

El antígeno B de *Echinococcus granulosus*: ¿una lipoproteína con propiedades biológicas compartidas con la HDL de vertebrados?

Trabajo Final de Grado de la
Licenciatura en Ciencias Biológicas

Anaclara Beasley Lomazzi

Tutora: Ana Maite Folle
Cotutora: Ana María Ferreira

Laboratorio de Inmunología
Facultad de Ciencias
Universidad de la República

Montevideo
Noviembre 2023

Agradecimientos

Quisiera expresar mi profundo agradecimiento a quienes han sido pilares fundamentales en el desarrollo de mi tesina de grado. En primer lugar, agradezco infinitamente a mis padres y a mi hermano, cuyo apoyo emocional ha sido inquebrantable a lo largo de este camino académico. En segundo lugar, extiendo mi gratitud a mis amigos por su aliento constante y su compañía que ha hecho más llevadero el tránsito en toda la carrera. Un reconocimiento especial para el laboratorio de inmunología, en particular a la “casita del medio”, donde no solo encontré ayuda oportuna, sino también a personas muy divertidas. Gracias a mi cotutora Ana, cuya paciencia y precisión en las correcciones han contribuido significativamente al perfeccionamiento de mi tesis. Mi agradecimiento especial va hacia mi tutora, Maite, a quien le debo todo lo aprendido este año. Su orientación experta, supervisión constante y calidad humana han sido determinantes en el éxito de este proyecto de investigación. Estoy profundamente agradecida por el privilegio de contar con su guía y apoyo a lo largo de esta enriquecedora experiencia. Finalmente, gracias a toda la comunidad de Facultad de Ciencias por generar un ambiente cálido en el que los estudiantes nos podemos desarrollar.

Contenido

Resumen	5
1. Introducción.....	6
1.1. El parásito <i>Echinococcus granulosus</i> s.l.....	6
1.1.1. Ciclo de vida	6
1.1.2. Morfología de la hidátide.....	8
1.2. El sistema inmune del hospedero intermediario frente a la infección por <i>E. granulosus</i>	9
1.3. Los macrófagos frente a la infección.....	10
1.4. Respuesta inducida por el LPS en macrófagos y monocitos.....	12
1.5. El antígeno B de <i>E. granulosus</i>	13
1.6. El EgAgB y la HDL de vertebrados	17
2. Hipótesis y objetivos.....	19
3. Materiales y métodos	20
3.1. Reactivos generales	20
3.2. HDL y material parasitario.....	20
3.2.1. Obtención del EgAgB nativo a partir de LH	20
3.2.2. Caracterización de las preparaciones de EgAgB y de la HDL total.....	22
3.2.2.1. Evaluación del protocolo de purificación del EgAgB nativo por SDS-PAGE y Western Blot.....	22
3.2.2.2. Determinación de la concentración proteica	23
3.2.2.3. Determinación del radio hidrodinámico de las partículas	23
3.2.2.4. Cuantificación de endotoxinas bacterianas.....	23
3.3. Cultivo celular	24
3.3.1. Medios de cultivo	24
3.3.2. Líneas celulares y cultivos primarios.....	24
3.3.3. Determinación de la concentración y viabilidad celular	25
3.4. Ensayos de estimulación de macrófagos en ausencia y presencia del agonista LPS	25
3.4.1. Cuantificación de citoquinas.....	25
3.4.2. Cuantificación de nitrito como medida de la generación de NO•	26
3.5. Ensayos de competencia por la unión a macrófagos entre el LPS y el EgAgB o la HDL.....	26
3.6. Ensayos de evaluación de la capacidad del EgAgB de unir el LPS.....	27
3.7. Análisis de los datos.....	27
4. Resultados	28

4.1. Purificación del EgAgB nativo a partir de LH y caracterización de las preparaciones obtenidas	28
4.2. Modulación de la activación inflamatoria de macrófagos inducida por LPS por el EgAgB nativo y la HDL total	30
4.3. Capacidad del EgAgB nativo y de la HDL total de competir con el LPS por la unión a los macrófagos	37
4.4. Capacidad del EgAgB de unir el LPS.....	39
5. Discusión y perspectivas	40
<i>Bibliografía</i>	47

Resumen

Echinococcus granulosus es un platelminto parásito cuyo estadio larvario (hidátide) provoca la echinococcosis quística en diversos mamíferos incluyendo al humano. En hospederos a los que el parásito está bien adaptado, la hidátide se establece de manera crónica porque logra evadir la respuesta inmune mediante su aislamiento parcial y la expresión de componentes con función inmunomoduladora. Se postula que uno de estos componentes es la lipoproteína conocida como antígeno B (EgAgB) que mostró efectos inhibitorios de la activación mediada por LPS en células inmunes innatas, incluyendo macrófagos, tanto *in vitro* como *in vivo*. La caracterización bioquímica del EgAgB demostró que esta lipoproteína presenta cierta similitud con la HDL de vertebrados a nivel de su tamaño molecular, la relación lípido:proteína, la heterogeneidad de sus componentes lipídicos y el predominio de hélices alfa en la estructura secundaria de sus componentes proteicos o apolipoproteínas. Además, el trabajo de nuestro grupo de investigación mostró que comparten actividades asociadas a la unión a receptores celulares y la captura de lípidos de los macrófagos. Por otra parte, se han descrito propiedades inmunomoduladoras de la HDL sobre la activación de macrófagos por LPS, que podrían incluir su capacidad para unir y neutralizar al LPS en solución. En este escenario, planteamos que la actividad inmunomoduladora del EgAgB sobre los macrófagos podría involucrar mecanismos similares a los observados en la HDL, incluyendo la capacidad de unir LPS y neutralizarlo en el medio extracelular. Para abordar esta hipótesis analizamos los efectos del EgAgB de *E. granulosus* y la HDL sobre los macrófagos, comparando su capacidad para modular la activación por LPS y para interferir con la unión del LPS a dichas células. Utilizando macrófagos de la línea celular THP-1 o derivados de médula ósea de ratón observamos que el EgAgB inhibió significativamente la producción de mediadores proinflamatorios (IL-1 β , IL-6, IL-12p40, IFN- β y nitrito) inducida por LPS, mientras que la HDL no indujo inhibición a la misma concentración. Por otra parte, ambas lipoproteínas interfirieron con la unión del LPS a los macrófagos, pero el EgAgB mostró mayor capacidad que la HDL. Además, en ensayos de unión *in vitro* observamos que el EgAgB muestra mayor capacidad de unir el LPS que la HDL, tanto en presencia como ausencia de la proteína de unión al LPS. En conjunto, estos resultados apoyan la idea de que el EgAgB podría actuar como una molécula barrendera en solución, uniendo el LPS y evitando su acción sobre células innatas como los macrófagos. Esto explicaría, al menos parcialmente, la actividad inmunomoduladora descrita en el EgAgB en varios estudios previos. Interesantemente, la actividad específica del EgAgB parece ser mayor que la observada para la HDL, incluyendo su fracción HDL₃, la cual actuaría como una lipoproteína neutralizante del LPS en condiciones fisiológicas.

1. Introducción

1.1. El parásito *Echinococcus granulosus* s.l.

Echinococcus granulosus sensu lato (s.l.) es una tenia parásita de la clase Cestoda del filo Platyhelminthes. Su estadio larvario provoca la enfermedad conocida como echinococcosis quística (EQ) en una variedad de mamíferos incluyendo el humano, considerado hospedero accidental porque interrumpe el ciclo de vida natural del parásito (1). Esta zoonosis se extiende por todos los continentes, excepto Antártida, y es endémica en ciertos países de África, América del Sur, Asia y Europa (2). Particularmente, en algunos países de América del Sur, esta enfermedad se considera de importancia para el sector ganadero y de la salud pública, ya que *E. granulosus* es capaz de utilizar bovinos u ovinos y humanos como hospederos intermediarios (3). *E. granulosus* s.l. comprende 10 genotipos (G) que han sido reconocidos por caracteres fenotípicos (morfología, especificidad de hospedero intermediario, parámetros bioquímicos y desarrollo), distribución geográfica y secuencias génicas (gen mitocondrial *cox1*). Los genotipos G1, G2 y G3 se agrupan dentro de *E. granulosus* sensu stricto (s.s.) y utilizan como hospedero intermediario a ovejas/bovinos, ovejas de Tasmania y búfalos, respectivamente. Además, se reconocen los genotipos de equinos (G4), vacunos (G5), camélidos (G6), porcinos (G7), cérvidos (G8 y G10) y porcino-humano (G9) (4).

1.1.1. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *E. granulosus* s.l. se esquematiza en la Figura 1.1. Los hospederos intermediarios (ovejas, vacas, humanos, entre otros) se infectan tras la ingesta de alimentos contaminados por los huevos del parásito que contienen oncosferas o, en humanos, por contacto estrecho con perros infectados. Estas son liberadas en el tracto digestivo del hospedero y se sujetan con sus ganchos a las microvellosidades del intestino delgado. Rápidamente penetran el tejido con movimientos musculares y por las secreciones de las glándulas de penetración. Hay evidencia de que completan su migración a través de vasos sanguíneos o linfáticos hasta alcanzar un sitio idóneo, generalmente órganos como hígado, pulmón, cerebro y músculo. Allí se desarrollan al estadio larvario o hidátide cuya estructura se describe en el siguiente párrafo. Cuando esta alcanza la madurez, genera protoescólices (PE) por reproducción asexual, transformándose en hidátide fértil. Cuando una hidátide no genera PE se la denomina no fértil. Los hospederos definitivos (carnívoros, por ejemplo, perros) se infectan tras la ingesta de vísceras de hospederos intermediarios con hidátides conteniendo PE viables. Estímulos aún no esclarecidos provocan la evaginación de los PE que deben sujetarse rápidamente al epitelio del intestino delgado para no ser expulsados con las heces. Allí ocurren varios procesos que resultan en la maduración al individuo adulto. Los gusanos adultos son hermafroditas y predominantemente autofecundativos. Luego de la fecundación se desarrollan los huevos dentro de la proglótide terminal que es expulsada con las heces, cerrando así el ciclo de vida del parásito (1).

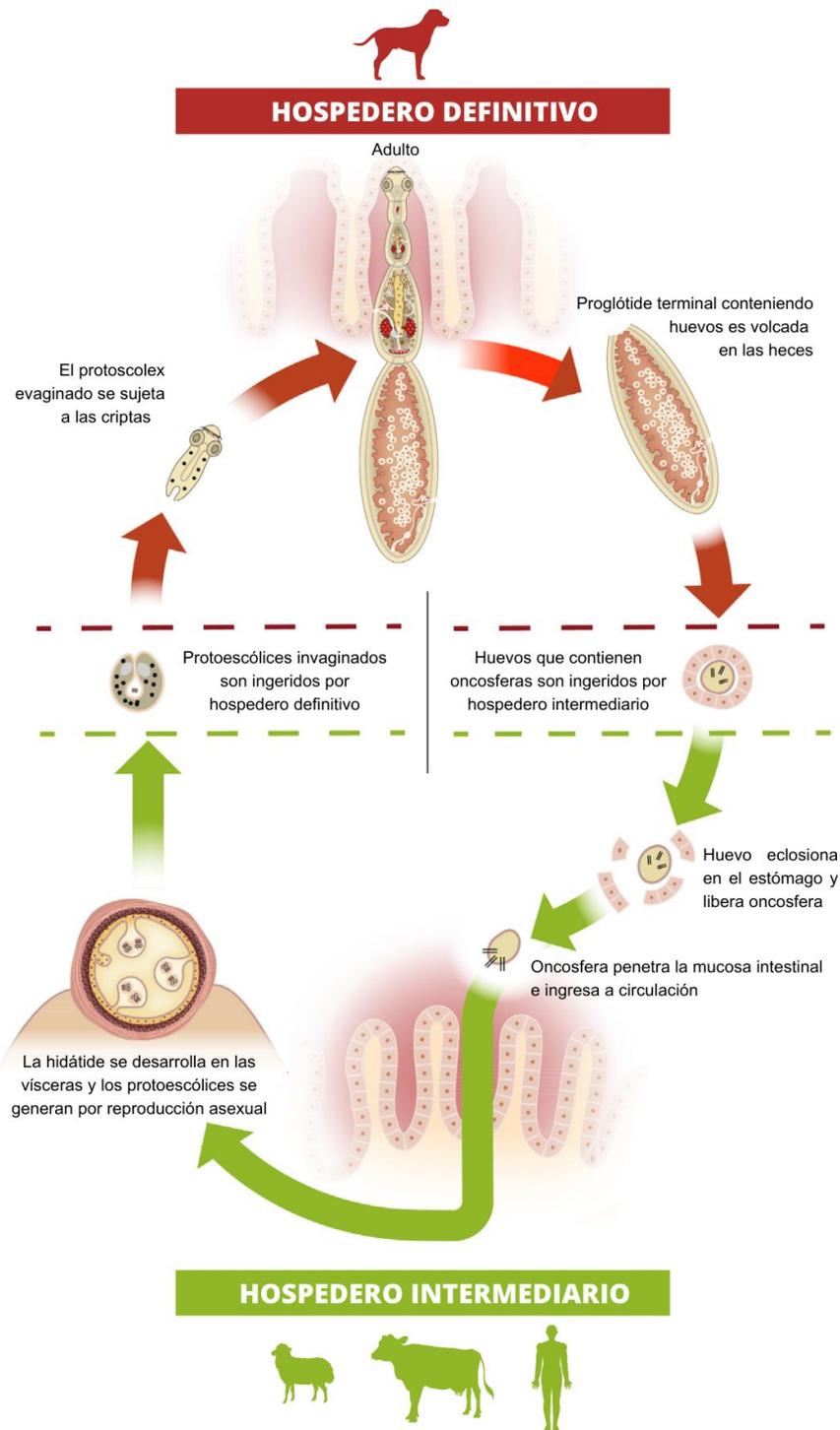


Figura 1.1. Esquema del ciclo de vida básico de *E. granulosus* s.l. El individuo adulto, hospedado en el intestino del hospedero definitivo, libera la proglótide terminal, conteniendo huevos, hacia las heces. Los hospederos intermediarios se infectan al consumir comida contaminada con dichos huevos. En el estómago, los huevos eclosionan y liberan las oncosferas, las cuales penetran la mucosa intestinal e ingresan a circulación, por la cual llegan a un órgano (hígado o pulmón principalmente). Allí se desarrolla la hidátide que mediante reproducción asexual genera los PE. Los hospederos definitivos se infectan al consumir vísceras con hidátides conteniendo PE viables. En el tracto digestivo los PE evaginan y se sujetan a las criptas del intestino delgado donde maduran y se reproducen sexualmente generando huevos, cerrando así el ciclo de vida del parásito. Tomado y modificado de (1).

1.1.2. Morfología de la hidátide

Ya que el antígeno a estudiar se extrae de la hidátide, se profundiza solo en este estadio del ciclo de vida de *E. granulosus*. La hidátide, esquematizada en la Figura 1.2, es generalmente unilocular, esférica y crece concéntricamente. Presenta una pared compuesta por una capa laminar externa (acelular, rica en carbohidratos y permeable a macromoléculas), producida por una capa celular interna denominada germinativa. La proliferación de las células de la capa germinativa genera los PE de manera asincrónica: en una misma hidátide puede haber varios PE en distintas etapas de desarrollo. Los PE completamente desarrollados se caracterizan por la posesión de ganchos en el rostellum invaginado. Contenido dentro de la hidátide, se encuentra el líquido hidático (LH) que está compuesto por una mezcla compleja de productos de secreción/excreción del parásito y moléculas derivadas del hospedero (1). Una lámina fibrosa generada por el hospedero en respuesta a la infección, denominada capa adventicia, rodea la pared de la hidátide. En especies de hospederos a los que el parásito está bien adaptado, la larva puede sobrevivir por muchos años, estableciendo una enfermedad crónica, lo que implica que el parásito posee estrategias de control del sistema inmune del hospedero (revisado por (5)). Este es un punto clave que se desarrolla en la siguiente sección.

