Furth, R. *et al.* The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull. World Health Organ.* 46, 845–852 (1972).
- 216. Bain, C. C. *et al.* Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat. Immunol.* 15, 929–937 (2014).
- 217. McGovern, N. *et al.* Human dermal CD14+ cells are a transient population of monocyte-derived macrophages. *Immunity* 41, 465–477 (2014).
- 218. Yona, S. *et al.* Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity* 38, 79–91 (2013).
- 219. Schulz, C. *et al.* A lineage of myeloid cells independent of myb and hematopoietic stem cells. *Science (80-.).* 335, 86–90 (2012).
- 220. Ginhoux, F. *et al.* Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* (80-.). 330, 841–845 (2010).
- 221. Geissmann, F. *et al.* Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science (80-.).* 327, 656–661 (2010).
- 222. Guilliams, M. *et al.* Dendritic cells, monocytes and macrophages: A unified nomenclature based on ontogeny. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 571–578 (2014).
- 223. Blériot, C., Chakarov, S. & Ginhoux, F. Determinants of Resident Tissue Macrophage Identity and Function. Immunity 52, 957–970 (2020).
- 224. Jenkins, S. J. & Allen, J. E. The expanding world of tissue-resident macrophages. Eur. J. Immunol. 51, 1882–1896
(2021).

- 225. Ferrer, I. R. *et al.* A wave of monocytes is recruited to replenish the long-term Langerhans cell network after immune injury. *Sci. Immunol.* 4, 1–15 (2019).
- 226. Guilliams, M., Thierry, G. R., Bonnardel, J. & Bajenoff, M. Establishment and Maintenance of the Macrophage Niche. Immunity 52, 434–451 (2020).
- 227. Greter, M. *et al.* Stroma-Derived Interleukin-34 Controls the Development and Maintenance of Langerhans Cells and the Maintenance of Microglia. *Immunity* 37, 1050–1060 (2012).
- 228. Wang, Y. *et al.* IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat. Immunol.* 13, 753–760 (2012).
- 229. Martinez, F. O. & Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 6, 1–13 (2014).
- 230. Tarique AA, Logan J, Thomas E, Holt PG, Sly PD, F. E. Phenotypic, functional and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages. *AJRCMB* 3, 676–688 (2015).
- 231. Wei, Y., Wang, M., Ma, Y., Que, Z. & Yao, D. Classical Dichotomy of Macrophages and Alternative Activation Models Proposed with Technological Progress. (2021). doi:10.1155/2021/9910596
- Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 958– 969 (2008).
- 233. Sica, A; Mantovani, A. Mphage_M1-M2_rev_JCl2012. J. Clin. Invest. 122, 787–795 (2012).
- 234. O'Shea, J. J. & Murray, P. J. Cytokine Signaling Modules in Inflammatory Responses. Immunity 28, 477–487 (2008).
- 235. Gordon, S. Pattern recognition receptors: Doubling up for the innate immune response. Cell 111, 927–930 (2002).
- 236. Zhang, L. & Wang, C. C. Inflammatory response of macrophages in infection. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 13, 138–152 (2014).
- 237. Loke, P. *et al.* Alternative Activation Is an Innate Response to Injury That Requires CD4 + T Cells to be Sustained during Chronic Infection . *J. Immunol.* 179, 3926–3936 (2007).
- 238. Ruckerl, D. & Allen, J. E. Macrophage proliferation, provenance, and plasticity in macroparasite infection. 113–133 (2014).
- 239. Shi, H. P. et al. Effect of supplemental ornithine on wound healing. J. Surg. Res. 106, 299–302 (2002).
- 240. Clark, T. C., Tinsley, J., Sigholt, T., Macqueen, D. J. & Martin, S. A. M. Arginine, ornithine and citrulline supplementation in rainbow trout: Free amino acid dynamics and gene expression responses to bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol.* 98, 374–390 (2020).
- 241. Rutschman, R. *et al.* Cutting Edge: Stat6-Dependent Substrate Depletion Regulates Nitric Oxide Production. *J. Immunol.* 166, 2173–2177 (2001).
- 242. Raes, G. *et al.* Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 71, 597–602 (2002).
- Webb, D. C., McKenzie, A. N. J. & Foster, P. S. Expression of the Ym2 lectin-binding protein is dependent on interleukin (IL)-4 and IL-13 signal transduction: Identification of a novel allergy-associated protein. J. Biol. Chem. 276, 41969–41976 (2001).
- 244. Munitz, A. *et al.* Resistin-like molecule α enhances myeloid cell activation and promotes colitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 122, 1200–1208 (2008).
- 245. Jenkins, S. J., Ruckerl, D., Cook, P. C. & Jones, L. H. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science (80-.).* 332, 1284–1288 (2011).
- 246. Edwards P, Zhang X, Frauwirth KA, M. M. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *Mon. Not. R. Astron. Soc.* 301, 782–786 (2006).

- 247. Sternberg, E. M. Neural regulation of innate immunity: A coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 318–328 (2006).
- 248. Murray, P. J. *et al.* Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* 41, 14–20 (2014).
- 249. Ghosn, E. E. B. *et al.* Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *PNAS* (2009). doi:10.1073/pnas.0915000107
- 250. Schleicher, U., Hesse, A. & Bogdan, C. Minute numbers of contaminant CD8 & T cells or CD11b & CD11c & NK cells are the source of IFN- 🛛 in IL12 / IL-18 stimulated mouse macrophage populations. 105, 1319–1329 (2016).
- 251. Cain, D. W. *et al.* Identification of a Tissue-Specific, C/EBPβ-Dependent Pathway of Differentiation for Murine Peritoneal Macrophages. *J. Immunol.* 191, 4665–4675 (2013).
- 252. Cassado, A. dos A., D'Império Lima, M. R. & Bortoluci, K. R. Revisiting Mouse Peritoneal Macrophages: Heterogeneity, Development, and Function. *Front. Immunol.* 6, (2015).
- 253. Davies, L. C. *et al.* A quantifiable proliferative burst of tissue macrophages restores homeostatic macrophage populations after acute inflammation. *Eur. J. Immunol.* 41, 2155–2164 (2011).
- 254. Okabe, Y. & Medzhitov, R. Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages. *Cell* 157, 832–844 (2014).
- 255. Cassado, A. dos A. *et al.* Cellular renewal and improvement of local cell effector activity in peritoneal cavity in response to infectious stimuli. *PLoS One* 6, (2011).
- Barth, M. W., Hendrzak, J. A., Melnicoff, M. J. & Morahan, P. S. Review of the macrophage disappearance reaction. J. Leukoc. Biol. 57, 361–367 (1995).
- 257. Rosas, M. *et al.* The transcription factor Gata6 links tissue macrophage phenotype and proliferative renewal. *Science (80-.).* 344, 645–648 (2014).
- 258. Guilliams, M., Mildner, A. & Yona, S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity* 49, 595–613 (2018).
- 259. Cronk, J. C. *et al.* Peripherally derived macrophages can engraft the brain independent of irradiation and maintain an identity distinct from microglia. *J. Exp. Med.* 215, 1627–1647 (2018).
- 260. Gundra, U. M. *et al.* Vitamin A mediates conversion of monocyte-derived macrophages into tissue-resident macrophages during alternative activation. *Nat. Immunol.* 18, 642–653 (2017).
- 261. Fife, B. T., Huffnagle, G. B., Kuziel, W. A. & Karpus, W. J. CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 192, 899–905 (2000).
- 262. Ma, W. T., Gao, F., Gu, K. & Chen, D. K. The role of monocytes and macrophages in autoimmune diseases: A comprehensive review. *Front. Immunol.* 10, 1–24 (2019).
- 263. Bain, C. C. *et al.* Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative contextdependent fates of the same Ly6C hi monocyte precursors. *Mucosal Immunol.* 6, 498–510 (2013).
- 264. Askenase, M. H. *et al.* Bone-Marrow-Resident NK Cells Prime Monocytes for Regulatory Function during Infection. *Immunity* 42, 1130–1142 (2015).
- 265. Nahrendorf, M. *et al.* The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J. Exp. Med.* 204, 3037–3047 (2007).
- Hilgendorf, I., Swirski, F. K. & Robbins, C. S. Monocyte fate in atherosclerosis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 35, 272–279 (2015).
- 267. Graubardt, N. *et al.* Ly6Chi monocytes and their macrophage descendants regulate neutrophil function and clearance in acetaminophen-induced liver injury. *Front. Immunol.* 8, 1–17 (2017).
- 268. Zigmond, E. *et al.* Infiltrating Monocyte-Derived Macrophages and Resident Kupffer Cells Display Different Ontogeny and Functions in Acute Liver Injury. *J. Immunol.* 193, 344–353 (2014).