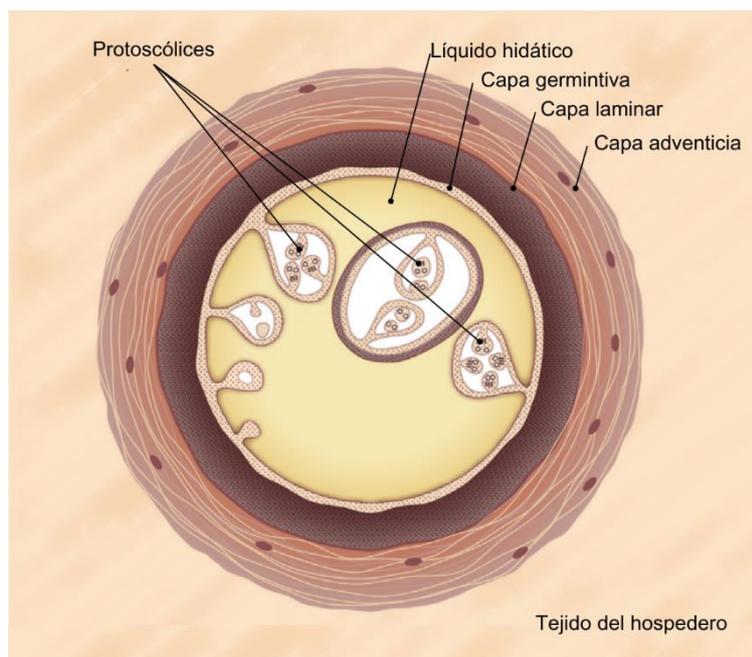


Figura 1.2. Ilustración del corte transversal de la hidátide fértil de *E. granulosus* establecida en el hospedero intermediario. La pared de la hidátide se conforma por una capa germinativa que sintetiza la capa laminar y por reproducción asexual genera PE. La pared rodea una cavidad donde se encuentra el LH conformado por productos del hospedero y de secreción/excreción del parásito. La capa adventicia es una lámina fibrosa generada por el hospedero en respuesta a la infección. Tomada y modificada de (1).

1.2. El sistema inmune del hospedero intermediario frente a la infección por *E. granulosus*

Típicamente, los metazoarios parásitos inducen en sus hospederos mamíferos una respuesta inmune de tipo 2. Esta es promovida por productos del parásito y/o señales de daño de tejidos que interaccionan con células epiteliales, células linfoides innatas de tipo 2 (ILC2), mastocitos, macrófagos y células dendríticas. Proliferan linfocitos T que secretan las citoquinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 (revisado por (6)). La IL-4 es clave para la diferenciación de las células Th2 y junto con la IL-13 inducen la diferenciación de macrófagos hacia M2, también llamados macrófagos alternativamente activados (AAM), fenotipo reparador de tejidos (7–9). La citoquina IL-5 promueve la eosinofilia y la IL-9 potencia la actividad de los mastocitos (10). Además, esta respuesta de citoquinas induce la generación de anticuerpos de isotipo IgG4 en humanos (11). Eosinófilos, basófilos, mastocitos y macrófagos son reclutados a los sitios de invasión del parásito y ejercen allí diversas funciones con el objetivo de, al menos, limitar al parásito y reparar tejidos dañados. Una de estas funciones, llevada a cabo principalmente por eosinófilos, neutrófilos y macrófagos es la citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC). Los receptores Fc de estas células pueden reconocer el parásito cubierto por anticuerpos y así descargar sobre él su contenido lisosomal o granular (revisado por (6)). Así, la respuesta Th2 resulta protectora en varias infecciones, particularmente contra nematodos gastrointestinales.

Sin embargo, las respuestas observadas en infecciones crónicas por helmintos no son meramente del tipo 2, sino que incluye un componente anti-inflamatorio/regulador. A esta respuesta se la denomina Th2-modificada. Si bien el componente tipo 2 refleja el reconocimiento del parásito por parte del sistema inmunológico, el componente de regulación negativa probablemente refleja la adaptación de los mismos para evadir la respuesta inmune del hospedero. La respuesta Th2-modificada se caracteriza por una disminución de la secreción de IL-5 e IL-13 y un aumento de la secreción de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 y/o TGF- β . Además, las infecciones por helmintos expanden las poblaciones de células T reguladoras (dependientes de IL-10) potenciando así los circuitos reguladores negativos del hospedero (revisado por (12)).

Puntualmente, la infección por *E. granulosus* promueve una respuesta con predominio de linfocitos colaboradores (Th) de tipo 2, pero dependiendo de la adaptación hospedero-parásito se ha observado presencia de otros tipos de células Th. En particular, en pacientes con EQ se observó la inducción de una respuesta de tipo 1, caracterizada por linfocitos Th1 que secretan IFN- γ , citoquina que activa macrófagos induciendo un fenotipo altamente microbicida. Estas respuestas coexisten en la infección por *E. granulosus*, pero se vio que una fuerte respuesta Th1 se correlaciona con quistes inactivos (revisado por (13)). Si la respuesta inicial hacia al parásito es muy intensa, puede causar la degeneración y eventualmente su muerte. Pero, como sucede en gran parte de los casos en el que el parásito se establece en un hospedero intermediario conveniente, la reacción inicial se resuelve coincidentemente con el desarrollo de la capa laminar de la hidátide y la aparición de la capa adventicia (1). De esta forma, la hidátide logra establecerse de manera crónica en su hospedero. Su sobrevivencia se debe a que, como otros helmintos parásitos, *E. granulosus* logra evadir la respuesta inmune mediante esencialmente dos mecanismos: evasión pasiva, en la cual el parásito evita los efectos nocivos de la inmunidad aislándose parcialmente; y evasión activa, llevada a cabo por la interacción directa de componentes parasitarios con función inmunomoduladora (revisado por (14)).

Algunos de los componentes conocidos que interfieren con los mecanismos efectores del sistema inmune del hospedero son EgTeg, proteínas 14-3-3, EgTPx, Calpain, EgEF-1 β/δ y el antígeno B (EgAgB). EgTeg y EgEF-1 β/δ dirigen la respuesta a Th2, asociada a la infección crónica (15,16). Las proteínas 14-3-3 se relacionan con la resistencia a la respuesta mediada por células (17). EgTPx juega un rol clave en la detoxificación de las especies reactivas del oxígeno producidas tanto por el propio metabolismo del parásito como de las producidas por las células efectoras del sistema inmune (18). Calpain es una proteasa que facilita la digestión de las proteínas del hospedero y la invasión de tejidos (revisado por (19)). Por su parte, el EgAgB ha sido propuesto como una molécula importante en la modulación del sistema inmune del hospedero ya que se ha visto que puede controlar tanto la respuesta innata como la adaptativa. En la sección 1.5 se describe en detalle al EgAgB y las observaciones que apoyan la idea del rol inmunomodulador. Adicionalmente, partículas derivadas de la capa laminar de *E. granulosus* inhibieron la producción de IL-4 y la proliferación de macrófagos (20) así como los niveles de CD40 en células dendríticas (21).

1.3. Los macrófagos frente a la infección

En este trabajo se utilizó a los macrófagos como modelo celular, por lo que en esta sección se describen los aspectos más relevantes de su papel en la respuesta inflamatoria, particularmente innata.

Los macrófagos, los cuales constituyen una población de células heterogénea tanto ontogénica como funcionalmente, son células del sistema inmune innato fundamentales para la destrucción de patógenos y la homeostasis de los tejidos. Los macrófagos residentes suelen tener funciones altamente especializadas asociadas al tejido que pueblan, y en su mayoría son de origen embrionario y tienen capacidad de autorrenovación. Presentan en su superficie receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, del inglés *Pattern Recognition Receptors*) que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés *Patogen Associated Molecular Patterns*) así como también motivos moleculares asociados al daño tisular (DAMPs, del inglés, *Damage Associated Molecular Patterns*). Se han descrito dos fenotipos principales de macrófagos según las propiedades que adquieren luego de ser estimulados: el clásico (M1) y el alternativo (M2) (Figura 1.3). Antes de describirlos, es necesario aclarar que la distinción de estos dos fenotipos discretos es una simplificación para su descripción, ya que se conoce que en condiciones fisiológicas pueden generarse un abanico de fenotipos en función de los estímulos presentes en el ambiente (revisado por (22)).

El fenotipo clásico se genera en respuesta a la estimulación por agonistas de PRRs de tipo Toll (TLRs, del inglés *Toll Like Receptors*) e IFN- γ , y está asociado a una potente actividad microbicida (alta capacidad fagocítica) relevante en la defensa contra bacterias extracelulares. Además, mediante la producción de citoquinas como la IL-1 β , IL-6, IFN- β y TNF- α , este fenotipo sostiene una fuerte respuesta inflamatoria que recluta y activa a células efectoras, y promueve el desarrollo de la respuesta de fase aguda (10). Por otro lado, los macrófagos estimulados por PAMPs, por ejemplo, LPS (lipopolisacárido), aumentan la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), la cual genera óxido nítrico (NO \bullet) que es un eficaz microbicida (23).

Como se mencionó en la sección anterior, el fenotipo alternativo M2, es producto de la diferenciación inducida por citoquinas asociadas a las respuestas de tipo 2: IL-4 e IL-13. Este fenotipo está especializado en controlar la diseminación de patógenos no fagocitables y persistentes, así como también de limitar el desarrollo de respuestas inflamatorias exacerbadas asociadas a agentes que provocan daño tisular. Así, los macrófagos M2 son capaces de sintetizar citoquinas anti-inflamatorias (IL-10), moléculas involucradas en la reparación del tejido (RELM α , Ym1, Ym2) y la enzima arginasa-1 (10). Esta enzima comparte con la enzima óxido nítrico sintetasa-2 (NOS2) el sustrato arginina, a partir del cual cataliza la formación de urea y ornitina, y de esta manera es capaz de limitar la síntesis de NO• y los efectos tóxicos del mismo (24).

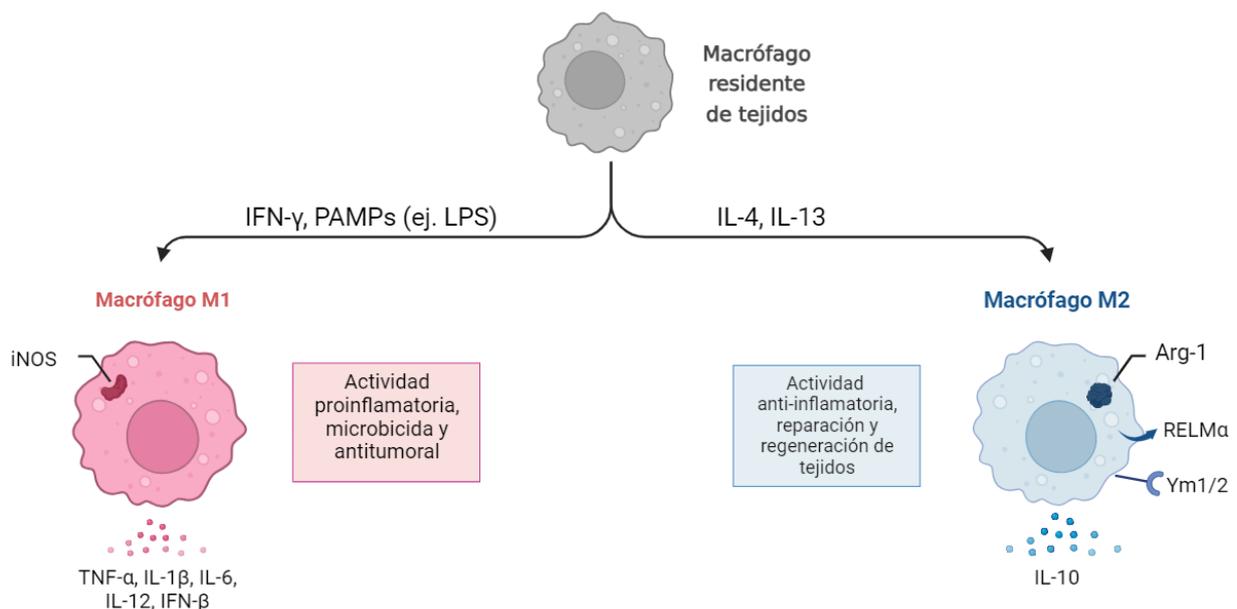


Figura 1.3. Esquema simplificado de los fenotipos de macrófagos residentes de los tejidos: señales que promueven su diferenciación, fenotipos adquiridos y respuestas efectoras consecuentes. El IFN- γ y PAMPs como el LPS promueven el fenotipo clásico (M1), el cual libera las citoquinas pro-inflamatorias IL-6, IL-1 β , IFN- β , TNF- α , citoquinas reguladoras como la IL-12 y expresa la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS) productora del NO•, radical que contribuye a la actividad microbicida del macrófago. La IL-4 e IL-13 promueven el fenotipo alternativo (M2), el cual libera la citoquina anti-inflamatoria IL-10, expresa moléculas involucradas en la reparación de tejidos (Ym1/2 y RELM α) y la enzima arginasa-1 la cual limita la síntesis del NO•. Creado en BioRender.com.

1.4. Respuesta inducida por el LPS en macrófagos y monocitos

Dado que en este trabajo se utilizó el LPS como estímulo inflamatorio, se revisa aquí la literatura sobre sus principales características bioquímicas, relevantes en cuanto a la interacción con los macrófagos.

El LPS es un glucolípido que forma parte del 50 % de la masa de la membrana externa de las bacterias gram-negativas. Posee tres regiones distinguibles: el lípido A, que es un glicofosfolípido que ancla el LPS a la membrana mediante interacciones hidrofóbicas con las cadenas acilo de los fosfolípidos de membrana; el oligosacárido central y, por último, las colas de polisacáridos O que consisten en un número de unidades repetidas de oligosacáridos. Debido a su estructura anfipática, las moléculas de LPS se asocian en solución formando estructuras en bicapa o micelares. El lípido A es el responsable de la activación de células innatas, incluyendo macrófagos, mediante el receptor TLR4 (25). Para que el LPS active al receptor TLR4 es necesaria la participación de una proteína, llamada proteína de unión al LPS (LBP, del inglés, *LPS binding protein*). La LBP se une al lípido A y extrae monómeros de LPS de las estructuras laminares o micelares que el LPS forma en solución. Estos monómeros pueden unirse al CD14, para ser luego transferidos al complejo TLR4-MD2 (revisado por (26)). Dicha interacción induce la dimerización del receptor activando vías de señalización intracelulares. La señalización está mediada por proteínas adaptadoras y resulta en cambios en la expresión génica que conllevan a la producción de citoquinas inflamatorias como IFN- β , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-12 y TNF- α (revisado por (27)). Además, como ya se mencionó, los macrófagos estimulados por PAMPs como el LPS (lipopolisacárido), aumentan la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), la cual genera NO• que es un microbicida eficaz (Figura 1.4) (23).

El LPS es un PAMP frecuentemente utilizado como activador de macrófagos y ha sido utilizado por nuestro grupo para evaluar funciones moduladoras de distintos componentes de *E. granulosus*, entre ellos el EgAgB (21,28,29). Macrófagos de diferente origen (i.e. líneas celulares, médula ósea murina, macrófagos de tioglicolato) se han utilizado como modelo y sus respuestas a la estimulación con LPS incluyen diversas combinaciones de citoquinas y NO• (determinado en función de la concentración de nitrito) (23,29–31). Se debe considerar que, si bien el LPS no es un PAMP derivado de cestodos, es una molécula que está presente en el hígado (principal localización de la hidátide) debido al arrastre de productos derivados de la microbiota intestinal por la vía porta (32), por lo que podría estar presente en el sitio de establecimiento de la hidátide en condiciones fisiológicas.

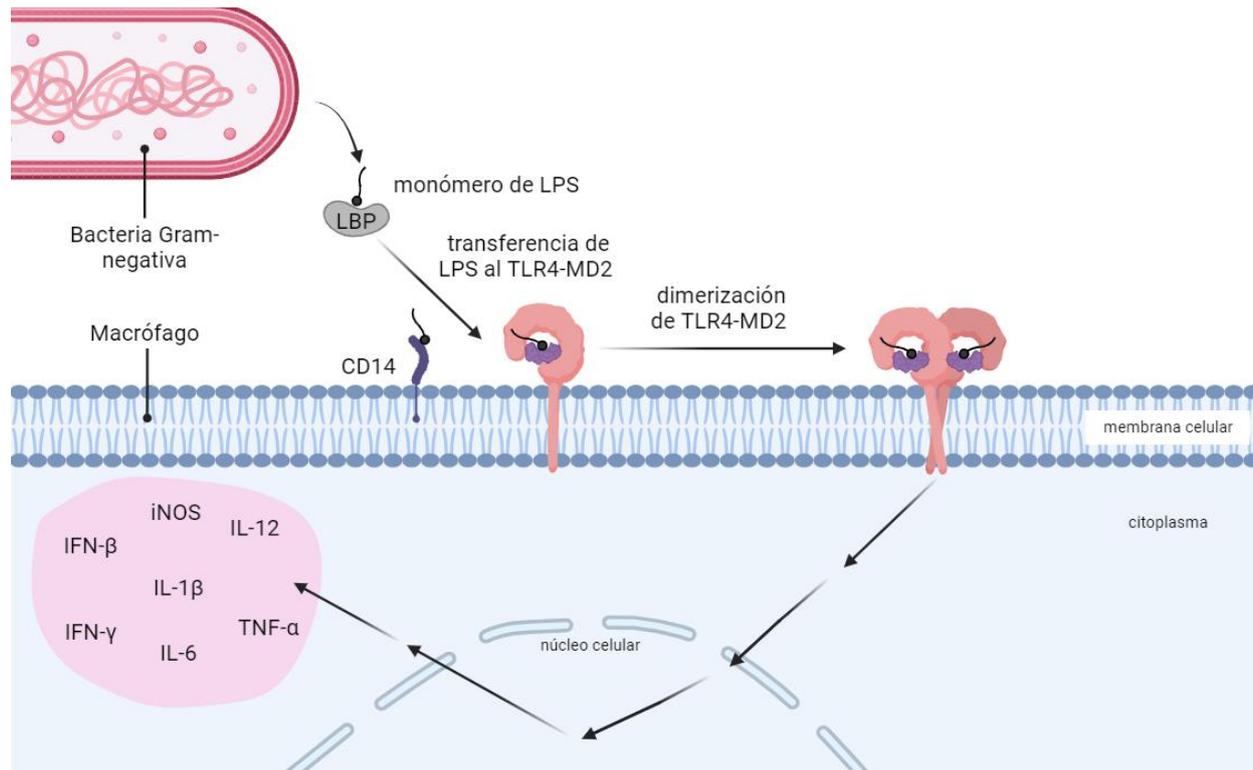


Figura 1.4. Esquema de señalización del LPS a través del TLR4 en macrófagos. La LBP facilita la monomerización del LPS, permitiendo su unión al CD14, el cual lo transfiere al complejo TLR4-MD2. Esto permite la dimerización de tal complejo, iniciando una cascada de señalización intracelular que tiene como consecuencia la producción de IFN-β, IFN-γ, IL-1β, IL-6, IL-12, TNF-α y la expresión de la iNOS. Tomada de (33) y modificada en BioRender.com.

1.5. El antígeno B de *E. granulosus*

El EgAgB se identificó como una lipoproteína antigénica (34,35), e inicialmente, el interés en el mismo radicó en su importancia para el inmunodiagnóstico de la EQ: diversos grupos evaluaron sus epítopes inmunodominantes así como su valor diagnóstico (36–40). Esta lipoproteína pertenece a la familia de las HLBP (del inglés, *hydrophobic ligand binding protein*), que es exclusiva de cestodos (34,41–43). Las HLBPs se identificaron como oligómeros altamente abundantes, inmunogénicos y de alta masa molecular cuyos monómeros son subunidades ricas en hélices de aproximadamente 7 a 11 kDa. Se ha propuesto que las HLBPs podrían desempeñar un papel importante en la biología de los cestodos al tomar y transportar lípidos del organismo hospedero y también podrían actuar como moléculas mensajeras. Por ejemplo, podrían unir y transportar lípidos con capacidad de inducir cascadas de señalización intracelular, participando en los procesos de activación y/o diferenciación celular necesarios para la adaptación del parásito a las respuestas inmunitarias del hospedero (44). A continuación, se describen en detalle distintos aspectos fisicoquímicos y biológicos del EgAgB, los cuales se ilustran a modo de resumen en la Figura 1.5.

El componente proteico del EgAgB está codificado por una familia multigénica y polimórfica: comprende 5 subfamilias, *EgAgB1* a *EgAgB5* (43,45,46). Con la secuenciación del genoma de *E. granulosus* s.s. se detectó la presencia de un *cluster* con 7 genes del EgAgB que incluyen tres copias similares de *EgAgB3* y una de cada uno de los restantes genes (47). En el artículo de Zhang *et al.*, 2010 se halló que estos genes se expresan diferencialmente en los estadios del ciclo de vida de *E. granulosus* s.l. (no se especifica el genotipo) así como en distintas estructuras de un mismo estadio. En la capa germinativa se expresan todos los genes mientras que la oncosfera, los PE y el gusano adulto inmaduro y maduro mostraron expresión principalmente de *EgAgB3* y *EgAgB5*. En particular, la expresión de *EgAgB3* 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 definitivo (47). La expresión diferencial de los genes del EgAgB podría deberse que los lípidos transportados sean liberados en compartimientos diferentes, permitiéndoles interactuar con diferentes blancos y cumpliendo funciones adaptadas al entorno celular y estadio del parásito. Los productos proteicos (*EgAgB8/1-EgAgB8/5*) codificados por estos genes contienen entre 65 y 71 aminoácidos, alto contenido de α -hélices (entre 35 y 65 %) y alcanzan un peso molecular de alrededor de 8 kDa. Estas subunidades se asocian formando oligómeros de mayor peso molecular, capacidad que se evidencia en el perfil electroforético característico (en escalera) que muestra el EgAgB (Figura 1.5 A). Aunque no se conoce el mecanismo por el cual las subunidades oligomerizan, se determinó que no está mediado por puentes disulfuro, puesto que el patrón característico en los geles de poliacrilamida ocurre aún en condiciones reductoras (48). La predicción de la estructura de las distintas subunidades del EgAgB mediante el modelado por homología, muestra un patrón interesante de distribución de cargas electrostáticas y zonas hidrofóbicas que podría explicar la agregación entre sí y su unión con ligandos hidrofóbicos, respectivamente (Figura 1.5 B) (36,49–51).

Respecto al componente lipídico del EgAgB, es muy heterogéneo y contiene varias clases neutras y polares (Figura 1.5 C). Dentro de los lípidos neutros, hay una alta proporción de triacilglicéridos (31.3 %), esteroides (20.2 %), ésteres de esteroides (19 %) y ácidos grasos libres (12 %), así como también una fracción propuesta como alquildiacilglicéridos y/o alquenildiacilglicéridos. En el caso de los lípidos polares, la fosfatidilcolina es el principal fosfolípido (64 %), seguido por la fosfatidiletanolamina (20.8 %), glicolípidos (8 %), fosfatidilserina (3.8 %), fosfatidilinositol (3.2 %) y cardiolipina (0.3 %). En cuanto al contenido de ácidos grasos del EgAgB nativo, predominan 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 (52).

Un estudio realizado por nuestro grupo de investigación determinó, mediante gel filtración acoplada a dispersión de luz (SEC-MALLS, del inglés, *Size Exclusion Chromatography - Multi-Angle Laser Light Scattering*), que las subunidades proteicas y los lípidos se asocian formando partículas de 230 kDa en promedio (Figura 1.5 D).

Debido a la gran proporción de lípidos y su heterogeneidad, el tamaño lipoproteico y su densidad, se propuso que el EgAgB adopta una organización similar a la de las lipoproteínas del plasma de los vertebrados, particularmente a la fracción más pequeña de la HDL, conocida como HDL₃ (52). Así, la partícula de EgAgB nativo podría adquirir una estructura como la que se modela en la Figura 1.5 E, donde los lípidos más hidrofóbicos, como los triacilglicéridos y los ésteres de esteroides, se ubicarían en el interior de la partícula formando un núcleo 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. Las diferentes subunidades del EgAgB quedarían expuestas en la superficie de la partícula. Se estima que entre 10 y 15 subunidades podrían estar expuestas al solvente y establecer contacto con diversas moléculas blanco (51).

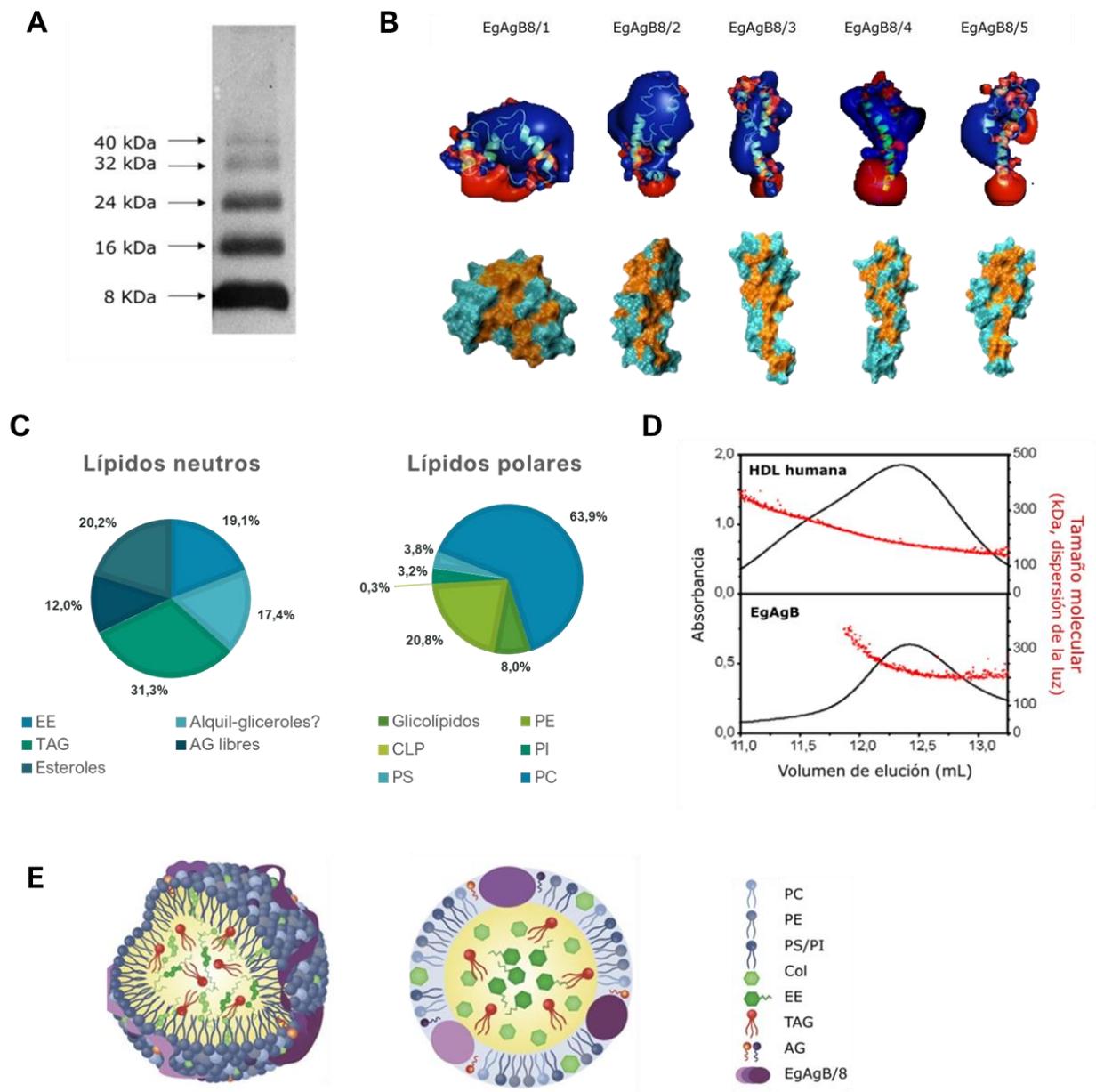


Figura 1.5. Características del EgAgB de *E. granulosus* s.l. (A) Perfil proteico del EgAgB analizado mediante Western-Blot (SDS-PAGE) de una muestra de LH proveniente de hidátides suinas, empleando un anticuerpo policlonal de conejo anti-EgAgB nativo. Se observa el patrón de bandas regularmente espaciadas 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 de (53). (B) 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. Adaptado de (51). (C) Composición lipídica del EgAgB estimada mediante cromatografía en capa fina de alta resolución. Adaptado de (52). (D) 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 del EgAgB sobre una matriz de exclusión molecular, 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 de (52). (E) Modelo del EgAgB basado en la variedad de sus lípidos constituyentes, la relación lípido:proteína y la densidad y tamaño de las partículas. De manera análoga a las lipoproteínas plasmáticas, el EgAgB presentaría un centro 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. Tomado de (51). PC: fosfatidilcolina; PS: fosfatidilserina; PE: fosfatidiletanolamina; PI: fosfatidilinositol; CLP: cardiolipina; Col: colesterol, AG: ácidos grasos, TAG: triacilglicéridos; EE: ésteres de esteroides.

Dado que el EgAgB es el principal componente parasitario en el LH, es probable que sea un componente relevante para la supervivencia de la hidátide (54). Si bien no existe evidencia de un mecanismo de transporte activo del EgAgB fuera de ésta, 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 (33). El rol biológico del EgAgB no ha sido completamente dilucidado aún, sin embargo, en base a estudios *in vitro*, se han planteado dos grandes funciones que podría desempeñar: a) tomar y transportar lípidos del hospedero, y b) modular la activación del sistema inmune del hospedero.

Respecto a la primera función, esta idea se apoya en que *E. granulosus* no tiene la capacidad de sintetizar ácidos grasos y colesterol *de novo* (47,55,56), sin embargo, como se mencionó anteriormente, estos lípidos forman parte de la lipoproteína. Además, se demostró que su componente proteico delipidado puede capturar/transferir derivados de ácidos grasos a membranas artificiales (57). Para cumplir esta función, sería necesaria la interacción del EgAgB con componentes del hospedero que permitieran adquirir los lípidos, y luego la interacción con componentes del parásito, otras HLBP's y/o células, para su eventual descarga. La toma de lípidos podría ocurrir a partir de interacciones con las células del órgano infectado o con las lipoproteínas plasmáticas del hospedero, dada la capacidad de estas últimas de intercambiar lípidos entre ellas. Existen evidencias del grupo sobre la unión del EgAgB a monocitos/macrófagos (28) y hepatocitos (33,58), posiblemente mediada por receptores compartidos con lipoproteínas plasmáticas (28). Además, recientemente, el grupo observó que el EgAgB es capaz de tomar colesterol de los macrófagos (33), función que cumple la HDL en los vertebrados (59). Se ha reportado también que el EgAgB interacciona y es endocitado por células de mamífero, incluyendo hepatocitos (58), pero esto no contradice su potencial para remover colesterol, porque la HDL también es internalizada tras su interacción con transportadores ligados al eflujo de colesterol (60–62).

Con relación a la capacidad inmunomoduladora del EgAgB, esta hipótesis surgió de ensayos que 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 plaquetas (63) y productos bacterianos (64). Estudios posteriores mostraron que la presencia de EgAgB durante la diferenciación de células dendríticas alteró la respuesta frente a la estimulación con LPS, disminuyendo la expresión de las moléculas esenciales para cumplir su función presentadora e inmunoestimuladora 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 células dendríticas maduras aumentando sólo los niveles de TNF- α , IL-10, IL-6 *per se* y disminuyendo IL-12p70 inducidos por LPS. En concordancia con estos resultados, se encontró que la estimulación con EgAgB de células mononucleares de la sangre periférica de pacientes con EQ indujo la síntesis de IL-4 e IL-13 (inductoras de respuesta de tipo 2), pero no de IL-12 (crítica para el desarrollo de la respuesta de tipo 1 (10)). Esto sugiere que el EgAgB favorecería la diferenciación T hacia el perfil Th2 sobre el Th1 (según la relación IL-4/IFN- γ) (65). Resultados preliminares del grupo, obtenidos por Sofía Lagos en su doctorado, conciben con esta idea. Sin embargo, dado que en estos ensayos se utilizaron preparaciones de EgAgB desnaturalizadas (eluídas de geles de SDS-PAGE u obtenidas por procedimientos de precipitación diferencial que incluyeron pasos de calentamiento a 100 °C), los efectos observados en los trabajos citados podrían diferir de las interacciones que establezca el EgAgB en condiciones fisiológicas. Considerando esto, nuestro grupo trabajó en el ajuste de protocolos de purificación del EgAgB y observó que la partícula lipoproteica nativa es capaz de unirse a macrófagos y células dendríticas y modular su activación por LPS. En particular, se observó que la presencia del EgAgB disminuyó la secreción de los mediadores solubles IL-1 β , IL-6, IL12p40, IFN- β y la formación de NO \cdot inducida por LPS en macrófagos humanos THP-1 y/o en macrófagos o células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón, *in vitro* ((28,33) y proyecto de doctorado Sofía Lagos, 2022-2025). Además, es importante resaltar que en un estudio reciente se observó que los síntomas clínicos de ratones con inflamación intestinal inducida por sulfato sódico de dextrano (DSS), eran menores en aquellos animales infectados previamente con microquistes de *E. granulosus* s.s. o en aquellos previamente inoculados intraperitonealmente con EgAgB. Al parecer, estos efectos se deben por la inducción de un perfil de macrófagos M2 y disminución de los M1 en la lámina propia intestinal (66).

1.6. El EgAgB y la HDL de vertebrados

La HDL es una de las lipoproteínas que transportan lípidos en el plasma de los vertebrados. Se compone de colesterol, triacilglicéridos y varias apolipoproteínas incluyendo la Apo-AI, Apo-AII, Apo-AIV, Apo-AV, Apo-C1, Apo-CII, Apo-CIII, and Apo-E. Apo-AI es la apolipoproteína estructural mayoritaria (67). Dentro de la población total de partículas de HDL se pueden diferenciar según su tamaño y densidad, al menos tres sub-fracciones de partículas lipoproteicas conocidas como *large* (grande) HDL o HDL₂, *medium* (mediana) HDL y *small* (pequeña) HDL, también conocida como HDL₃ (68).