- 269. Ramachandran, P. *et al.* Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, (2012).
- 270. Kratofil, R. M., Kubes, P. & Deniset, J. F. Monocyte conversion during inflammation and injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37, 35–42 (2017).
- 271. Egawa, M. *et al.* Inflammatory Monocytes Recruited to Allergic Skin Acquire an Anti-inflammatory M2 Phenotype via Basophil-Derived Interleukin-4. *Immunity* 38, 570–580 (2013).
- 272. Hanna, R. N. et al. Patrolling monocytes control tumor metastasis to the lung. Science (80-.). 350, 985–990 (2015).
- 273. Patel, B., Ismahil, M. A., Hamid, T., Bansal, S. S. & Prabhu, S. D. Mononuclear phagocytes are dispensable for cardiac remodeling in established pressure-overload heart failure. *PLoS One* 12, 1–17 (2017).
- 274. Ożańska, A., Szymczak, D. & Rybka, J. Pattern of human monocyte subpopulations in health and disease. *Scand. J. Immunol.* 92, 1–13 (2020).
- Orozco, S. L., Canny, S. P. & Hamerman, J. A. Signals governing monocyte differentiation during inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* 73, 16–24 (2021).
- 276. Tamoutounour, S. *et al.* Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocytederived dendritic cells in mouse skin. *Immunity* 39, 925–938 (2013).
- 277. Jakubzick, C. *et al.* Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity* 39, 599–610 (2013).
- 278. Cros, J. *et al.* Human CD14dim Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity* 33, 375–386 (2010).
- 279. Wong, K. L. *et al.* Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 118, 16–32 (2011).
- Blériot, C. *et al.* Liver-Resident Macrophage Necroptosis Orchestrates Type 1 Microbicidal Inflammation and Type-2-Mediated Tissue Repair during Bacterial Infection. *Immunity* 42, 145–158 (2015).
- 281. Carlin, L. M. *et al.* Nr4a1-dependent Ly6Clow monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell* 153, 362–375 (2013).
- 282. Plebanek, M. P., Bhaumik, D., Bryce, P. J. & Shad Thaxton, C. Scavenger receptor type B1 and lipoprotein nanoparticle inhibit myeloid-derived suppressor cells. *Mol. Cancer Ther.* 17, 686–697 (2018).
- 283. Michaud, J. P. *et al.* Toll-like receptor 4 stimulation with the detoxified ligand monophosphoryl lipid A improves Alzheimer's disease-related pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 1941–1946 (2013).
- 284. Bartocci, A. *et al.* Macrophages specifically regulate the concentration of their own growth factor in the circulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 6179–6183 (1987).
- 285. Albillos, A., de Gottardi, A. & Rescigno, M. The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy. J. Hepatol. 72, 558–577 (2020).
- 286. Romero Hurtado, S. & Iregui, C. A. El Lipopolisacárido. 37-45 (2010).
- 287. Mazgaeen, L. & Gurung, P. Molecular Sciences Recent Advances in Lipopolysaccharide Recognition Systems. doi:10.3390/ijms21020379
- 288. Heine, H., Rietschel, E. T. & Ulmer, A. J. The biology of endotoxin. *Appl. Biochem. Biotechnol. Part B Mol. Biotechnol.* 19, 279–296 (2001).
- 289. Jerala, R. Structural biology of the LPS recognition. Int. J. Med. Microbiol. 297, 353–363 (2007).
- 290. Caroff, M. & Novikov, A. Lipopolysaccharides: structure, function and bacterial identi fi cation *. 0–9 (2020).
- 291. Raetz, C. R. H. & Whitfield, C. Lipopolysaccharide endotoxins. Annu. Rev. Biochem. 71, 635–700 (2002).
- 292. Rietschel, E. T. *et al.* The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity. *Immunobiology* 187, 169–190 (1993).

- 293. Rietschel, E. T. et al. activity endotoxin : mOle ..: ar ships of struetui to and fction ; LOM. FASEB J. 8, 217–225 (1994).
- 294. Cochet, F. & Peri, F. The role of carbohydrates in the lipopolysaccharide (LPS)/toll-like receptor 4 (TLR4) Signalling. Int. J. Mol. Sci. 18, (2017).
- 295. NR Cooper, D. M. Binding and activation of the first component of human complement by the lipid A region of lipopolysaccharides. *J Immunol.* June, 1862–8 (1978).
- 296. DC Morrison, L. K. Activation of the classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharides (LPS). *J Immunol.* Jan, 362–8 (1977).
- 297. Galanos, C. Physical state and biological activity of lipopolysaccharides. Toxicity and immunogenicity of the lipid A component. *Z Immunitatsforsch Exp Klin Immunol.* Jul, 214–29 (1975).
- 298. Kusumoto, S., Fukase, K. & Shiba, T. Key structures of bacterial peptidoglycan and lipopolysaccharide triggering the innate immune system of higher animals: Chemical synthesis and functional studies. *Proc. Japan Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 86, 322–337 (2010).
- 299. Tan, Y. & Kagan, J. C. A cross-disciplinary perspective on the innate immune responses to bacterial lipopolysaccharide. *Mol. Cell* 54, 212–223 (2014).
- 300. Meseguer, V. *et al.* TRPA1 channels mediate acute neurogenic inflammation and pain produced by bacterial endotoxins. *Nat. Commun.* 5, (2014).
- 301. Schauvliege, R., Vanrobaeys, J., Schotte, P. & Beyaert, R. Caspase-11 gene expression in response to lipopolysaccharide and interferon-γ requires nuclear factor-κB and signal transducer and activator of transcription (STAT) 1. J. Biol. Chem. 277, 41624–41630 (2002).
- 302. Hagar, J. A., Powell, D. A., Aachoui, Y., Ernst, R. K. & Miao, E. A. Cytoplasmic LPS activates caspase-11: Implications in TLR4-independent endotoxic shock. *Science (80-.).* 341, 1250–1253 (2013).
- 303. Gurung, P. et al. Toll or interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adaptor inducing interferon-β (TRIF)mediated caspase-11 protease production integrates toll-like receptor 4 (TLR4) protein- and NIrp3 inflammasomemediated host defense against enteropathogens. J. Biol. Chem. 287, 34474–34483 (2012).
- 304. Takeda, K. & Akira, S. Toll-Like receptors. Curr. Protoc. Immunol. 2015, 14.12.1-14.12.10 (2015).
- Horng, T., Barton, G. M., Flavell, R. A. & Medzhitov, R. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 420, 329–333 (2002).
- Yamamoto, M. *et al.* Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420, 324–329 (2002).
- 307. Akira, S. & Takeda, K. Toll-like receptor signalling. Nat. Rev. Immunol. 4, 499–511 (2004).
- Amoroso, M. *et al.* LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit. Rev. Immunol.* 31, 379–446 (2012).
- 309. Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. & Akira, S. Unresponsiveness of MyD88-Deficient Mice to Endotoxin responses that are favorable to the host by augmenting microbicidal activities of macrophages, overactivation of macrophages by large amounts of LPS results in TLR2 binds LPS in the presence of LBP and. *Immunity* 11, 115–122 (1999).
- Kagan, J. C. *et al.* TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-β. *Nat. Immunol.* 9, 361–368 (2008).
- 311. Meylan, E. *et al.* RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF κB activation. *Nat. Immunol.* 5, 503–507 (2004).
- 312. Häcker, H. *et al.* Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* 439, 204–207 (2006).
- 313. Oganesyan, G. *et al.* Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* 439, 208–211 (2006).
- 314. Sharma, S. et al. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. Science (80-.). 300,

1148–1151 (2003).

- 315. Hemmi, H. *et al.* The roles of two IκB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J. Exp. Med.* 199, 1641–1650 (2004).
- McWhirter, S. M. et al. IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 233–238 (2004).
- Perry, A. K., Chow, E. K., Goodnough, J. B., Yeh, W. C. & Cheng, G. Differential requirement for TANK-binding kinase-1 in type I interferon responses to toll-like receptor activation and viral infection. *J. Exp. Med.* 199, 1651–1658 (2004).
- 318. Bonhomme, D. *et al.* Leptospiral LPS escapes mouse TLR4 internalization and TRIF-associated antimicrobial responses through O antigen and associated lipoproteins. *PLoS Pathog.* 16, 1–26 (2020).
- 319. Esparza, G. A., Teghanemt, A., Zhang, D., Gioannini, T. L. & Weiss, J. P. Endotoxin•albumin complexes transfer endotoxin monomers to MD-2 resulting in activation of TLR4. *Innate Immun.* 18, 478–491 (2012).
- 320. Kobayashi, M. *et al.* Regulatory Roles for MD-2 and TLR4 in Ligand-Induced Receptor Clustering. *J. Immunol.* 176, 6211–6218 (2006).
- 321. Beveridge, T. J. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. J. Bacteriol. 181, 4725– 4733 (1999).
- 322. Weiss, J. & Barker, J. Diverse pro-inflammatory endotoxin recognition systems of mammalian innate immunity [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research* 7, 1–11 (2018).
- 323. Hailman, E. *et al.* Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. J. Exp. Med. 179, 269–277 (1994).
- 324. Ryu, J. K. *et al.* Reconstruction of LPS Transfer Cascade Reveals Structural Determinants within LBP, CD14, and TLR4-MD2 for Efficient LPS Recognition and Transfer. *Immunity* 46, 38–50 (2017).
- 325. Wu, Z., Zhang, Z., Lei, Z. & Lei, P. CD14: Biology and role in the pathogenesis of disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 48, 24–31 (2019).
- 326. Fitzgerald, K. A., Rowe, D. C. & Golenbock, D. T. Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD-2 complex. *Microbes Infect.* 6, 1361–1367 (2004).
- 327. Park, B. S. *et al.* The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458, 1191–1195 (2009).
- 328. Kruger, C. L., Zeuner, M. T., Cottrell, G. S., Widera, D. & Heilemann, M. Quantitative single-molecule imaging of TLR4 reveals ligand-specific receptor dimerization. *Sci. Signal.* 10, (2017).
- 329. Dagvadorj, J. *et al.* Lipopolysaccharide Induces Alveolar Macrophage Necrosis via CD14 and the P2X7 Receptor Leading to Interleukin-1α Release. *Immunity* 42, 640–653 (2015).
- 330. Lu, Y. C., Yeh, W. C. & Ohashi, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. Cytokine 42, 145–151 (2008).
- 331. Kawai, T. & Akira, S. TLR signaling. Semin. Immunol. 19, 24–32 (2007).
- 332. Nijland, R., Hofland, T. & Van Strijp, J. A. G. Recognition of LPS by TLR4: Potential for anti-inflammatory therapies. *Mar. Drugs* 12, 4260–4273 (2014).
- 333. Tanimura, N., Saitoh, S., Matsumoto, F., Akashi-Takamura, S. & Miyake, K. Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 368, 94–99 (2008).
- 334. Hoebe, K. et al. Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways. Nat. Immunol. 4, 1223–1229 (2003).
- 335. Shibata, T. et al. Intracellular TLR4/MD-2 in macrophages senses Gram-negative bacteria and induces a unique set of LPS-dependent genes. Int. Immunol. 23, 503–510 (2011).
- 336. Gandhapudi, S. K., Chilton, P. M. & Mitchell, T. C. TRIF Is Required for TLR4 Mediated Adjuvant Effects on T Cell Clonal Expansion. *PLoS One* 8, (2013).