La caracterización de la composición proteica y lipídica del EgAgB (52), (y el posible uso de receptores comunes y la capacidad de remover colesterol de los macrófagos plantearon ciertas similitudes con la HDL de vertebrados. A nivel de las propiedades fisicoquímicas, tienen similitud en el tamaño, la relación lípido/proteína (m/m) y su variada composición lipídica (varias clases de lípidos neutros y polares). Sin embargo, no se encontró similitud a nivel de la estructura primaria de las subunidades de 8 kDa del EgAgB y las apolipoproteínas de la HDL, aunque comparten características en cuanto a su tamaño (moléculas de bajo PM) y alto contenido de estructura alfa hélice, que ordena aminoácidos hidrofóbicos y polares hacia sus lados opuestos (36,69). A nivel funcional, la capacidad compartida de tomar colesterol de los macrófagos abre preguntas acerca de posibles similitudes en cómo ambas lipoproteínas interactúan con células innatas, mediando efectos moduladores de la inflamación (33). Se ha descrito que la HDL puede mediar efectos que impactan sobre las funciones de células inmunes. De hecho, su capacidad para modular la biodisponibilidad del colesterol en las balsas lipídicas podría vincularse con efectos sobre las propiedades de las células involucradas en la respuesta inmune innata y adaptativa. Por otra parte, sus efectos moduladores podrían estar asociados al transporte de esfingosina-1 fosfato, un esfingolípido activo que mostró ser relevante en la patogénesis de varios trastornos inflamatorios, a través de la modulación de las funciones de macrófagos y linfocitos. Además, la HDL influye en la inmunidad innata humoral modulando la activación del sistema del complemento y la expresión de pentraxina 3 (revisado por (70)). En particular se han observado efectos de la HDL sobre la activación de macrófagos. En macrófagos THP-1 estimulados con LPS, la HDL provocó la disminución de ARN mensajero de TNF- α e IL-6 (71) y disminución de IL-6 en sobrenadantes de cultivo respecto a macrófagos estimulados con LPS sin tratar con HDL (72). La secreción de IL-6 y TNF de macrófagos derivados de la médula ósea de ratón (BMDM) tratados por 6 horas con HDL y estimulados con LPS, disminuyó significativamente respecto a los BMDMs sin tratar (73). En el artículo reciente de Han *et al.*, 2021, en el que se basó parte de este trabajo, observaron que la respuesta de IL-1 β y TNF α por las células de Kupffer (macrófagos hepáticos) estimuladas con LPS disminuía con la presencia de HDL₂ y aún más con HDL₃. Además, determinaron *in vitro* que la HDL₃ podía unir LPS en presencia de LBP (74).

2. Hipótesis y objetivos

Varias observaciones muestran que el EgAgB y la HDL son lipoproteínas con propiedades bioquímicas similares incluyendo su tamaño molecular, la relación lípido:proteína, la variada composición de sus componentes lipídicos, la estructura secundaria de sus componentes proteicos (apolipoproteínas) y actividades asociadas a sus propiedades de unión a receptores celulares y captura de lípidos de los macrófagos. En este escenario planteamos que la actividad inmunomoduladora del EgAgB sobre los macrófagos podría involucrar mecanismos similares a los observados en la HDL, incluyendo la capacidad de unir LPS y neutralizarlo en el medio extracelular.

Objetivo general

Estudiar si el EgAgB de *E. granulosus* s.l. y la HDL comparten actividades inmunomoduladoras sobre macrófagos y propiedades de unión al LPS.

Objetivos específicos

1. Obtener EgAgB nativo a partir de LH y caracterizar la preparación obtenida.
2. Comparar la capacidad del EgAgB y de la HDL de modular la activación de los macrófagos inducida por el LPS *in vitro*.
3. Evaluar la capacidad del EgAgB y de la HDL de inhibir la unión del LPS a los macrófagos.
4. Evaluar la capacidad del EgAgB de unir el LPS, de forma análoga a lo descrito para la HDL₃.

3. Materiales y métodos

3.1. Reactivos generales

Se adquirieron de Sigma-Aldrich (EEUU) los siguientes componentes: sales inorgánicas para soluciones amortiguadoras, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), di-tert-butil-4-metilfenol (BHT), albúmina del suero bovino (BSA), ovoalbúmina (OVA), detergentes laurilsulfato de sodio (SDS) y monolaurato de polioxietilen-sorbitan (Tween 20), ácido tri-fluoro acético (TFA), 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-tetrametiletildiamina (TEMED), persulfato de amonio y azul de Coomassie G250. Del mismo fabricante se obtuvieron los siguientes reactivos para su uso en cultivo celular: bicarbonato, HEPES, dimetil sulfoxido (DMSO), L- glutamina, solución antibiótica/antimicótica (AbAm, conteniendo 100 U/mL penicilina, 0.1 mg/mL estreptomycin y 250 ng/mL anfotericina B), forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), lipopolisacárido (LPS, Sigma #L4516, *Escherichia coli* O127 B8). De los laboratorios Pierce-Thermo Fisher Scientific (EEUU) se adquirió el marcador de peso molecular preteñido (#26616) utilizado en SDS-PAGE. Del laboratorio AppliChem (Alemania) se obtuvieron reactivos para electroforesis como acrilamida, ditiotreitól (DTT), urea y tricina y los medios de cultivo RPMI-1640 y DMEM. De Dorwil (Argentina) se obtuvo el metanol.

3.2. HDL y material parasitario

La HDL total y la fracción HDL₃ utilizadas en los ensayos fueron donadas generosamente por el Dr. Josep Julve del Instituto de Investigación del Hospital de la Santa Cruz y San Pablo (grupo de Bases Metabólicas de Riesgo Cardiovascular), participante del proyecto FCE 2021 en el cual se enmarca esta tesis. El LH se obtuvo mediante punción aséptica de hidátides fértiles y no fértiles contenidas en vísceras bovinas (sin signos de putrefacción) colectadas en frigoríficos locales. Se le agregó EDTA 5mM y BHT 20 μ m y se lo conservó a -20°C. Se realizó, por un lado, un *pool* de LH derivado de 9 hidátides fértiles que alcanzó un volumen de 100 mL. Por otro lado, se realizó un *pool* de LH derivado de 6 hidátides no fértiles que alcanzó un volumen de 360 mL. No se genotiparon los PE provenientes de quistes fértiles de donde se extrajo el LH, pero en base a la experiencia previa del grupo se estima que entre un 78 y 100 % de los PE son G5 y entre un 0 y 22 % son G1.

3.2.1. Obtención del EgAgB nativo a partir de LH

Se purificó el EgAgB a partir del LH, derivado de hidátides fértiles y no fértiles, siguiendo el protocolo puesto a punto en la tesis de doctorado de Maite Folle (33), con algunas modificaciones. El mismo se realizó empleando material estéril y en cabina de flujo laminar. Además, todas las soluciones amortiguadoras utilizadas se prepararon con agua apirógena y filtraron por 0.22 μ m para evitar contaminación. Inicialmente se clarificó el LH mediante centrifugación a 7800 rpm por 20 minutos a 4°C (Sorvall RC 6 Plus, Thermo) y se guardó una alícuota del sobrenadante para analizar por SDS-PAGE (fracción LH).

Al LH clarificado se lo sometió a una cromatografía de intercambio aniónico sobre una matriz de Q-Sefarosa (GE Healthcare) previamente equilibrada con una solución amortiguadora fosfato 20 mM, pH 7.2, conteniendo NaCl 0.2 M, EDTA 5 mM, BHT 20 μ M y AbAm 1 % (*buffer A*). A diferencia del procedimiento utilizado por Folle (33), esta cromatografía se realizó *in batch* con el objetivo de disminuir posibles fuentes de contaminación, realizando todo el procedimiento en una cabina de flujo laminar y con material de plástico estéril. Se incubaron 45 mL de LH por cada mililitro de resina durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente (en varios tubos de 50 mL estériles y realizando varias rondas). Luego se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos y se guardó el sobrenadante conteniendo los componentes no unidos a la Q-Sefarosa (fracción QS⁻). Se realizaron lavados de la resina (L_{QS}) con el *buffer A* hasta que la absorbancia del sobrenadante a 280 nm fuera menor a 0.05 UA. La elución de la fracción unida a la Q-Sefarosa (fracción QS⁺) se realizó aumentando la fuerza iónica con buffer fosfato 20 mM, pH 7.2, conteniendo NaCl 1 M, EDTA 5 mM, BHT 20 μ M y AbAm 1 % (*buffer B*). Cada mL de resina se incubó en primera instancia con 2 mL de *buffer B* por 30 minutos y posteriormente se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos. A continuación, se repitió este último paso, pero utilizando 4 mL de *buffer B*. Se obtuvieron 15 mL de QS⁺ del pool de LH fértil y 30 mL de QS⁺ del pool de LH no fértil.

Las fracciones QS⁺ se sometieron a una cromatografía de inmunoafinidad empleando una matriz conteniendo anticuerpos VHH (dominio variable único de una cadena pesada) anti-EgAgB8/1 conjugados a Sefarosa (1.5 mL de resina). Las fracciones QS⁺ se diluyeron en solución amortiguadora fosfato sin NaCl hasta alcanzar una molaridad de \sim 0.3 M de NaCl y se aplicaron a la columna de inmunoafinidad previamente equilibrada con 10 volúmenes de columna (VC, \sim 1.5 ml totales) de PBS conteniendo EDTA, BHT y antibiótico/antimicótico (PBS_{E-B-AbAm}). Se guardó la fracción no retenida o *flow through* (FT_{IA}). Con la intención de interrumpir las interacciones inespecíficas entre la resina y algunas proteínas de la fracción QS⁺, la columna se lavó con 10 VC de PBS_{E-B-AbAm} (fracción L_{IA}) y 3 VC de glicina pH 5 (L_{IA-pH5}). La elución del EgAgB, unido específicamente a los VHH anti-EgAgB8/1, se realizó con glicina pH 2.5 siguiendo la coloración amarilla del eluato (E) y neutralizando con Tris 2 M pH 9.6 al momento de su recolección. Se obtuvieron 2.5 mL a \sim 0.18 mg/mL de EgAgB derivado del pool de LH fértil (EgAgB_F) y 3 mL a \sim 0.22 mg/mL de EgAgB derivado del pool de LH no fértil (EgAgB_{NF}) (concentración estimada según la medida de Abs a 280 nm en equipo Nanodrop).

Finalmente, las preparaciones EgAgB_F y EgAgB_{NF} se sometieron a un cambio de solución amortiguadora utilizando columnas de desalado PD-10 de 2.5 mL (#17-0851-01, GE Healthcare) equilibradas en PBS_{E-B-AbAm} diluido 1/20 (importante para el siguiente paso). Se colectó la elución del EgAgB, siguiendo las instrucciones del fabricante y la coloración amarilla, obteniendo 3.5 mL de EgAgB_F y 2 mL de EgAgB_{NF} (por error en la colección se perdió una porción del total). Las preparaciones se colocaron en tubos Falcon de 15 mL selladas con filtros de 0.22 μ m de 13 mm de diámetro (para conservar la esterilidad) y se concentraron \sim 20 veces en un rotavapor (SpeedVac) a temperatura media. Las mismas se llevaron a PBS_{E-B-AbAm} 1x utilizando columnas de desalado PD-10 de 500 μ L (Cytiva 28918007). Se separaron alícuotas de EgAgB_F y EgAgB_{NF} para determinar la concentración exacta por MicroBCA, el tamaño de las partículas por dispersión dinámica de la luz (DLS) y el contenido de endotoxinas mediante el ensayo LAL. Las preparaciones se conservaron en 10 % sacarosa a -20° C.

3.2.2. Caracterización de las preparaciones de EgAgB y de la HDL total

3.2.2.1. Evaluación del protocolo de purificación del EgAgB nativo por SDS-PAGE y Western Blot

Se determinó el perfil electroforético de las distintas fracciones obtenidas a lo largo del protocolo de purificación: LH, QS⁻, L_{QS}, QS⁺, L_{IA} y L_{pH5} y eluatos (E) derivados de los pools de LH fértil y no fértil. Debido a la baja concentración, las fracciones QS⁻, L_{QS}, QS⁺, L_{IA} y L_{pH5} se precipitaron con TCA. Las muestras se incubaron a partes iguales con TCA 20 % por 20 minutos a 4°C, se centrifugó a 11000 g por 20 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 1 mL de acetona. Se centrifugó nuevamente a 11000 g por 20 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en solución amortiguadora de muestra 6x (Tris-HCl 0.35 M, pH 6.8, SDS 10 %, glicerol 10 %, con azul de bromofenol y DTT 40 µM) ajustando el pH cuando fue necesario y se calentaron por 5 minutos a 100°C. La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras según el protocolo de Laemmli (75). Se utilizaron geles discontinuos con una región concentradora (4 %) y otra separadora (15 %) de 1.5 mm de espesor. Se usó como marcador de peso molecular (MPM) el marcador pre-teñido de Sigma (#26616). La corrida se realizó con solución amortiguadora de corrida (Tris 0.3 %, glicina 1.44 %, SDS 0.1 %) en el sistema Mini Protean 3 (Bio-Rad), aplicando entre 25-35 mA durante toda la corrida (aproximadamente 1 hora). Para visualizar las proteínas se sumergió el gel en una solución de fijación conteniendo metanol 40 % y ácido acético 10 % por 1 hora y posteriormente en colorante azul de Coomassie coloidal R-250 (0.1 %) durante toda una noche. Se destiñó realizando lavados con agua destilada durante todo un día.

Para analizar la presencia de EgAgB por Western Blot, se transfirieron las proteínas del gel (corrido en paralelo al teñido con coomassie) a una membrana PVDF (Millipore-Merck, EEUU), utilizando el sistema de electrotransferencia húmeda (Bio-Rad) con voltaje constante de 56 V durante toda la noche y una solución amortiguadora de transferencia (Tris-base 50 mM, glicina 380 mM, SDS 0.1 %, metanol 20 %). A continuación, se bloqueó la membrana con leche descremada 5 % por 1 hora y se incubó con el sobrenadante del hibridoma productor del anticuerpo monoclonal de ratón EB7 anti-EgAgB8/1 por otra hora, todo a temperatura ambiente. La presencia del EB7 se evidenció incubando con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (1:2000, Calbiochem). Para revelar se utilizó el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Thermo Fischer Scientific), siguiendo instrucciones del fabricante. Entre cada paso de incubación se realizaron tres lavados con PBS-Tween 0.05 % de 5 minutos cada uno, excepto previo al revelado que se hicieron 5 lavados. La membrana se fotografió utilizando el sistema (G: BOX, Syngene, India).

3.2.2.2. Determinación de la concentración proteica

La concentración de las preparaciones EgAgB_F, EgAgB_{NF} y HDL total se determinó utilizando el kit MicroBCA (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizaron diluciones de EgAgB_F y EgAgB_{NF} para alcanzar una concentración de ~2.5, 10 y 20 µg/mL (según concentración estimada en NanoDrop). Como diluyente de la curva estándar y para el blanco se utilizó PBS_{E-B-AbAm} diluido tantas veces como se diluyó el EgAgB a la concentración de ~20 µg/mL (1/41). Se sembraron 150 µL de cada preparación (estándar y muestra) por duplicado y 150 µL del mix de reacción en placas de microtitulación, se incubó por 2 horas a 37°C y se midió la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro de placas. Se restó el valor del blanco a todos los valores obtenidos y se graficó absorbancia vs concentración del estándar. A partir de la ecuación de la recta se obtuvo la concentración de EgAgB_F y EgAgB_{NF}.

3.2.2.3. Determinación del radio hidrodinámico de las partículas

Se determinó el radio hidrodinámico (R_H) de las partículas de EgAgB de las preparaciones obtenidas y de la HDL utilizada en los ensayos mediante DLS (del inglés, *Dynamic Light Scattering*) con la colaboración de Federico Carrión de la Unidad de Biofísica de Proteínas del Instituto Pasteur de Montevideo. Se colocaron 70 µL de cada muestra a una concentración de 1 mg/mL en una cubeta descartable (UVette, Eppendorf) y se realizaron tres medidas consecutivas a 25°C en el equipo Zetasizer NanoS (Malvern, Panalytical). El equipo determina el cambio de la luz dispersada por las partículas presentes en la muestra, en un volumen y tiempo determinado para obtener el coeficiente de difusión. Luego convierte los valores a una distribución de tamaños mediante la relación Stokes-Einstein. Además, el equipo corrige los valores de intensidad por volumen, ya que las partículas más grandes dispersan luz con una intensidad mayor que las pequeñas. Los datos de mediciones por triplicado se promediaron y analizaron con el software Zetasizer v7.13 para obtener la distribución de tamaño de las muestras (ponderadas por volumen asumiendo esfericidad y homogeneidad de partículas). El R_H se calculó como el valor del diámetro dividido dos.