- 337. Shen, H., Tesar, B. M., Walker, W. E. & Goldstein, D. R. Dual Signaling of MyD88 and TRIF Is Critical for Maximal TLR4-Induced Dendritic Cell Maturation. *J. Immunol.* 181, 1849–1858 (2008).
- 338. O'Brien AD, Rosenstreich DL, Scher I, Campbell GH, MacDermott RP, F. S. Genetic control of susceptibility to Salmonella typhimurium in mice: role of the LPS gene. *J Immunol.* Jan, 20–4 (1980).
- 339. O'Brien, G. C., Wang, J. H. & Redmond, H. P. Bacterial Lipoprotein Induces Resistance to Gram-Negative Sepsis in TLR4-Deficient Mice via Enhanced Bacterial Clearance. J. Immunol. 174, 1020–1026 (2005).
- Vanaja, S. K. et al. Bacterial Outer Membrane Vesicles Mediate Cytosolic Localization of LPS and Caspase-11 Activation. Cell 165, 1106–1119 (2016).
- 341. Deng, M. *et al.* The Endotoxin Delivery Protein HMGB1 Mediates Caspase-11-Dependent Lethality in Sepsis. *Immunity* 49, 740-753.e7 (2018).
- 342. Kim, H. M. & Kim, Y. M. HMGB1: LPS Delivery Vehicle for Caspase-11-Mediated Pyroptosis. *Immunity* 49, 582–584 (2018).
- 343. Fitzgerald, K. A. & Kagan, J. C. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. Cell 180, 1044–1066 (2020).
- 344. Mathur, A., Hayward, J. A. & Man, S. M. Molecular mechanisms of inflammasome signaling. *J. Leukoc. Biol.* 103, jlb.3MR0617-250R (2017).
- 345. Kayagaki, N. *et al.* Noncanonical Inflammasome Activation by Intracellular LPS Independent of TLR4. 130, 1246– 1249 (2013).
- 346. Shi, J. et al. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. Nature 514, 187–192 (2014).
- 347. Rathinam, V. A. K., Zhao, Y. & Shao, F. Innate immunity to intracellular LPS. Nat. Immunol. 20, 527–533 (2019).
- 348. Rühl, S. & Broz, P. Caspase-11 activates a canonical NLRP3 inflammasome by promoting K+ efflux. *Eur. J. Immunol.* 45, 2927–2936 (2015).
- Schmid-Burgk, J. L. et al. Caspase-4 mediates non-canonical activation of the NLRP3 inflammasome in human myeloid cells. Eur. J. Immunol. 45, 2911–2917 (2015).
- 350. Kayagaki, N. *et al.* Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature* 526, 666–671 (2015).
- He, Y., Hara, H. & Núñez, G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem. Sci.* 41, 1012–1021 (2016).
- 352. Vasudevan, S. O., Russo, A. J., Kumari, P., Vanaja, S. K. & Rathinam, V. A. A TLR4-independent critical role for CD14 in intracellular LPS sensing. *Cell Rep.* 39, (2022).
- 353. Tarasova, N. K. *et al.* Proteomics reveals a role for attachment in monocyte differentiation into efficient proinflammatory macrophages. *J. Proteome Res.* 14, 3940–3947 (2015).
- 354. Chanput, W., Mes, J., Vreeburg, R. A. M., Savelkoul, H. F. J. & Wichers, H. J. Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages: A tool to study inflammation modulating effects of food-derived compounds. *Food Funct.* 1, 254–261 (2010).
- 355. Lausen, M. *et al.* Proteomic analysis of lipopolysaccharide activated human monocytes. *Mol. Immunol.* 103, 257–269 (2018).
- 356. Fanying., M. & Lowell, C. A. Activation and Signal Transduction in the Absence of. J. Exp. Med. 185, (1997).
- 357. Zhang, W., Shen, X., Xie, L., Chu, M. & Ma, Y. MicroRNA-181b regulates endotoxin tolerance by targeting IL-6 in macrophage RAW264.7 cells. J. Inflamm. (United Kingdom) 12, 1–9 (2015).
- 358. Han, S., Chen, Z., Han, P., Hu, Q. & Xiao, Y. Activation of Macrophages by Lipopolysaccharide for Assessing the Immunomodulatory Property of Biomaterials. *Tissue Eng. - Part A* 23, 1100–1109 (2017).
- 359. Liu, L. *et al.* Progranulin inhibits LPS-induced macrophage M1 polarization via NF-kB and MAPK pathways. *BMC Immunol.* 21, 1–12 (2020).

- 360. Jayaraman, S. & Variyar, E. J. Role of taraxerone isolated from Leucas lavandulifolia, as an immunomodulator. *J. Ethnopharmacol.* 278, 114307 (2021).
- 361. Lagos, S. Estudio del potencial inmunomodulador del antígeno B de Echinococcus granulosus sobre células dendríticas. (2022).
- 362. Bosshart, H. & Heinzelmann, M. THP-1 cells as a model for human monocytes. Ann. Transl. Med. 4, 4–7 (2016).
- 363. Müller, M. M. *et al.* Global analysis of glycoproteins identifies markers of endotoxin tolerant monocytes and GPR84 as a modulator of TNFα expression. *Sci. Rep.* 7, 1–13 (2017).
- 364. Kang, N. *et al.* Anti-inflammatory and immune-modulatory properties of anemoside B4 isolated from Pulsatilla chinensis in vivo. *Phytomedicine* 64, 152934 (2019).
- 365. Boltz-Nitulescu, G. *et al.* Differentiation of rat bone marrow cells into macrophages under the influence of mouse L929 cell supernatant. *J. Leukoc. Biol.* 41, 83–91 (1987).
- 366. Bejta, F. *et al.* Oxidation of chylomicron remnant-like particles inhibits their uptake by THP-1 macrophages by apolipoprotein E-dependent processes. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1771, 901–910 (2007).
- 367. Rossotti, M. *et al.* Streamlined method for parallel identification of single domain antibodies to membrane receptors on whole cells. (2015). doi:10.1016/j.bbagen.2015.03.009
- 368. Alvez, R. OBTENCIÓN DE NANOBODIES ESPECÍFICOS CONTRA ROR-1 Y AgB DE ECHINOCOCCUS GRANULOSUS. (UdelaR, 2018).
- 369. Correa, A. et al. Generation of a vector suite for protein solubility screening. (2014). doi:10.3389/fmicb.2014.00067
- Bond, S. R. & Naus, C. C. RF-Cloning.org: An online tool for the design of restriction-free cloning projects. Nucleic Acids Res. 40, 209–213 (2012).
- 371. Kirkpatrick, R. B. *et al.* Heavy chain dimers as well as complete antibodies are efficiently formed and secreted from Drosophila via a BiP-mediated pathway. *J. Biol. Chem.* 270, 19800–19805 (1995).
- 372. Bunch TA, Grinblat Y, G. L. Characterization and use of the Drosophila metallothlortein promoter in cultured Drosophila melanogaster cells. *Nucleic Acids Res.* 16, 7269–7285 (1988).
- 373. Laemmli, U. . Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 680–5 (1970).
- 374. Schwarz, H., Schmittner, M., Duschl, A. & Horejs-Hoeck, J. Residual endotoxin contaminations in recombinant proteins are sufficient to activate human CD1c+ dendritic cells. *PLoS One* 9, (2014).
- 375. Obal, G. *et al.* Characterisation of the Native Lipid Moiety of Echinococcus granulosus Antigen B. doi:10.1371/journal.pntd.0001642
- 376. Bayot, A. *et al.* Identification of novel oxidized protein substrates and physiological partners of the mitochondrial ATP-dependent Lon-like protease Pim1. *J. Biol. Chem.* 285, 11445–11457 (2010).
- 377. Ramos, A. L. Avances en la estructura y función de la lipoproteína B (Antígeno B) de Echinococcus granulosus. (Universidad de la República, 2008).
- 378. Gordon, S., Hamann, J., Lin, H. H. & Stacey, M. F4/80 and the related adhesion-GPCRs. *Eur. J. Immunol.* 41, 2472–2476 (2011).
- 379. Kumar, P., Nagarajan, A. & Uchil, P. D. Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2018, 469–471 (2018).
- 380. Aziz, A. *et al.* Proteomic characterisation of Echinococcus granulosus hydatid cyst fluid from sheep, cattle and humans. *J. Proteomics* 74, 1560–1572 (2011).
- Ordovas, J. M. Fast ultracentrifugation methods for the separation of plasma lipoproteins. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 110, 93–103 (1998).
- 382. Folle, A. M. *et al.* Characterisation of Antigen B Protein Species Present in the Hydatid Cyst Fluid of Echinococcus canadensis G7 Genotype. (2017). doi:10.1371/journal.pntd.0005250