3.2.2.4. Cuantificación de endotoxinas bacterianas

La presencia de endotoxinas en las preparaciones EgAgB_F, EgAgB_{NF}, HDL y HDL₃ se analizó mediante el kit LAL (Thermo Scientific™ Pierce), que permite cuantificarlas mediante una señal cromogénica. Siguiendo las instrucciones del fabricante, se dispensaron en una placa estéril de 96 pozos 50 µL de las muestras o del estándar/blanco y 50 µL del reactivo LAL e incubaron por 10 minutos a 37°C. Luego se agregó 100 µL del sustrato cromogénico e incubó 6 minutos a 37°C y finalmente se dispensaron 100 µL del reactivo de detención de la reacción. Se cuantificó la absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro de placas. Se restó el valor del blanco a todos los valores obtenidos y se graficó absorbancia vs concentración del estándar. A partir de la ecuación de la recta se obtuvo la concentración de endotoxinas presentes en EgAgB_F, EgAgB_{NF}, HDL y HDL₃.

3.3. Cultivo celular

3.3.1. Medios de cultivo

Para los cultivos celulares se utilizaron los medios RPMI (RPMI 1640 suplementado con 1-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 %). Se adicionó suero fetal bovino (SFB, Capricorn), según se indica en cada caso.

3.3.2. Líneas celulares y cultivos primarios

Se utilizó la línea celular THP-1 (ATCC), pre-monocitos aislados de sangre periférica de paciente con leucemia monocítica aguda de entre 6 y 26 pasajes. Los viales con pocos pasajes (6-10) conservados en tanques de N₂ RPMI conteniendo 10 % SFB y 10 % DMSO (disponibles en el Laboratorio de Inmunología) se descongelaron sumergiendo en baño húmedo a 37°C. El contenido del vial se lavó dos veces con 40 mL de RPMI 20 % SFB centrifugando a 1000 rpm por 10 minutos a 20°C. Los pre-monocitos se cultivaron en frascos T-25 (Greiner, #690160) con 7.5 mL de RPMI-20 % SFB en atmósfera húmeda a 37°C con 5 % CO₂ hasta alcanzar una concentración de 1.0x10⁶ células/mL. Luego se mantuvieron en RPMI-10 % SFB sub-cultivando cada 3-4 días para mantener la densidad celular entre 0.2 y 1.0x10⁶ cél/mL. Para los experimentos los pre-monocitos se amplificaron en frascos de cultivo T-75 y posteriormente diferenciaron a macrófagos con PMA 50 ng/mL en RPMI-5 % SFB por 72 horas. Para los experimentos de estimulación se eliminó el PMA a las 48 horas y se agregó RPMI-5 % SFB por 24 horas.

Por otro lado, se emplearon macrófagos derivados de médula ósea de ratón (BMDM, del inglés, *Bone Marrow Derived Macrophages*). Su obtención se realizó siguiendo el protocolo N° 538 avalado por la CHEA-UdelaR. Se utilizaron hembras de las cepas C57BL/6 o 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. Los ratones se sacrificaron mediante el anestésico inhalatorio isofluorano. Se diseccionaron sus patas para recuperar las tibias y los fémures. En cámara de flujo laminar, se limpiaron dichos huesos con etanol 70 % utilizando papel absorbente y se colocaron en una placa de Petri con DMEM. Se cortaron las epífisis de los huesos y se perfundió el canal medular de cada hueso con 6 mL totales, utilizando una jeringa estéril con aguja 24G, de manera de extraer la médula ósea. Los agregados celulares se rompieron pipeteando suavemente y la suspensión obtenida se centrifugó a 1000 rpm por 10 minutos a 20°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 5 mL de DMEM para el conteo. Se plaquearon 7.5x10⁶ progenitores por placa de Petri estériles (10 cm, Greiner #633181) en 15 mL de medio DMEM conteniendo 10 % SFB y 15 % sobrenadante de cultivo L929 (disponible en el Laboratorio de Inmunología, como fuente de M-CSF para lograr la diferenciación de los progenitores murinos a macrófagos). Al quinto día se realizó un cambio de medio (DMEM conteniendo 10 % SFB y 15 % sobrenadante de cultivo L929) y 2 días después se cosecharon los macrófagos por despegado mecánico, pipeteando con PBS conteniendo EDTA 3 mM y glucosa 0.1 %. Se obtuvieron entre 5.0x10⁶ y 8.0x10⁶ células totales en cada cosecha.

3.3.3. Determinación de la concentración y viabilidad celular

El conteo de células viables se realizó en cámara de Neubauer, utilizando una dilución del cultivo que permitiera contar entre 20 y 60 células por cuadrante de la gradilla grabada en la cámara. Se utilizó tripán blue como marcador de viabilidad. Luego de obtener el promedio de células por cuadrante se multiplicó por el factor de dilución y se calculó el número de células/mL.

3.4. Ensayos de estimulación de macrófagos en ausencia y presencia del agonista LPS

Se plaquearon 0.2×10^6 macrófagos (THP-1 en RPMI 5 % SFB o BMDM en DMEM 1 % SFB) por pozo en placas de 96 pocillos y se estimularon las células por incubación durante 24 horas con las siguientes muestras en ausencia o presencia de LPS (10 ng/mL): EgAgB_F (1, 5 y 10 µg/mL), EgAgB_{NF} (1, 5 y 10 µg/mL), HDL a (1, 5 y 10 µg/mL). En paralelo se incubaron células con LPS (10 ng/mL, máxima estimulación esperada) o el vehículo (PBS_{E-B-AbAm}) como control. Transcurridas 24 horas de estimulación se colectaron los sobrenadantes en una placa de microtitulación y se los preservó a -20°C. Se realizaron tres experimentos independientes con triplicados analíticos. Debido a que la preparación de HDL está compuesta por varios tipos de lipoproteínas y, como se mencionó anteriormente, la HDL₃ es la más similar al EgAgB, en un ensayo se utilizó una preparación pura de HDL₃ ensayadas por triplicado. No se dispuso de esta preparación al inicio de este trabajo.

3.4.1. Cuantificación de citoquinas

La cuantificación de los mediadores solubles en los sobrenadantes de cultivo (IL-6, IL-1β, IFN-β para THP-1, e IL-6, IL-12p40, IL-10, IFN-β y nitritos para BMDM) se realizó mediante ELISA (del inglés, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), utilizando kits comerciales y siguiendo las indicaciones recomendadas por el fabricante (Tabla 1). De manera general, se sensibilizaron placas de 96 pozos con alta capacidad de unión (Maxisorp, Nunc) con los anticuerpos de captura correspondientes por 24 horas a 4°C. Luego, se bloqueó con 1 % BSA o 10 % SFB (según el kit) por 1 hora a 37°C. Posteriormente, se sembraron las muestras y el estándar a las diluciones adecuadas y un blanco (diluyente). Pasadas 2 horas de incubación a 37°C, se sembró el anticuerpo de detección conjugado a biotina y la estreptavidina-peroxidasa (PO) e incubó por 1 hora a 37°C. Para revelar se emplearon 100 µL por pozo de acetato 0.1 M conteniendo TMB y H₂O₂ y se detuvo la reacción con 50 µL por pozo de H₂SO₄ 1 M. Entre cada paso de incubación se realizaron 5 lavados con PBS-Tween (0.05 %), excepto previo a la incubación con la solución de revelado, cuando se hicieron 7 lavados. Se cuantificó la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro de placas, corrigiendo con la absorbancia a 560 nm. Se restó el valor del blanco a todos los valores obtenidos y se graficó en Excel (Microsoft) la absorbancia en función de la concentración de la serie de diluciones del estándar. A partir de la ecuación de la recta se obtuvo la concentración de citoquinas en la muestra. Utilizando GraphPad se graficó para cada condición la concentración de cada citoquina relativa a la generada por la estimulación con LPS (100 %).

Tabla 1. Kits de ELISA utilizados para cuantificar mediadores solubles en los sobrenadantes de cultivo celular.

Especie	Citoquina	# catálogo
Humano	IL-6	BD 555220
	IL-1 β	BD 557953
	IFN- β	R&D DY 814-05
Ratón	IL-6	R&D DY 406
	IFN- β	R&D DY 8234-05
	IL-10	R&D DY 417
	IL-12	R&D DY 2398

3.4.2. Cuantificación de nitrito como medida de la generación de NO•

Se determinaron los niveles de NO²⁻ acumulados en los sobrenadantes de cultivo para evaluar la producción de óxido nítrico por las células. El método se basa en la reacción de diazotización de Greiss que utiliza sulfanilamida y N-(1-Naftil) etilamina diclorhidrato (NED) bajo condiciones ácidas. Se dispensaron 50 μ L del sobrenadante de cultivo en placas de microtitulación de 96 pozos y se 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 100 μ M. La placa se incubó a temperatura ambiente por 5-10 minutos en oscuridad y se midió la absorbancia a 560 nm en un espectrofotómetro de placas.

3.5. Ensayos de competencia por la unión a macrófagos entre el LPS y el EgAgB o la HDL

Se siguió el protocolo puesto a punto por Maite Folle en su tesis de doctorado (33). Se plaquearon 0.2x10⁶ macrófagos THP-1 en placas de fondo cónico y se los incubó con 50 μ L de EgAgB o HDL (1-200 μ g/mL), OVA (200 μ g/mL) como control o vehículo (PBS_{E-B-AbAm}), por 30 minutos a 37°C. Posteriormente se agregaron 50 μ L de LPS conjugado al fluorocromo Alexa-488 (5 μ g/mL LPS*, Molecular Probes) por 30 minutos a 37°C. 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 (FACS Calibur). La unión del LPS* a las células en las diferentes condiciones de competencia se expresó como el porcentaje de unión promedio, relativo a la unión del LPS* en vehículo.

3.6. Ensayos de evaluación de la capacidad del EgAgB de unir el LPS

La capacidad del EgAgB de unir el LPS se analizó siguiendo el protocolo reportado por Han *et al.*, 2021. Para ello se inmovilizó la HDL, el EgAgB_F o la OVA como proteína control (10 µg/mL) en microplacas de ELISA de 96 pozos con alta capacidad de unión (Maxisorp, Nunc) durante toda la noche a 4°C. En paralelo, se prepararon pozos control donde se incubó con PBS durante la sensibilización, para evaluar interacciones inespecíficas con el bloqueante (control del bloqueante). Se bloqueó con PBS-1 %BSA por 1.5 horas a temperatura ambiente. Se pre-incubaron las distintas concentraciones de LPS-biotina (0, 10, 100 y 1000 ng/mL, InvivoGen #tlrl-lpsbiot) con o sin hLBP (*human* LBP, 1 µg/mL, R&D Systems #6445-LP) por 1 hora a temperatura ambiente y se incubaron luego en las placas por 45 minutos a 37°C (100 µL). Posteriormente, se realizó el agregado de 100 µL por pozo de Sv-HRP (Sigma #5512) por otros 45 minutos a 37°C. Las incubaciones de la placa se realizaron siempre en cámara húmeda y entre cada incubación se realizaron 5 lavados con PBS Tween 0.05 %, excepto luego de la sensibilización que se hicieron 2. Para revelar se emplearon 100 µL por pozo de acetato 0.1 M conteniendo TMB y H₂O₂ y se detuvo la reacción con 50 µL por pozo de H₂SO₄ 1 M. Se cuantificó la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro de placas, corrigiendo con la absorbancia a 560 nm. Se restó el valor del control del bloqueante (correspondiente a la concentración de LPS y LBP utilizada) a los valores obtenidos para las muestras y se graficó en GraphPad la densidad óptica en función de la concentración de LPS-biotina.

3.7. Análisis de los datos

Todos los experimentos se realizaron al menos 3 veces (n = 3, salvo 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 8, GraphPad Software, EE. UU, (www.graphpad.com)). Para el análisis comparativo se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) 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.

4. Resultados

4.1. Purificación del EgAgB nativo a partir de LH y caracterización de las preparaciones obtenidas

Como se mencionó en la introducción, el LH es una mezcla compleja de glicoproteínas, lipoproteínas, hidratos de carbono y sales minerales derivadas tanto del parásito como del hospedero (76). El EgAgB, a pesar de ser uno de los componentes parasitarios más abundante en el LH, se encuentra en baja proporción. Por tal motivo, la obtención de esta lipoproteína en su estado nativo requiere aplicar un paso inicial de enriquecimiento por cromatografía de intercambio aniónico sobre Q-Sefarosa y luego un paso de purificación mediante cromatografía de inmunoafinidad, en nuestro caso basada en el uso de anticuerpos VHHs anti-EgAgB8/1 (33).

En este trabajo se purificó el EgAgB nativo a partir de dos *pools* de LH, uno derivado de hidátides fértiles (n=9) y otro de no fértiles (n=6). Las fracciones recolectadas a lo largo del protocolo (detallado en la sección 2.2) se analizaron por SDS-PAGE y Western Blot (Figura 4.1 A y B, respectivamente). El perfil electroforético del LH mostró bandas de alto peso molecular compatibles con la presencia de albúmina (banda intensa de ~65 kDa) e inmunoglobulinas (bandas de ~50 y 25 kDa) del hospedero, señaladas con flechas en Figura 4.1 A, y una banda de entre 10 y 15 kDa que corresponde a la forma monomérica del EgAgB, como se evidencia en el Western-Blot (aunque las subunidades del EgAgB pesan 8 kDa, por lo general migran un poco menos). La baja proporción del EgAgB, antes de la purificación, en el LH no permitió observar el patrón de bandas característico del EgAgB tras su análisis por SDS-PAGE. La cromatografía de intercambio aniónico logró retirar gran parte de la albúmina e inmunoglobulinas, las cuales se hicieron presentes en la fracción no retenida por la Q-Sefarosa (QS⁻) y en el lavado de la matriz (L_{QS}). La fracción asociada a la Q-Sefarosa (QS⁺) se enriqueció en el EgAgB respecto al LH, mostrando un perfil tenue de 3 bandas espaciadas regularmente (Figura 4.1 B). La cromatografía de inmunoafinidad permitió purificar el EgAgB_F y EgAgB_{NF} (patrón de bandas espaciadas regularmente -en escalera- con una forma monomérica y al menos 4 formas oligoméricas), eliminando de la fracción otros componentes del hospedero y del parásito presentes en QS⁺ que no son retenidos por el VHH anti-EgAgB8/1.

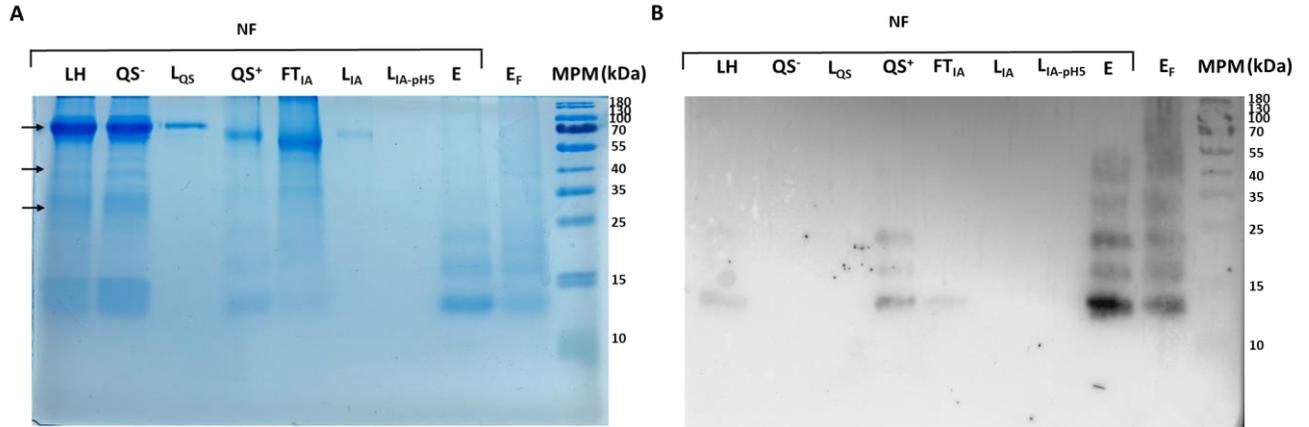


Figura 4.1. Purificación del EgAgB nativo a partir de LH. Análisis por (A) SDS-PAGE y (B) Western Blot de las fracciones obtenidas a lo largo del protocolo de purificación del EgAgB a partir del LH, utilizando cromatografía de intercambio aniónico sobre Q-Sefarosa seguido de cromatografía de inmunoafinidad con VHH anti-EgAgB8/1. Las fracciones se sembraron en geles de poliacrilamida (15 %) bajo condiciones reductoras (6mM de DTT) y se visualizaron (A) por tinción con azul de Coomassie o (B) transfiriendo a una membrana de PVDF para revelar la presencia de EgAgB8/1. Se sembraron las siguientes fracciones correspondientes a la purificación de EgAgB_{NF}: líquido hidático (LH), fracción no unida a la Q-Sefarosa (QS-), lavado de Q-Sefarosa (L_{QS}), fracción unida a la Q-Sefarosa (QS+), percolado de la cromatografía de inmunoafinidad de QS+ (FT_{IA}), lavado de la columna de inmunoafinidad (L_{IA}), lavado de la columna de inmunoafinidad a pH 5 (L_{IA-pH5}) y eluato de la columna de inmunoafinidad (E). La figura es representativa de la purificación lograda para EgAgB_{NF}; pero además se muestra el EgAgB_F, obtenido, correspondiente al eluato final de la inmunoafinidad (E_F). En el último carril se sembró el marcador de peso molecular (MPM).