- 383. Silva-Álvarez, V. Caracterización estructural y funcional del Antígeno B de Echinococcus granulosus. (Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de La Plata, 2014).
- 384. Silva-álvarez, V. et al. Echinococcus granulosus Antigen B binds to monocytes and macrophages modulating cell response to inflammation. Parasit. Vectors 1–17 (2016). doi:10.1186/s13071-016-1350-7
- 385. Schneider, W. . Lipoprotein receptors. in *Biochem Lipids, Lipoproteins Membr* (eds. in Vance., D. E. V. and J. E. & Elsevier B.V, E.) 555–78 (2008).
- 386. PrabhuDas, M. et al. Standardizing Scavenger Receptor Nomenclature. J. Immunol. 192, 1997–2006 (2014).
- Jonas A, P. M. Lipoprotein structure. in *Biochem Lipids, Lipoproteins Membr* (ed. JE, V. D. and) 485–506 (Elsevier B. V, 2008).
- 388. Sun, H. Y. *et al.* Comparative proteomic profiling of plasma very-low-density and low-density lipoproteins. *Clin. Chim. Acta* 411, 336–344 (2010).
- 389. Bhutani, N. & Kajal, P. Hepatic echinococcosis: A review. Ann. Med. Surg. 36, 99–105 (2018).
- Silva-Álvarez, V. et al. Echinococcus granulosus Antigen B binds to monocytes and macrophages modulating cell response to inflammation. Parasit. Vectors 9, 69 (2016).
- Issekutz, A. C. Removal of gram-negative endotoxin from solutions by affinity chromatography. J. Immunol. Methods 61, 275–281 (1983).
- 392. Silva-Álvarez, V. *et al.* Lipid-free Antigen B Subunits from Echinococcus granulosus: Oligomerization, ligand binding, and membrane interaction properties. *PLoS Negl. Trop. Dis.* In press (2015).
- 393. González, G. *et al.* Two different 8 kDa monomers are involved in the oligomeric organization of the native Echinococcus granulosus antigen B. *Parasite Immunol.* 18, 587–96 (1996).
- 394. Rossotti, M. *et al.* Streamlined method for parallel identification of single domain antibodies to membrane receptors on whole cells. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1850, 1397–1404 (2015).
- 395. Backovic, M. & Krey, T. Stable Drosophila Cell Lines: An Alternative Approach to Exogenous Protein Expression. 1350, 349–358 (2016).
- 396. Schneider, I. Cell lines derived from late embryonic stages of Drosophila melanogaster. 27, 353–365 (1972).
- 397. Johansen, H. *et al.* Regulated expression at high copy number allows production of a growth-inhibitory oncogene product in Drosophila Schneider cells. *Genes Dev.* 3, 882–889 (1989).
- 398. Jorge, S. A. C., Santos, A. S., Spina, Â. & Pereira, C. A. Expression of the hepatitis B virus surface antigen in Drosophila S2 cells. *Cytotechnology* 57, 51–59 (2008).
- 399. March, M. E., Gross, C. C. & Long, E. O. Use of transfected Drosophila S2 cells to study NK cell activation. *Methods Mol. Biol.* 612, 67–88 (2010).
- 400. Elisia, I. *et al.* DMSO represses inflammatory cytokine production from human blood cells and reduces autoimmune arthritis. *PLoS One* 11, (2016).
- 401. Berbée, J. F. P., Havekes, L. M. & Rensen, P. C. N. Apolipoproteins modulate the inflammatory response to lipopolysaccharide. *J. Endotoxin Res.* 11, 97–103 (2005).
- 402. van Bergenhenegouwen, J. *et al.* Lipoproteins attenuate TLR2 and TLR4 activation by bacteria and bacterial ligands with differences in affinity and kinetics. *BMC Immunol.* 17, (2016).
- 403. Nishi, K., Yamasaki, K. & Otagiri, M. Serum Albumin, Lipid and Drug Binding. Subcellular Biochemistry 94, (2020).
- 404. Kopp, F., Kupsch, S. & Schromm, A. B. Lipopolysaccharide-binding protein is bound and internalized by host cells and colocalizes with LPS in the cytoplasm: Implications for a role of LBP in intracellular LPS-signaling. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1863, 660–672 (2016).
- 405. Tsukamoto, H. *et al.* Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein stimulates CD14-dependent Toll-like receptor 4 internalization and LPS-induced TBK1-IKKα-IRF3 axis activation. *J. Biol. Chem.* 293, 10186–10201 (2018).

- 406. Sofía Lagos. Análisis de la capacidad del antígeno B de Echinococcus granulosus de modular la activación de células dendríticas. (Universidad de la República, Uruguay, 2019).
- 407. Ramji, D. Atherosclerosis Methods and Protocols. (Humana Press, 2022).
- 408. AD Dergunov, V. B. Different Pathways of Cellular Cholesterol Efflux. Cell Biochem Biophys . Sep, 471–481 (2022).
- 409. Bou Ghosn, E. E. *et al.* Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 2568–2573 (2010).
- 410. Pesando, J. M., Servito Bouchard, L. & Mcmaster, B. E. *CD19 IS FUNCTIONALLY AND PHYSICALLY ASSOCIATED WITH SURFACE IMMUNOGLOBULIN*.
- 411. Arumugakani, G. *et al.* Early Emergence of CD19-Negative Human Antibody-Secreting Cells at the Plasmablast to Plasma Cell Transition. *J. Immunol.* 198, 4618–4628 (2017).
- 412. Tsuji, N., Rothstein, T. L. & Holodick, N. E. Antigen Receptor Specificity and Cell Location Influence the Diversification and Selection of the B-1a Cell Pool with Age. J. Immunol. 205, 741–759 (2020).
- 413. Bucala, R. Polyclonal activation of B lymphocytes by lipopolysaccharide requires macrophage-derived interleukin-1. Immunology 77, 477–82 (1992).
- 414. AM VALE, E HAYASHI, A GRANATO, HW SCHROEDER Jr, M BELLIO, and A. N. GENETIC CONTROL OF THE B CELL RESPONSE TO LPS: OPPOSING EFFECTS IN PERITONEAL VERSUS SPLENIC B CELL POPULATIONS. *Immunogenetics* 62, 41–48 (2010).
- 415. Klooster, R. *et al.* Improved anti-IgG and HSA affinity ligands: Clinical application of VHH antibody technology. *J. Immunol. Methods* 324, 1–12 (2007).
- Kumada, Y., Kang, B., Yamakawa, K., Kishimoto, M. & Horiuchi, J. I. Efficient preparation and site-directed immobilization of VHH antibodies by genetic fusion of poly(methylmethacrylate)-binding peptide (PMMA-Tag). *Biotechnol. Prog.* 31, 1563–1570 (2015).
- 417. Li, D. *et al.* Peptide linker affecting the activity retention rate of VHH in immunosorbents. *Biomolecules* 10, 1–12 (2020).
- 418. Estévez, M., Díaz-Velasco, S. & Martínez, R. Protein carbonylation in food and nutrition: a concise update. *Amino Acids* 54, 559–573 (2021).
- 419. Chemale, G., Ferreira, H. B., Barrett, J., Brophy, P. M. & Zaha, A. Echinococcus granulosus antigen B hydrophobic ligand binding properties. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* 1747, 189–194 (2005).
- 420. Manzano-Román, R., Sánchez-Ovejero, C., Hernández-González, A., Casulli, A. & Siles-Lucas, M. Serological Diagnosis and Follow-Up of Human Cystic Echinococcosis: A New Hope for the Future? *Biomed Res. Int.* 2015, (2015).
- 421. Virginio, V. G. *et al.* A set of recombinant antigens from Echinococcus granulosus with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. *Clin. Exp. Immunol.* 132, 309–315 (2003).
- 422. Jiang, L., Zhang, Y. guang, Liu, M. xia & Feng, Z. Analysis on the reactivity of five subunits of antigen B family in serodiagnosis of echinococcosis. *Exp. Parasitol.* 131, 85–91 (2012).
- 423. Tamarozzi, F. *et al.* Comparison of the Diagnostic Accuracy of Three Rapid Tests for the Serodiagnosis of Hepatic Cystic Echinococcosis in Humans. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, 1–13 (2016).
- 424. Santivañez, S. J. *et al.* Evaluation of a new immunochromatographic test using recombinant antigen B8/1 for diagnosis of cystic echinococcosis. *J. Clin. Microbiol.* 53, 3859–3863 (2015).
- 425. Hernández-González, A. *et al.* Improved serodiagnosis of cystic echinococcosis using the new recombinant 2B2t antigen. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, (2012).
- 426. Hernández-González, A. *et al.* Usefulness of four different Echinococcus granulosus recombinant antigens for serodiagnosis of unilocular hydatid disease (UHD) and postsurgical follow-up of patients treated for UHD. *Clin. Vaccine Immunol.* 15, 147–153 (2008).
- 427. Bernthaler, P., Epping, K., Schmitz, G., Deplazes, P. & Brehm, K. Molecular characterization of EmABP, an