El protocolo de purificación aplicado permitió obtener 430 μ L de EgAgB_F a 2.0 mg/mL y 450 μ L de EgAgB_{NF} a 1.3 mg/mL (de este último se perdió una proporción de EgAgB por un error en la colecta de las columnas de desalado). De acuerdo con estos datos, la realización de la cromatografía sobre Q-Sefarosa utilizando el sistema estéril *in batch* rindió 860 μ g de EgAgB_F de 100 mL de LH de rendimiento final.

Las preparaciones de EgAgB_F, EgAgB_{NF} y, adicionalmente, la preparación de HDL total, se caracterizaron en términos de su tamaño molecular. El análisis por dispersión dinámica de la luz (DLS, sección 3.2.2.3) permitió determinar el radio hidrodinámico promedio y la distribución de tamaños de las partículas lipoproteicas presentes en la muestra (Figura 4.2). EgAgB_F y EgAgB_{NF} arrojaron gráficos con picos definidos, de $R_H=6.83 \pm 0.99$ y $R_H=8.90 \pm 0.68$ nm, con índices de polidispersión (PDI, del inglés *Polydispersity Index*) de 0.435-0.446 y 0.504-0.567, respectivamente. Por su parte, la HDL total mostró un pico con un $R_H=5.6 \pm 2.06$ nm y un PDI entre 0.371 y 0.429.

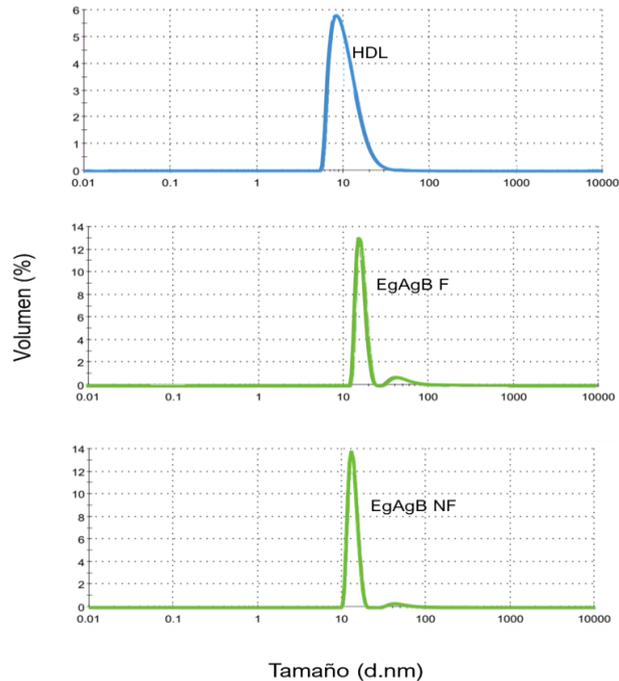


Figura 4.2. Tamaño de las partículas lipoproteicas presentes en HDL total, EgAgB_F y EgAgB_{NF} por DLS. Gráficos representativos de la distribución de las poblaciones de partículas presentes en las preparaciones de HDL total, EgAgB_F y EgAgB_{NF}, de acuerdo con el tamaño estimado determinado según la medida de la luz dispersada ajustado por el volumen. Para el cálculo del radio hidrodinámico promedio de las partículas (R_H) se tomó el valor del diámetro promedio de tres medidas consecutivas y se dividió entre dos. en Ldf n

Los niveles de endotoxinas (UE/mL) en las preparaciones se determinaron mediante el kit LAL (Thermo Scientific™ Pierce). Los resultados mostraron que la HDL total contenía niveles menores a 0.01 UE/ μ g de HDL, correspondientes a 0.001 ng/ μ g de proteína. Por otra parte, se detectaron en el EgAgB_F y EgAgB_{NF} 0.52 y 0.55 UE/ μ g proteína, correspondientes a 0.052 y 0.055 ng de LPS/ μ g de proteína. Este contenido se tomó en cuenta al momento de discutir acerca de los efectos del EgAgB sobre los macrófagos.

4.2. Modulación de la activación inflamatoria de macrófagos inducida por LPS por el EgAgB nativo y la HDL total

Para determinar si el EgAgB nativo y la HDL comparten propiedades moduladoras de la respuesta que el LPS induce en los macrófagos, se realizaron experimentos de estimulación en macrófagos THP-1 y BMDM (sección 3.4), para posteriormente cuantificar los mediadores solubles producidos por ELISA (sección 3.4.1). Debido a que se registraron diferencias en la intensidad de la respuesta entre experimentos independientes, posiblemente asociadas a la preparación celular y/o a variaciones inherentes a los reactivos/manipulación, los resultados se normalizaron tomando como 100 % la respuesta generada por el LPS en presencia del vehículo.

La Figura 4.3 presenta los resultados correspondientes a la estimulación de los macrófagos THP-1. EgAgB_F, EgAgB_{NF} y HDL total no generaron *per se* respuesta de las citoquinas pro-inflamatorias cuantificadas, a ninguna de las concentraciones ensayadas, mientras que la estimulación con LPS indujo la producción de IL-6, IL-1 β e IFN- β por parte de los macrófagos THP-1. En presencia de EgAgB_F y EgAgB_{NF} se observó una fuerte interferencia sobre la respuesta de IL-6 inducida por el LPS, que disminuyó en forma dependiente de la dosis (aunque no significativa entre EgAgB_{NF} a 5 y 10 μ g/mL). Este efecto inhibitorio a 1 μ g/mL fue mayor para EgAgB_{NF} que para EgAgB_F pero no se observaron diferencias entre ellos al emplear 5 y 10 μ g/mL. Por el contrario, la estimulación con HDL total no generó cambios significativos en la respuesta de IL-6 promovida por el LPS. Además, se observó que en presencia de HDL los efectos del EgAgB_F se mantuvieron mayormente, mostrando un perfil de inhibición similar; sólo a la concentración de 1 μ g/mL existió una inhibición menor respecto a la promovida por el EgAgB_F. Los gráficos correspondientes a IL-1 β e IFN- β muestran resultados en la misma dirección. Se observó una robusta interferencia con la respuesta al LPS de IFN- β pero que no alcanzó la significancia estadística a la concentración de 1 μ g/mL de EgAgB_F y EgAgB_{NF}. IL-1 β disminuyó significativamente sólo a la concentración de 10 μ g/mL de EgAgB_F y EgAgB_{NF}. La presencia de HDL tampoco influyó en los efectos inhibitorios del EgAgB_F particularmente a las concentraciones de 5 y 10 μ g/mL (para IL-1 β la inhibición fue menor a 1 μ g/mL y para IFN- β fue menor a 1 y a 5 μ g/mL). Respecto a citoquinas anti/inflamatorias, de acuerdo con los antecedentes de nuestro grupo, en estas condiciones de estimulación no se detecta la producción de IL-10.

En conjunto, utilizando la línea celular THP-1 de origen humano, se evidenció que las preparaciones EgAgB_F y EgAgB_{NF} tienen la capacidad de modular la activación inflamatoria inducida por el LPS en macrófagos, inhibiendo la secreción de IL-6, IL-1 β e IFN- β , al contrario de HDL que no exhibió propiedades inhibitorias bajo las condiciones experimentales empleadas.

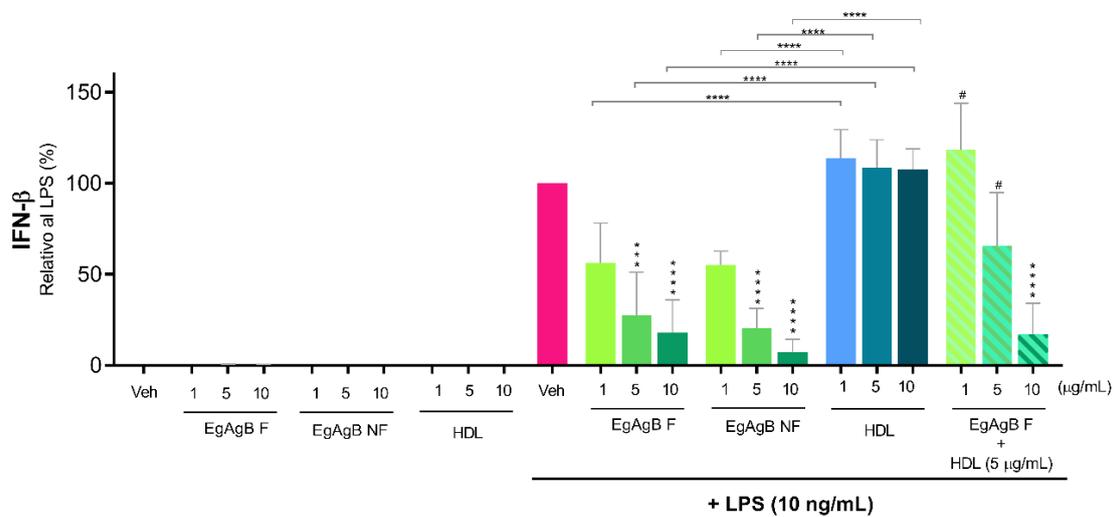
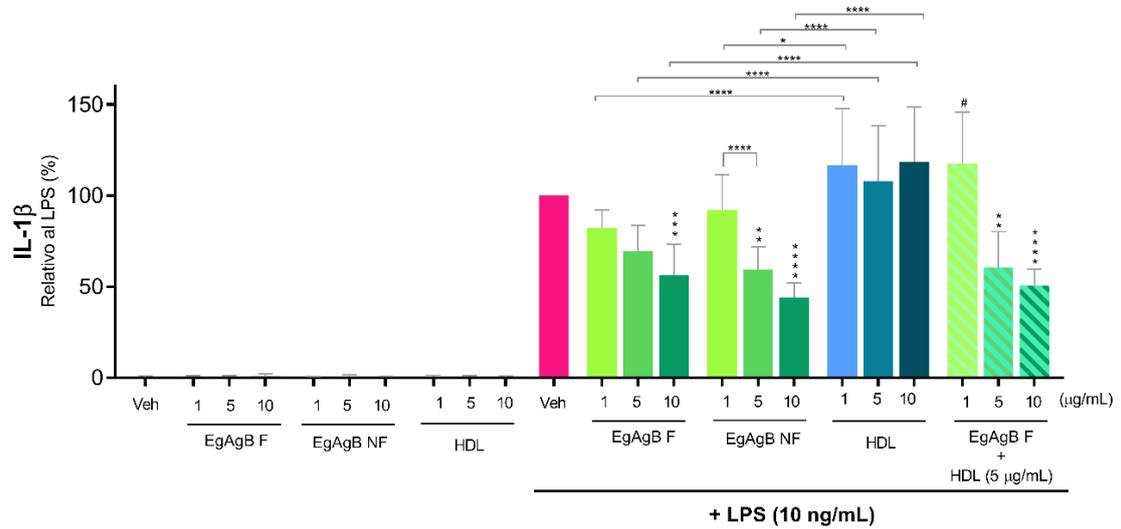
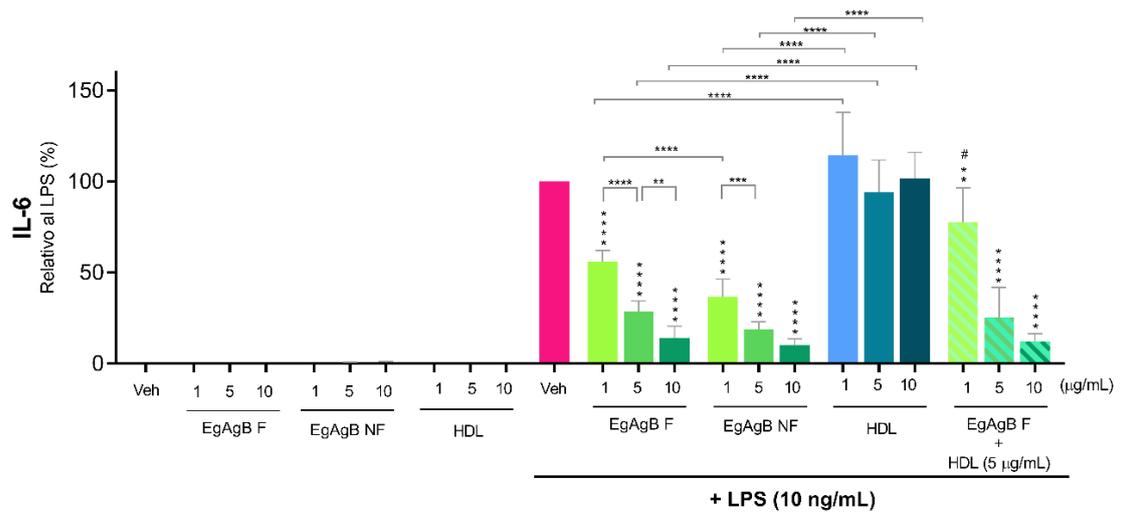


Figura 4.3. Efecto del EgAgB y de la HDL sobre la secreción de IL-6, IL-1 β e IFN- β inducida por LPS en macrófagos THP-1. Se estimularon 0.2×10^6 macrófagos THP-1 con EgAgB_F/EgAgB_{NF} o HDL a distintas concentraciones (1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en ausencia o presencia de LPS (10 ng/mL). Además, se estimuló con HDL a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y distintas concentraciones de EgAgB_F (1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en presencia de LPS (10 ng/mL). En todos los ensayos se utilizó el diluyente de las preparaciones de EgAgB (PBS_{E-B-AbAm}) como control de vehículo (Veh). A las 24 horas se cuantificaron las citoquinas IL-6, IL-1 β e IFN- β presentes en los sobrenadantes de cultivo por ELISA de captura. El gráfico muestra el porcentaje de producción de cada citoquina relativo a la condición de LPS (media \pm SEM correspondientes a tres experimentos independientes con 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, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). Se indican con (#) sobre las barras las diferencias significativas ($\# p < 0.05$) con el EgAgB_F a las respectivas concentraciones.

La Figura 4.4 presenta los resultados correspondientes a la estimulación de BMDM. De manera similar a lo observado en la línea THP-1, EgAgB_F, EgAgB_{NF} y HDL total no promovieron *per se* una respuesta de IL-6. EgAgB_F y EgAgB_{NF} interfirieron de forma dosis-dependiente con los niveles de IL-6 generados en respuesta al LPS, comportamiento nuevamente no observado para la HDL total. El gráfico correspondiente a IL-12 muestra resultados en la misma dirección. Se observó interferencia con la respuesta al LPS alcanzando significancia estadística a la concentración de 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de EgAgB_F y EgAgB_{NF}. En los sobrenadantes de estos cultivos no se registraron niveles cuantificables de IFN- β e IL-10 para ninguna de las condiciones ensayadas. A diferencia de los macrófagos THP-1, los ensayos con BMDM permitieron analizar el efecto de las preparaciones lipoproteicas sobre la expresión/actividad de la iNOS (NOS2) inducida por la estimulación con LPS. Para ello se determinaron los niveles de NO_2^- utilizando el método de Greiss (sección 3.4.2). Al igual que en los casos anteriores, las preparaciones de EgAgB o de HDL no generaron *per se* una respuesta en los macrófagos. A concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ el EgAgB_F y EgAgB_{NF} interfirieron significativamente con la producción de nitrito respecto a la condición de LPS en vehículo (no hay diferencias significativas entre estas condiciones ni entre EgAgB_F y EgAgB_{NF}). Nuevamente, la HDL no logró interferir con la producción de nitrito en estas condiciones. Además, en ninguno de los parámetros medidos se observó que la HDL influyera significativamente en los efectos inhibitorios del EgAgB_F, excepto para IL-6 e IL-12 que se vio una disminución de la inhibición a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

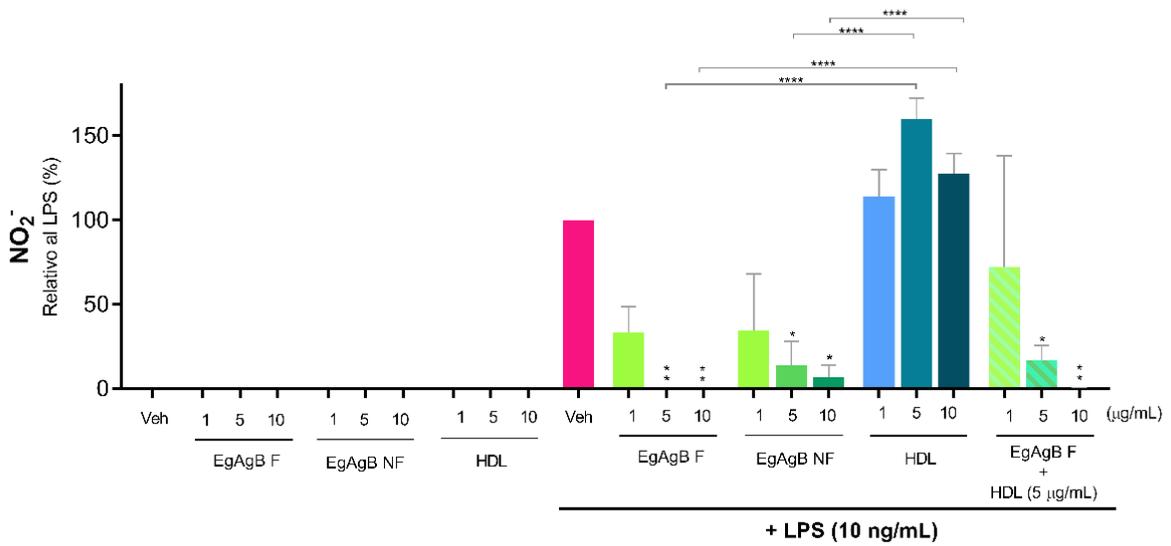
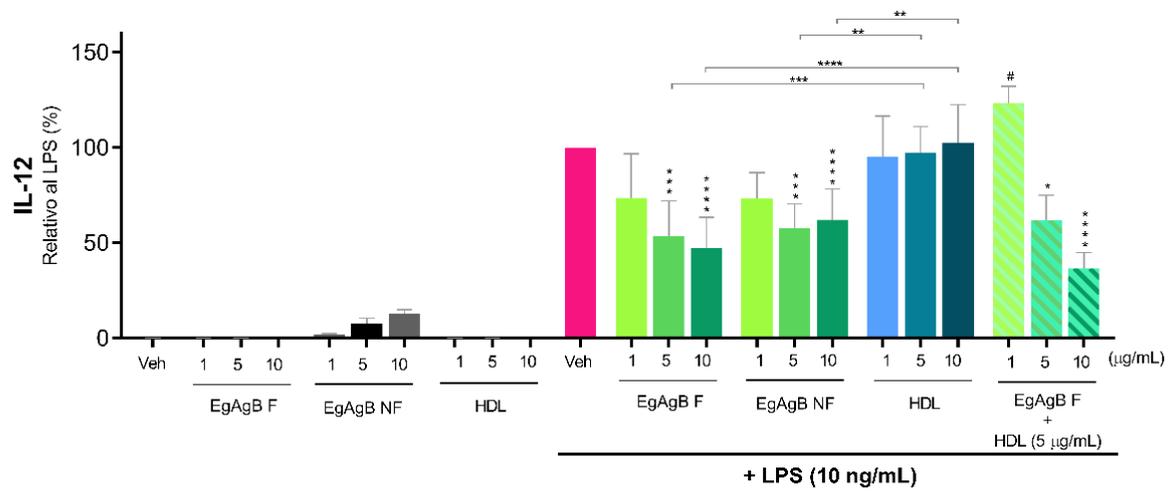
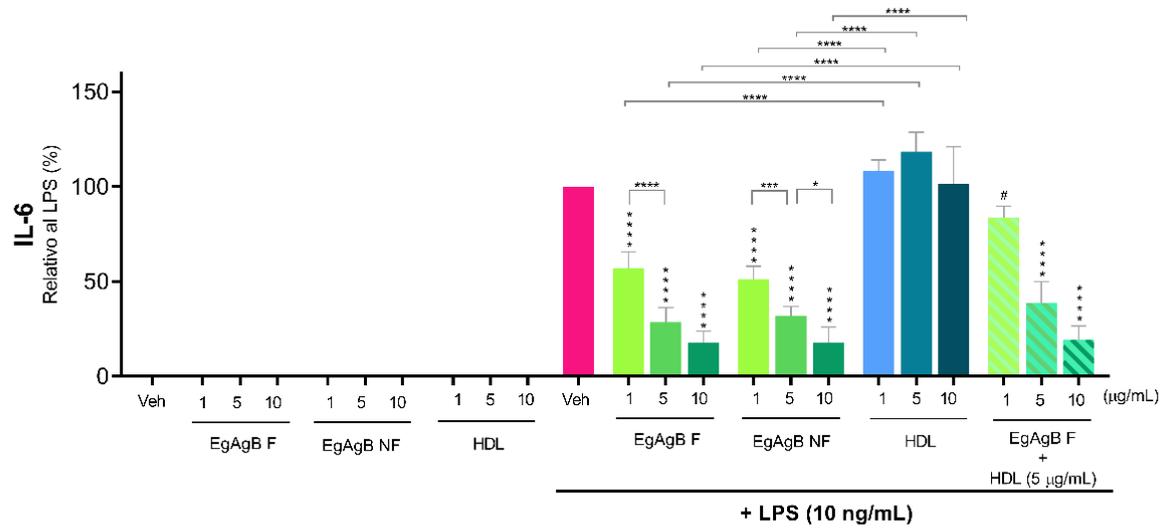


Figura 4.4. Efecto del EgAgB y de la HDL sobre la secreción de IL-6, IL-12 y liberación de nitrito inducida por LPS en macrófagos BMDM. Se estimularon 0.2×10^6 macrófagos BMDM con EgAgB_F/EgAgB_{NF} o HDL a distintas concentraciones (1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en ausencia o presencia de LPS (10 ng/mL). Además, se estimuló con HDL a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y distintas concentraciones de EgAgB_F (1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{m}$) en presencia de LPS (10 ng/mL). En todos los ensayos se utilizó el diluyente de las preparaciones de EgAgB (PBS_{E-B-AbAm}) como control de vehículo (Veh). A las 24 horas se cuantificaron las citoquinas IL-6 e IL-12 y el nivel de nitrito presente en los sobrenadantes de cultivo por ELISA de captura y reacción de diazotización de Greiss, respectivamente. El gráfico muestra el porcentaje de producción de cada citoquina relativo a la condición de LPS (media \pm SEM) correspondientes a tres experimentos independientes con 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, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$). Se indican con (#) sobre las barras las diferencias significativas ($\# p < 0.05$) con el EgAgB_F a las respectivas concentraciones.

Debido a que la preparación de HDL total está compuesta por varias sub-fracciones de lipoproteínas con distinta relación lípido:proteína y, como se mencionó anteriormente, la HDL₃ es la más similar al EgAgB nativo, se realizó un experimento con HDL₃ para evaluar su capacidad de modular la activación inflamatoria inducida por LPS en macrófagos THP-1 (Figura 4.5). Al igual que lo observado para la HDL total, HDL₃ no causó alteraciones significativas en la producción de IL-6, IL-1 β e IFN- β y el patrón observado fue muy similar al obtenido en los experimentos anteriores. Cabe mencionar que para HDL₃ existió una tendencia a la reducción de los mediadores cuantificados a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ que no se reforzó al aumentar la concentración. Adicionalmente, se observó una tendencia de la HDL₃ de disminuir los efectos inhibitorios del EgAgB_F sobre IL-1 β e IFN- β a todas las concentraciones ensayadas.

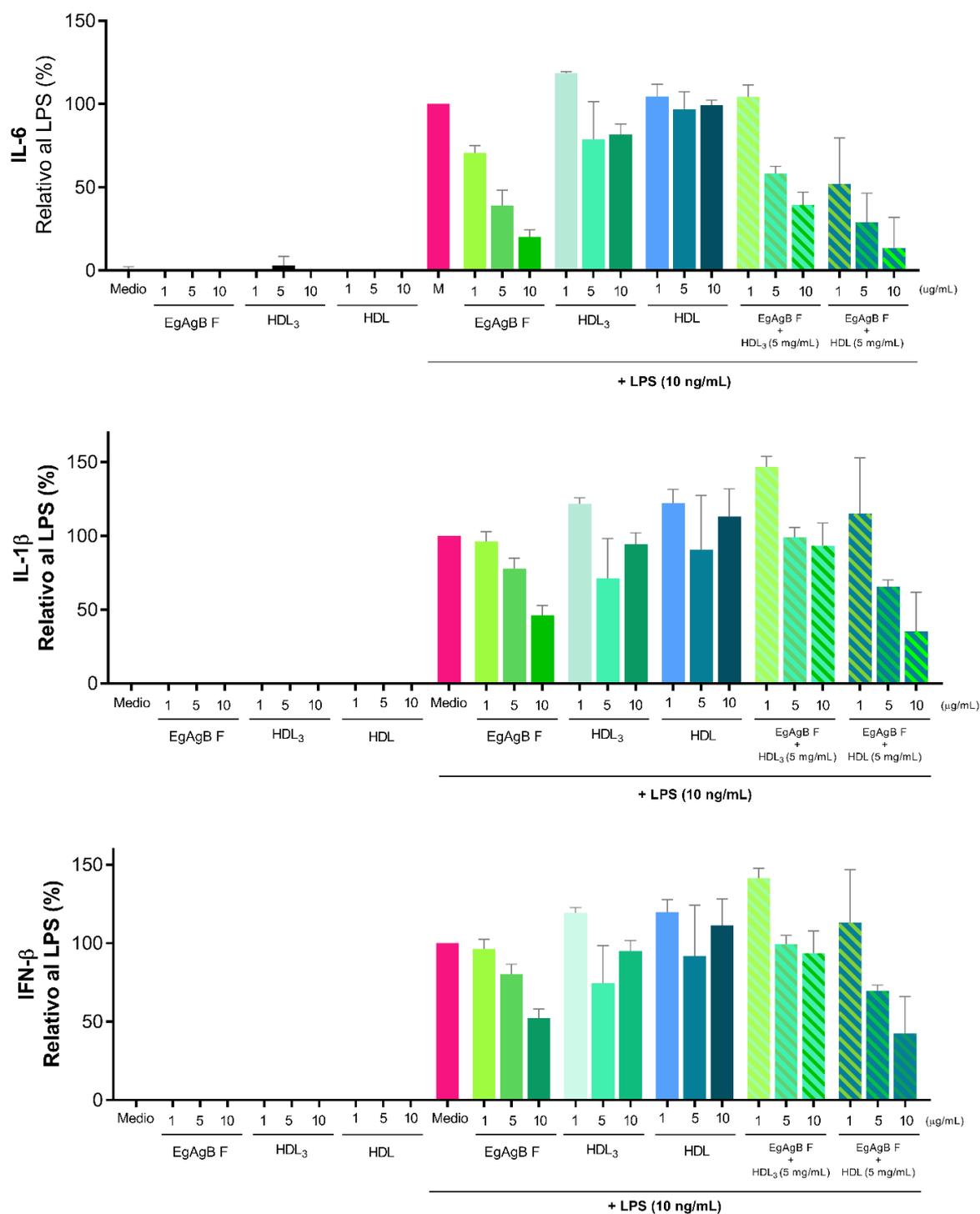


Figura 4.5. Efecto del EgAgB, HDL y HDL₃ sobre la secreción de IL-6, IL-1β e IFN-β inducida por LPS en macrófagos THP-1. Se estimularon 0.2×10^6 macrófagos THP-1 con EgAgB_F, HDL o HDL₃ a distintas concentraciones (1, 5 y 10 μg/mL) en ausencia o presencia de LPS (10 ng/mL). Además, se estimuló con HDL o HDL₃ a 5 μg/mL y distintas concentraciones de EgAgB_F (1, 5 y 10 μg/m) en presencia de LPS (10 ng/mL). En todos los ensayos se utilizó el diluyente de las preparaciones de EgAgB (PBS_{E-B-AbAm}) como control de vehículo (Veh). A las 24 horas se cuantificaron las citoquinas IL-6, IL-1β e IFN-β presentes en los sobrenadantes de cultivo por ELISA de captura. Se muestra el porcentaje de producción de cada citoquina relativo a la condición de LPS (media ± SEM correspondiente a un experimento con triplicados analíticos).

4.3. Capacidad del EgAgB nativo y de la HDL total de competir con el LPS por la unión a los macrófagos

Los resultados obtenidos en este y otros trabajos del grupo mostraron que el EgAgB nativo 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 (77,78). Dado que las lipoproteínas plasmáticas, incluyendo la HDL, pueden unir LPS, resulta posible que los efectos inhibitorios del EgAgB sean consecuencia de la unión EgAgB-LPS en el medio extracelular, neutralizando o alterando la interacción del LPS con el TLR4. En ensayos previos, se encontró que el EgAgB compite con la unión del LPS a los macrófagos (33). Dada la similitud con algunas propiedades de la HDL, en este trabajo buscamos comparar la capacidad del EgAB y de la HDL de desplazar la unión del LPS a los macrófagos THP-1 (sección 3.5) (33).

La Figura 4.6 presenta los resultados obtenidos en los ensayos de competencia entre EgAgB y HDL con el LPS por la unión a los macrófagos. La unión del LPS* a las células se evidencia por un aumento de fluorescencia respecto a aquellas incubadas sólo con vehículo (sin LPS*), que decrece en caso de existir competencia (se muestra un ejemplo para el EgAgB en la Figura 4.6 A). En la Figura 4.6 B, obtenida a partir de la consolidación de datos de 3 experimentos independientes, se observa que la unión del LPS* a los macrófagos se alteró en presencia de EgAgB_F y EgAgB_{NF} (sin diferencias significativas entre ellos) y en forma dependiente de la dosis: a 1 µg/mL no hubo competencia, a 10 µg/mL se observa una disminución de entre aproximadamente 10 y 20 % respecto al vehículo y a 100 y 200 µg/mL se observa una disminución de alrededor del 50 % (significativa respecto a 10 µg/mL). Entre 100 y 200 µg/mL no existió diferencia significativa en la unión del LPS*. La OVA a 200 µg/mL no alteró la unión del LPS* a los macrófagos, 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 razonable ya que las albúminas son proteínas con capacidad de unir lípidos (77)). Por su parte, la HDL disminuyó la unión del LPS* a los macrófagos a una concentración de 100 y 200 µg/mL, pero sólo alrededor de un 20 % (diferencia significativa con el EgAgB que alcanzó el 50 % a 100 y 200 µg/mL).

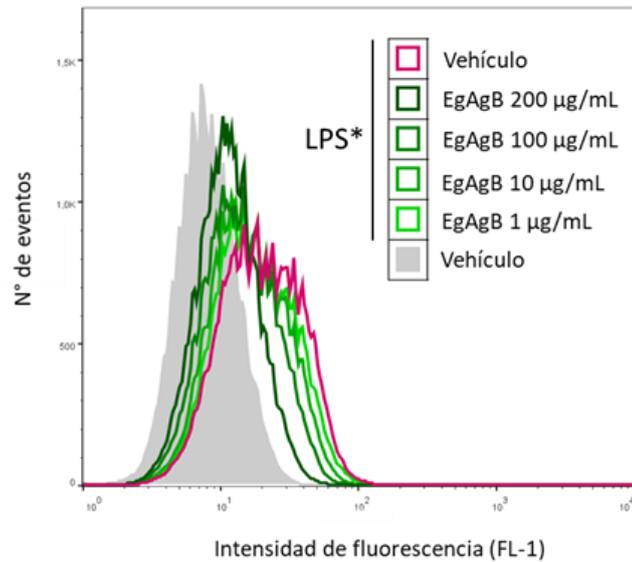
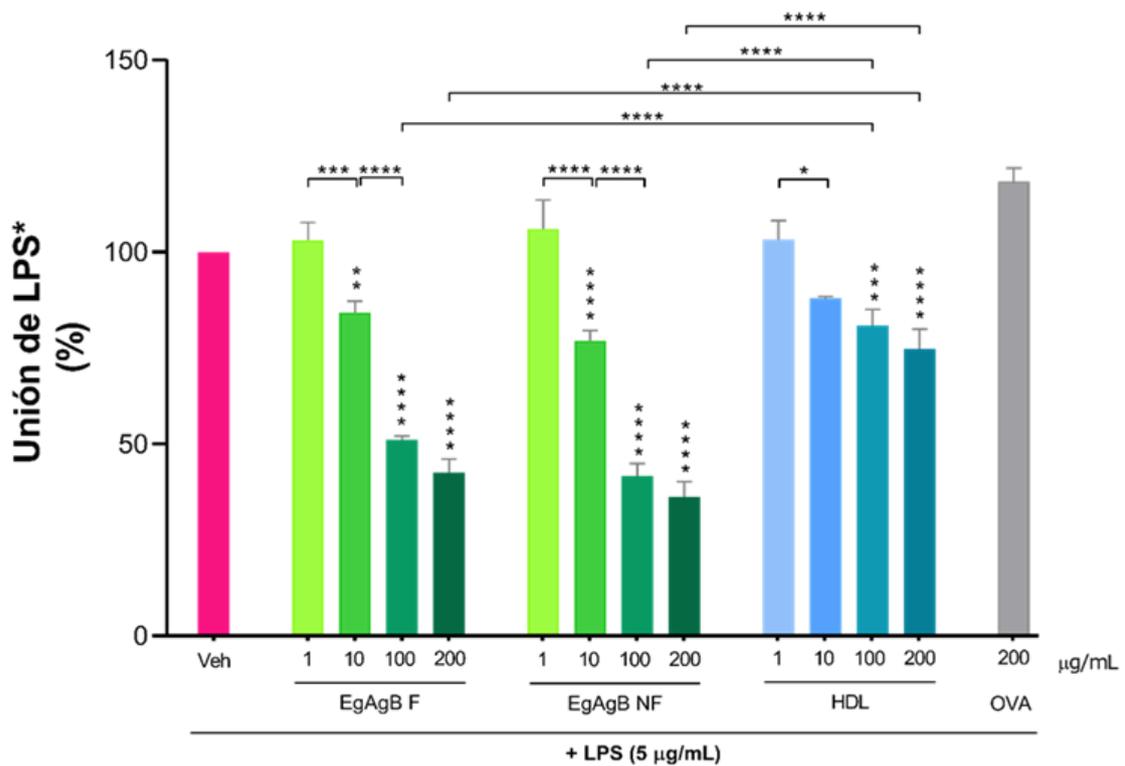
A**B**

Figura 4.6. Comparación de la capacidad del EgAgB y HDL de competir 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 fértil (F), no fértil (NF) y OVA (proteína control) por 30 minutos a 37° C con NaN₃. Se utilizó PBS_{E-B-AbAm} como control de vehículo (Veh). En (A) se muestra un histograma representativo para el EgAgB. En (B) se grafica el porcentaje de unión promedio del LPS*, relativo a la condición de unión del LPS* en vehículo -barra fucsia (± SEM correspondiente a tres experimentos independientes con triplicados analíticos). Se indican con (*) sobre las columnas los datos que mostraron diferencias significativas con el LPS* en vehículo y con (*) sobre corchetes los datos que mostraron diferencias significativas entre muestras (ANOVA de dos vías y prueba de Tukey, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001).