apolipoprotein A-I binding protein secreted by the Echinococcus multilocularis metacestode. *Infect. Immun.* 77, 5564–5571 (2009).

- 428. Palm, W. *et al.* Lipoproteins in Drosophila melanogaster-assembly, function, and influence on tissue lipid composition. *PLoS Genet.* 8, (2012).
- 429. Matsuo, N. *et al.* Different mechanisms for selective transport of fatty acids using a single class of lipoprotein in Drosophila. *J. Lipid Res.* 60, 1199–1211 (2019).
- 430. Virginio, V. G. *et al.* A set of recombinant antigens from Echinococcus granulosus with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. (2003).
- 431. Phillips, M. C. New insights into the determination of HDL structure by apolipoproteins. *J. Lipid Res.* 54, 2034–2048 (2013).
- 432. Zhu, Y., Kodvawala, A. & Hui, D. Y. Apolipoprotein E inhibits Toll-like receptor (TLR)-3- and TLR-4-mediated macrophage activation through distinct mechanisms. *Biochem. J.* 428, 47–54 (2010).
- 433. Goldstein, J. L. & Brown, M. S. History of Discovery The LDL Receptor. (2009). doi:10.1161/ATVBAHA.108.179564
- 434. Schneider, W. . Lipoprotein receptors. (Elsevier B.V, 2008).
- 435. Jeon, H. & Blacklow, S. C. Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 535–562 (2005).
- 436. Dyer, C. A., Cistola, D. P., Parry, G. C. & Curtiss, L. K. Structural features of synthetic peptides of apolipoprotein E that bind the LDL receptor. *J. Lipid Res.* 36, 80–88 (1995).
- 437. Datta, G. *et al.* The receptor binding domain of apolipoprotein E, linked to a model class A amphipathic helix, enhances internalization and degradation of LDL by fibroblasts. *Biochemistry* 39, 213–220 (2000).
- 438. MAHLEY, R. W., JI, Z. -S, BRECHT, W. J., MIRANDA, R. D. & HE, D. Role of Heparan Sulfate Proteoglycans and the LDL Receptor-Related Protein in Remnant Lipoprotein Metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 737, 39–52 (1994).
- 439. Al-Haideri, M. *et al.* Heparan sulfate proteoglycan-mediated uptake of apolipoprotein E- triglyceride-rich lipoprotein particles: A major pathway at physiological particle concentrations. *Biochemistry* 36, 12766–12772 (1997).
- 440. Barbieri, M., Sterla, S., Battistoni, J. & Nieto, A. High performance latex reagent for hydatid serology using an echinococcus granulosuslipoprotein antigen fraction purified from cyst fluid in one step. *Int. J. Parasitol.* 23, 565–572 (1993).
- 441. Edwards, I. J., Xu, H., Obunike, J. C., Goldberg, I. J. & Wagner, W. D. Differentiated macrophages synthesize a heparin sulfate proteoglycan and an oversulfated chondroitin sulfate proteoglycan that bind lipoprotein lipase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15, 400–409 (1995).
- 442. Snigireva, A. V, Vrublevskaya, V. V, Afanasyev, V. N. & Morenkov, O. S. Cell Adhesion & Migration Cell surface heparan sulfate proteoglycans are involved in the binding of Hsp90α and Hsp90β to the cell plasma membrane Cell surface heparan sulfate proteoglycans are involved in the binding of Hsp90a and Hsp90b to the cell plasma membrane. (2015). doi:10.1080/19336918.2015.1103421
- 443. Alquraini, A. & El Khoury, J. Scavenger receptors. *Curr. Biol.* 30, R790–R795 (2020).
- 444. Plüddemann, A., Neyen, C. & Gordon, S. Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands. *Methods* 43, 207–217 (2007).
- 445. Viñals, M., Xu, S., Vasile, E. & Krieger, M. Identification of the N-linked glycosylation sites on the high density lipoprotein (HLD) receptor SR-BI and assessment of their effects on HDL binding and selective lipid uptake. *J. Biol. Chem.* 278, 5325–5332 (2003).
- 446. Shen, W. J., Azhar, S. & Kraemer, F. B. SR-B1: A Unique Multifunctional Receptor for Cholesterol Influx and Efflux. Annu. Rev. Physiol. 80, 95–116 (2018).
- 447. Terpstra, V., Amersfoort, E. S. Van, Velzen, A. G. Van, Kuiper, J. & Berkel, T. J. C. Van. Hepatic and Extrahepatic Scavenger Receptors: Function in Relation to Disease. *Arter. Thromb Vasc Biol* 20, 1860–1872 (2000).

- 448. Huh, H. Y., Pearce, S. F., Yesner, L. M., Schindler, J. L. & Silverstein, R. L. Regulated Expression of CD36 During Monocyte-to-Macrophage Differentiation: Potential Role of CD36 in Foam Cell Formation. 87, 2020–2028 (1996).
- 449. Voelker, D. . Lipid assembly into cell membranes. in *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (ed. Vance, D. E. V. and J. .) 441–484 (Elsevier B.V, 2008).
- 450. X, L. ABC Family Transporters. Adv Exp Med Biol. 1141, 13–100 (2019).
- 451. Ouimet, M., Barrett, T. J. & Fisher, E. A. HDL and reverse cholesterol transport: Basic mechanisms and their roles in vascular health and disease. *Circ. Res.* 124, 1505–1518 (2019).
- 452. Wang, X. *et al.* Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J. Clin. Invest.* 117, 2216–2224 (2007).
- 453. Machado-Lima A, Iborra RT, Pinto RS, Sartori CH, Olivera ER, Nakandakare ER, Stefano JT, Neto DG, Correa-Giannella ML, P. M. Advanced glycated albumin isolated from poorly controlled type 1 diabetes mellitus patients alters macrophage gene expression impairing ABCA-1- mediated reverse cholesterol transport. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 32, 13–23 (2014).
- 454. Machado-Lima, A. *et al.* In Type 2 Diabetes Mellitus Glycated Albumin Alters Macrophage Gene Expression Impairing ABCA1-Mediated Cholesterol Efflux. *J. Cell. Physiol.* 230, 1250–1257 (2015).
- 455. Iborra, R. T. *et al.* AGE-albumin enhances ABCA1 degradation by ubiquitin-proteasome and lysosomal pathways in macrophages. *J. Diabetes Complications* 32, 1–10 (2018).
- 456. Minanni, C. A. *et al.* Persistent Effect of Advanced Glycated Albumin Driving Inflammation and Disturbances in Cholesterol Efflux in Macrophages. (2021). doi:10.3390/nu13103633
- 457. Jessup, W., Gelissen, I. C., Gaus, K. & Kritharides, L. Roles of ATP binding cassette transporters A1 and G1, scavenger receptor BI and membrane lipid domains in cholesterol export from macrophages. *Curr. Opin. Lipidol.* 17, 247–257 (2006).
- 458. Gao, X., Gu, H., Li, G., Rye, K. A. & Zhang, D. W. Identification of an amino acid residue in ATP-binding cassette transport G1 critical for mediating cholesterol efflux. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1821, 552–559 (2012).
- 459. Sporstøl, M., Mousavi, S. A., Eskild, W., Roos, N. & Berg, T. ABCA1, ABCG1 and SR-BI: Hormonal regulation in primary rat hepatocytes and human cell lines. *BMC Mol. Biol.* 8, 1–8 (2007).
- 460. Fitzgerald, M. L. *et al.* ABCA1 and amphipathic apolipoproteins form high-affinity molecular complexes required for cholesterol efflux. *J. Lipid Res.* 45, 287–294 (2004).
- 461. Han, Y. H. et al. Enterically derived high-density lipoprotein restrains liver injury through the portal vein. Science 373, (2021).
- 462. Escolà-Gil, J. C. *et al.* Quantification of In Vitro Macrophage Cholesterol Efflux and In Vivo Macrophage-Specific Reverse Cholesterol Transport. in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1339, 211–233 (2015).
- 463. Zhu, H. *et al.* Evaluation of ITX 5061, a scavenger receptor B1 antagonist: Resistance selection and activity in combination with other hepatitis C virus antivirals. *J. Infect. Dis.* 205, 656–662 (2012).
- 464. Murphy, A. J. *et al.* High-Density Lipoprotein Reduces the Human Monocyte Inflammatory Response. (2008). doi:10.1161/ATVBAHA.108.168690
- 465. Cai, L., Wang, Z., Meyer, J. M., Ji, A. & Van Der Westhuyzen, D. R. Macrophage SR-BI regulates LPS-induced proinflammatory signaling in mice and isolated macrophages. *J. Lipid Res.* 53, 1472–1481 (2012).
- 466. Tang, C., Liu, Y., Kessler, P. S., Vaughan, A. M. & Oram, J. F. The Macrophage Cholesterol Exporter ABCA1 Functions as an Anti-inflammatory Receptor *. *J. Biol. Chem.* 284, 32336–32343 (2009).
- 467. Tamura, H., Reich, J. & Nagaoka, I. biomedicines Outstanding Contributions of LAL Technology to Pharmaceutical and Medical Science: Review of Methods, Progress, Challenges, and Future Perspectives in Early Detection and Management of Bacterial Infections and Invasive Fungal Diseases. (2021). doi:10.3390/biomedicines9050536
- Neun, B. W. & Dobrovolskaia, M. A. Detection of endotoxin in nano-formulations using limulus amoebocyte lysate (LAL) assays. J. Vis. Exp. 2019, 1–7 (2019).

- 469. Hosotsubo KK, Takezawa J, Nishijima MK, Takahashi H, Shimada Y, Y. I. Elimination of falso-positive limulus amebocyte lysate test in patients with hyperlipidemia. *Intensive Care Med.* 090, 1061–1063 (1985).
- 470. Sendo S, Saegusa J, Okano T, Takahashi S, A. K. and M. A. CD11b+Gr1dim Tolerogenic Dendritic Cell-like Cells are Expanded in Interstitial Lung Disease in SKG Mice. *Arthritis Rheumatol.* 69, 2314–2327 (2017).
- 471. Van Ginderachter, J. A., Beschin, A., Baetselier, P. De & Raes, G. Myeloid-derived suppressor cells in parasitic infections. *Eur. J. Immunol.* 40, 2976–2985 (2010).
- 472. Mačak Kubašková, T., Mudroňová, D., Vargová, M., Reiterová, K. & Hrčková, G. Cellular and humoral peritoneal immunity to Mesocestoides vogae metacestode infection in mice. *Parasites and Vectors* 14, 1–19 (2021).
- 473. Stevenson, M. M., Valanparambil, R. M. & Tam, M. Myeloid-Derived Suppressor Cells: The Expanding World of Helminth Modulation of the Immune System. *Front. Immunol.* 13, 1–11 (2022).
- 474. Yin, J. *et al.* The proangiogenic role of polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in mice infected with Echinococcus granulosus. *Biosci. Trends* 12, 338–341 (2018).
- 475. Zhang, X. F. *et al.* Dynamic changes of myeloid-derived suppressor cells and regulatory T cells in livers of mice infected with Echinococcus granulosus. *Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi 31*, 622–627 (2019).
- 476. Cassetta, L. *et al.* Deciphering myeloid-derived suppressor cells: isolation and markers in humans, mice and nonhuman primates. *Cancer Immunol. Immunother.* 68, 687–697 (2019).
- 477. Condamine, T. *et al.* Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. *Sci. Immunol.* 1, 1–16 (2016).
- 478. Mandruzzato, S. *et al.* Toward harmonized phenotyping of human myeloid-derived suppressor cells by flow cytometry: results from an interim study. *Cancer Immunol. Immunother.* 65, 161–169 (2016).
- 479. Gabrilovich, D. I. Myeloid-derived suppressor cells. Cancer Immunol. Res. 5, 3-8 (2017).
- 480. Halaby, M. J. *et al.* GCN2 drives macrophage and MDSC function and immunosuppression in the tumor microenvironment. *Sci. Immunol.* 4, 1–18 (2019).
- 481. Pan, W. *et al.* The DNA Methylcytosine Dioxygenase Tet2 Sustains Immunosuppressive Function of Tumor-Infiltrating Myeloid Cells to Promote Melanoma Progression. *Immunity* 47, 284-297.e5 (2017).
- 482. Wurfel, M. M., Kunitake, S. T., Lichenstein, H., Kane, J. P. & Wright, S. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS. *J. Exp. Med.* 180, 1025–1035 (1994).
- 483. Vreugdenhil, A. C. E., Snoek, A. M. P., Van 'T Veer, C., Greve, J. W. M. & Buurman, W. A. LPS-binding protein circulates in association with apoB-containing lipoproteins and enhances endotoxin-LDL/VLDL interaction. *J. Clin. Invest.* 107, 227–234 (2001).
- 484. Ulevitch, R. J. & Johnston, A. R. The Modification of Biophysical and Endotoxic Properties of Bacterial Lipopolysaccharides by Serum.
- 485. Levels, J. H. M., Abraham, P. R., Van den Ende, A. & Van Deventer, S. J. H. Distribution and kinetics of lipoproteinbound endotoxin. *Infect. Immun.* 69, 2821–2828 (2001).
- 486. Pirillo A, Catapano AL, N. G. HDL in Infectious Diseases and Sepsis. in *High density lipoproteins: From biological understanding to clinical exploitation* (eds. von Eckardstein, A. & Kardassis, D.) 224, (2015).
- 487. Levine, D. M., Parker, T. S., Donnelly, T. M., Walsh, A. & Rubin, A. L. In vivo protection against endotoxin by plasma high density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 12040–12044 (1993).
- 488. Kirschning, C. J. *et al.* Similar organization of the lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and phospholipid transfer protein (PLTP) genes suggests a common gene family of lipid-binding proteins. *Genomics* 46, 416–425 (1997).
- Vesy, C. J., Kitchens, R. L., Wolfbauer, G., Albers, J. J. & Munford, R. S. Lipopolysaccharide-binding protein and phospholipid transfer protein release lipopolysaccharides from gram-negative bacterial membranes. *Infect. Immun.* 68, 2410–2417 (2000).
- 490. Brandenburg, K. et al. Biophysical characterization of the interaction of high-density lipoprotein (HDL) with

endotoxins. Eur. J. Biochem. 269, 5972-5981 (2002).

- 491. Tanaka, S. et al. High-density lipoproteins during sepsis: From bench to bedside. Crit. Care 24, 1–11 (2020).
- 492. Meilhac, O., Tanaka, S. & Couret, D. High-density lipoproteins are bug scavengers. *Biomolecules* 10, 1–18 (2020).
- 493. Taylor, K. R. *et al.* Recognition of hyaluronan released in sterile injury involves a unique receptor complex dependent on toll-like receptor 4, CD44, and MD-2. *J. Biol. Chem.* 282, 18265–18275 (2007).
- 494. Grunfeld, C. et al. Lipoproteins inhibit macrophage activation by lipoteichoic acid. J. Lipid Res. 40, 245–252 (1999).
- 495. Levels, J. H. M., Abraham, P. R., Van Barreveld, E. P., Meijers, J. C. M. & Van Deventer, S. J. H. Distribution and kinetics of lipoprotein-bound lipoteichoic acid. *Infect. Immun.* 71, 3280–3284 (2003).
- 496. Fitzgerald, K. A. et al. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-κB involves the toll adapters TRAM and TRIF. J. Exp. Med. 198, 1043–1055 (2003).
- 497. Hoebe, K. *et al.* Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* 424, 743– 748 (2003).
- 498. Yamamoto, M., Sato, S. & Hemmi, H. Role of Adaptor TRIF in the. Science (80-.). 301, 640–643 (2003).
- 499. Yamamoto, M. *et al.* TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat. Immunol.* 4, 1144–1150 (2003).
- 500. Ciesielska, A., Matyjek, M. & Kwiatkowska, K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced proinflammatory signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* 78, 1233–1261 (2021).
- 501. Tanimura, Natsuko; Saitoh, Shin-Ichiroh; Akashi-Takamura, Sachiko; Fujimoto, Yukari; Fukase, Koichi; Shmizu, Toshiyuki; Miyake, K. The attenuated inflammation of MPL is due to the lack of CD14-dependent tight dimerization of TLR4/MD2 complex at the plasma membrane Journal: *Int. Immunol.* (2013).
- 502. Zhao, H., Perez, J. S., Lu, K., George, A. J. T. & Ma, D. Role of toll-like receptor-4 in renal graft ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 306, (2014).
- 503. Qin, H., Wilson, C. A., Sun, J. L., Zhao, X. & Benveniste, E. N. LPS induces CD40 gene expression through the activation of NF-κB and STAT-1α in macrophages and microglia. *Blood* 106, 3114–3122 (2005).
- 504. Zhang, S. *et al.* Annexin A2 binds to endosomes and negatively regulates TLR4-triggered inflammatory responses via the TRAM-TRIF pathway. *Sci. Rep.* 5, 1–15 (2015).
- 505. JF Hancock. Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. 7, 1–7 (2006).
- 506. Lingwood, D. & Simons, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. Science (80-.). 327, 46–50 (2010).
- 507. D Sviridoc, N Mukhamedova, Y. M. Lipid rafts as a therapeutic target. J. Lipid Res. March, (2020).
- 508. Martha Triantafilou, Kensuke Miyake, D. T. G. and K. T. Mediators of innate immune recognition of bacteriaconcentrate in lipid rafts and facilitatelipopolysaccharide-induced cell activation. *J. Cell Sci.* March, 2603–2611 (2002).
- 509. Watanabe, S., Kumazawa, Y. & Inoue, J. Liposomal Lipopolysaccharide Initiates TRIF-Dependent Signaling Pathway Independent of CD14. *PLoS One* 8, 2–8 (2013).
- 510. Trakaki, A. & Marsche, G. Current understanding of the immunomodulatory activities of high-density lipoproteins. *Biomedicines* 9, (2021).
- 511. Zhu, X. *et al.* Macrophage ABCA1 reduces MyD88-dependent toll-like receptor trafficking to lipid rafts by reduction of lipid raft cholesterol. *J. Lipid Res.* 51, 3196–3206 (2010).
- 512. Wang, S. hui, Yuan, S. guang, Peng, D. quan & Zhao, S. ping. HDL and ApoA-I inhibit antigen presentationmediated T cell activation by disrupting lipid rafts in antigen presenting cells. *Atherosclerosis* 225, 105–114 (2012).
- 513. Chowdhury, S. M. *et al.* Proteomic analysis of ABCA1-Null macrophages reveals a role for stomatin-like protein-2 in raft composition and toll-like receptor signaling. *Mol. Cell. Proteomics* 14, 1859–1870 (2015).

- 514. Nicolao, M. C., Rodriguez Rodrigues, C. & Cumino, A. C. Extracellular vesicles from Echinococcus granulosus larval stage: Isolation, characterization and uptake by dendritic cells. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13, (2019).
- 515. Fratini, F. *et al.* Proteomic analysis of plasma exosomes from cystic echinococcosis patients provides in vivo support for distinct immune response profiles in active vs inactive infection and suggests potential biomarkers. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14, 1–31 (2020).
- 516. Plochberger, B. *et al.* Lipoprotein Particles Interact with Membranes and Transfer Their Cargo without Receptors. *Biochemistry* 59, 4421–4428 (2020).
- 517. Chaves-González, L. E. *et al.* What lies behind the curtain: Cryptic diversity in helminth parasites of human and veterinary importance. *Curr. Res. Parasitol. Vector-Borne Dis.* 2, 100094 (2022).
- 518. Medzhitov, R., Preston-hurlburt, P. & Jr, C. A. J. A human homologue of the DrosophilaToll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 6–9 (1997).
- 519. Rhoderick E. Brown. Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of modelmembranes revea. (1998).
- 520. Ahmed, S. N., Brown, D. A. & London, E. On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: Physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergentinsoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. *Biochemistry* 36, 10944–10953 (1997).
- 521. Veiga, M. P., Arrondo, J. L. R., Goñi, F. M., Alonso, A. & Marsh, D. Interaction of cholesterol with sphingomyelin in mixed membranes containing phosphatidylcholine, studied by spin-label ESR and IR spectroscopies. A possible stabilization of gel-phase sphingolipid domains by cholesterol. *Biochemistry* 40, 2614–2622 (2001).
- 522. Lingwood, D., Ries, J., Schwille, P. & Simons, K. Plasma membranes are poised for activation of raft phase coalescence at physiological temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 10005–10010 (2008).
- 523. Kaiser, H. J. et al. Order of lipid phases in model and plasma membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106, 16645– 16650 (2009).
- 524. Levental, I., Grzybek, M. & Simons, K. Raft domains of variable properties and compositions in plasma membrane vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 11411–11416 (2011).