4.4. Capacidad del EgAgB de unir el LPS

Como ya se mencionó en la sección Introducción, se ha determinado que la HDL₃ posee potentes propiedades neutralizadoras de LPS (74). El conjunto de resultados previos de nuestro grupo sugiere que los efectos inhibitorios del EgAgB podrían ser al menos parcialmente mediados por neutralización del LPS en la fase extracelular. Para buscar más evidencias acerca de esta hipótesis realizamos un ensayo para valorar la unión directa del LPS a esta lipoproteína y al EgAgB_F, siguiendo el diseño experimental descrito por Han *et al.*, 2021 (74) (sección 3.6). El resultado obtenido se muestra en la Figura 4.7.

La unión del LPS a las lipoproteínas se evidencia por un incremento en la densidad óptica (DO_{450 nm}) al aumentar la concentración del LPS-biotina. La proteína control OVA no unió LPS-biotina a ninguna concentración ya que no se registró aumento de la densidad óptica (ni siquiera a 1000 ng/mL). En las condiciones sin LBP, la unión del LPS-biotina a las lipoproteínas solo se hizo evidente a una concentración de 1000 ng/mL, con una tendencia mayor para el EgAgB_F que para la HDL₃. En la condición EgAgB_F + LBP, la unión del LPS-biotina a esta lipoproteína se percibe a 100 ng/mL de LPS-biotina (DO_{450nm} = 0.4) y fue mayor a una concentración de 1000 ng/mL (DO_{450nm} = 1.4). Para la HDL₃, la unión se percibe únicamente a 1000 ng/mL de LPS-biotina (DO_{450nm} = 0.7), siendo aparentemente menor que el EgAgB_F. Estos resultados provienen de un único experimento con duplicados analíticos por lo que no se pudo aplicar una prueba estadística que determine la significancia de los datos. De todas maneras, corresponde mencionar que en otros tres ensayos más simples de este experimento se observó una tendencia similar para el EgAgB_F y la HDL₃.

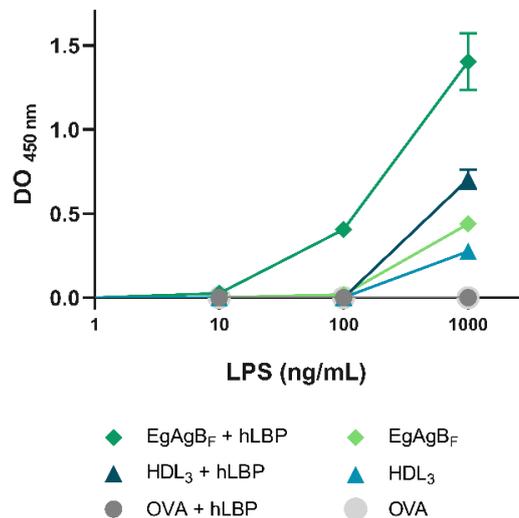


Figura 4.7. Análisis de la capacidad de unión del LPS-biotina al EgAgB y HDL₃. Se sensibilizaron placas de ELISA con EgAgB_F, HDL₃ y OVA como control (10 µg/mL) y se analizó la capacidad de unión del LPS-biotina (1, 10, 100 y 1000 ng/mL) en presencia o en ausencia de LBP humana (hLBP, 1 µg/mL). Se realizó un control (utilizando sólo PBS en la sensibilización) y se restó la absorbancia obtenida de este control a los correspondientes valores obtenidos para cada preparación. Se grafica la absorbancia en función de la concentración de LPS (media ± SEM correspondiente a un experimento independiente con duplicados analíticos).

5. Discusión y perspectivas

La purificación del EgAgB en su estado nativo, mediante el enriquecimiento por cromatografía de intercambio aniónico sobre Q-Sefarosa seguido de un paso de inmunoafinidad utilizando el VHHs anti-EgAgB8/1 (33) resultó exitosa. En cuanto al rendimiento, la purificación incluyendo el paso de Q-Sefarosa *in batch* permitió obtener 860 μg de EgAgB_F cada 100 mL de LH, superando el alcanzado en el sistema de columna empaquetada de Q-Sefarosa empleado anteriormente, que rendía menos de 400 μg cada 100 mL (33). No puede descartarse que estas diferencias en el rendimiento sean consecuencia de variaciones en el contenido de EgAgB entre diferentes pools de LH. Por otra parte, es posible que el uso del sistema automatizado FPLC (del inglés, *Fast Protein Liquid Chromatography*) para realizar la cromatografía de intercambio iónico contribuya a mayores pérdidas, ya que implica el pasaje del LH por filtros donde el EgAgB puede quedar retenido. De acuerdo con la experiencia del grupo el EgAgB es una lipoproteína que se adsorbe fácilmente al material plástico y queda atrapada en filtros (por ejemplo, durante procesos para concentrar la muestra). Es probable que esta retención y pérdidas afecten en mayor medida a las partículas de mayor tamaño, lo cual coincide con el hecho que las preparaciones de EgAgB nativo obtenidas mostraron un R_H levemente mayor que las obtenidas con el procedimiento anterior, tal como se comenta más abajo. Por otra parte, con el protocolo actual se realizó la totalidad de la purificación en la sala de cultivo, protegiendo a las muestras de contaminación, en comparación con el sistema en columna que se realizaba en una sala donde se utilizan diferentes equipos, se trabaja con muestras muy diversas y no hay control de la calidad del aire. Por las razones mencionadas, y debido a que como se discutirá más adelante las preparaciones de EgAgB nativo obtenidas mostraron una actividad y comportamiento similar a las previamente caracterizadas, resulta ventajoso a futuro seguir utilizando el protocolo de purificación empleado en este trabajo.

El análisis del tamaño de las partículas lipoproteicas y del contenido de pirógenos en las preparaciones de EgAgB ha sido una buena herramienta para comparar y evaluar los distintos lotes obtenidos y para determinar su utilidad en ensayos funcionales. Según los valores de PDI obtenidos mediante el análisis por DLS, EgAgB_F, EgAgB_{NF} y HDL total contuvieron una población de partículas relativamente homogénea compatible con la presencia de distintas sub-fracciones de lipoproteínas que coexisten en la preparación o de agregados (pico minoritario a la derecha del pico principal que se observó en las preparaciones del EgAgB). En cuanto al tamaño promedio de las lipoproteínas, la HDL total mostró un $R_H = 0.6 \pm 2.06$ nm, similar al obtenido por Folle en su doctorado (33) para el EgAgB nativo purificado utilizando el sistema de Q-Sefarosa en columna ($R_H = 5.77 \pm 0.25$), mostrando similitud entre ambas partículas. El R_H de las preparaciones de EgAgB nativo obtenidas en este trabajo resultó algo mayor para EgAgB_F ($R_H = 6.83 \pm 0.99$) y aún más para EgAgB_{NF} ($R_H = 8.90 \pm 0.68$ nm). Es posible que estas diferencias sean consecuencia del cambio en el protocolo de purificación, tal como se comentó arriba. Sin embargo, las diferencias de tamaño no se asociaron con cambios en la actividad inmunomoduladora de las preparaciones EgAgB_F y EgAgB_{NF}, ya que se comportaron de forma similar a preparaciones de EgAgB nativo testeadas anteriormente (33) en los experimentos de estimulación y competencia de la unión con el LPS en macrófagos (33). Respecto al contenido de endotoxinas, la HDL arrojó un resultado negativo mientras que las preparaciones de EgAgB contuvieron 0.05 ng de LPS/ μg de proteína. Los fabricantes de muchos medios de cultivo y de suero bovino fetal con bajo contenido de endotoxina certifican que sus productos contienen menos de 0.1 ng de endotoxinas por mL (80). Tomando como referencia este valor, las preparaciones utilizadas

tienen un bajo contenido de LPS, que sería menor de este umbral cuando se ensayó el EgAgB a 1 µg/mL, pero 2.5 y 5 veces mayor cuando se ensayó a 5 y a 10 µg/mL, respectivamente. Es llamativo que a pesar de todos los cuidados en el procesamiento de la muestra y la utilización de un paso final de inmunoafinidad en la purificación, las preparaciones obtenidas no están libres de LPS. Esto probablemente sea consecuencia de la capacidad del EgAgB de unir LPS (aún en mayor medida que la HDL), observación que se discute más adelante. De todas maneras, en los experimentos de estimulación, las preparaciones de EgAgB no indujeron por sí solas la producción significativa de ninguno de los mediadores inflamatorios determinados en macrófagos y por tanto pueden considerarse aptas para su uso en los experimentos planteados, cumpliendo así con el primer objetivo de la tesina.

Los ensayos de estimulación permitieron verificar que EgAgB_F y EgAgB_{NF} reprodujeron la ya reportada capacidad del EgAgB nativo de modular la activación inflamatoria de los macrófagos en respuesta al LPS, tanto en el modelo de macrófagos THP-1 como en BMDM (28,33). Estos resultados *in vitro* concuerdan además con resultados *in vivo* de nuestro grupo, que muestran que el EgAgB disminuyó los niveles de IL-6 e IL-12p40 inducidos por LPS en cavidad peritoneal de ratones, y de otros autores, que observaron que el EgAgB redujo los síntomas de la enfermedad inflamatoria del intestino inducida por DSS mediante la polarización de una respuesta gobernada por macrófagos M2 (66).

Las preparaciones EgAgB_F y EgAgB_{NF} mostraron efectos muy similares en relación a la capacidad inhibitoria de los distintos mediadores solubles cuantificados. En otras palabras, la fertilidad de las hidátides de partida (fértil/no fértil) no condicionó las propiedades moduladoras del EgAgB, a diferencia de observaciones realizadas por el grupo en otras oportunidades en las que existió menor o nula capacidad de inhibición en preparaciones derivadas de *pooles* de hidátides no fértiles con relación a las fértiles. Un factor que debe tomarse en cuenta es que la ausencia de PE, y por tanto la clasificación de hidátide no fértil, puede ser consecuencia de variados escenarios que hacen que esas hidátides puedan tener características muy diferentes. Por ejemplo, la ausencia de PE podría ocurrir en, una hidátide muy joven y viable en un hospedero en el cual ha establecido mecanismos fuertes de regulación de la respuesta. Alternativamente, una hidátide no fértil podría corresponder a un parásito de mayor edad, pero sometido a una respuesta inmune que no logra controlar y por tanto pueden existir signos de daño de diferente entidad. Por lo tanto, la condición “no fértil” incluiría distintos estados de viabilidad de la hidátide, con mayor o menor actividad metabólica y no necesariamente diferenciables macroscópicamente.

La similitud en la actividad mostrada por el EgAgB_F y EgAgB_{NF} es un dato a tener en cuenta para pensar en qué componentes de la partícula lipoproteica (proteico y/o lipídico) son responsables de la actividad. El estado de fertilidad de la hidátide podría repercutir en la composición de la lipoproteína y su comparación podría arrojar información sobre qué componentes comunes explican la actividad. Si bien en este trabajo no se analizó la composición proteica y lipídica de EgAgB_F y EgAgB_{NF}, la similitud observada en los efectos funcionales hace pensar que no difieren en gran medida en el/los componente/s activo/s. Estudios anteriores mostraron que todas las subunidades proteicas (EgAgB8/1-5) están presentes en el EgAgB derivado de *pooles* fértiles y no fértiles, aunque con mayor abundancia de isoformas en el primero. De todas formas, la subunidad EgAgB8/1 fue el componente mayoritario del EgAgB derivado tanto de hidátides fértiles como no fértiles, en ambas superando el

90 % de la abundancia. Además, el estudio de los ligandos hidrofóbicos reveló similitudes en los lípidos polares constituyentes del EgAgB de hidátides fértiles y no fértiles, pero diferencias en los neutros. Existió también una menor abundancia relativa de los principales ácidos grasos y una mayor abundancia relativa de ácidos grasos con mayor grado de oxidación en el EgAgB de hidátides no fértiles (33). Es factible que la composición lipídica del EgAgB muestre mayores cambios que la proteica entre una hidátide no fértil y una fértil; menor viabilidad podría ligarse con procesos oxidativos aumentados y la generación de PE requiere probablemente mayor adquisición y transporte de lípidos esenciales para la construcción de los componentes estructurales del parásito.

Llamativamente, la HDL total analizada en paralelo al EgAgB no logró reducir los niveles de citoquinas o nitrito producidos en respuesta a la estimulación con LPS, en ninguno de los dos modelos celulares. Esto contrasta con lo reportado por Jee Song *et al.*, 2015 (71), Taborda *et al.*, 2019 (72), Nardo *et al.*, 2014 (73) y Han *et al.*, 2021 (74). En el primero, la HDL a 50 µg/mL generó una disminución significativa de los niveles de ARN mensajero de TNF-α e IL-6 inducidos por LPS (10 ng/mL) en macrófagos THP-1 respecto a aquellos estimulados en ausencia de la lipoproteína. En el segundo, también utilizando macrófagos THP-1 y LPS (50 pg/mL) como estímulo, la presencia de 300 µg/mL de HDL redujo los niveles de IL-6 en el sobrenadante de cultivo. En el tercero, la secreción de IL-6 y TNF por macrófagos BMDMs tratados por 6 horas con HDL a 2 mg/mL y estimulados con LPS (100 ng/mL), disminuyó significativamente respecto a los BMDMs sin tratar. En el artículo reciente de Han *et al.*, 2021, en el que se basó parte de este trabajo, observaron que la respuesta de IL-1β y TNFα por las células de Kupffer (macrófagos hepáticos) estimuladas con LPS (20 ng/mL) disminuía con la presencia de HDL₂ y aún más con HDL₃ (300 µg/mL). La discrepancia de los mencionados trabajos con el presente estudio podría ser explicada por diferencias en el diseño experimental, tal como se discute a continuación. Aquí y al igual que en Jee Song *et al.*, 2015 y Taborda *et al.*, 2019, se trabajó con macrófagos THP-1 ya que se trata de una línea sencilla de cultivar y es ampliamente utilizada para estudiar la funcionalidad de los macrófagos (30). De hecho, nuestro grupo cuenta con amplia experiencia en el trabajo con la misma. Como las líneas celulares pueden diferir de aquellas células que pretenden representar y pueden sufrir cambios permanentes en su fenotipo a través de transformaciones genéticas (79) se empleó como modelo adicional a las BMDM (cultivo primario de células de ratón), como en Nardo *et al.*, 2014. Su uso permitió cuantificar la producción de IL-12 y nitritos, que no fue posible determinar en macrófagos THP-1, brindando información adicional al estudio de los efectos moduladores. Por tanto, la diferencia con dichos trabajos no puede deberse al modelo celular empleado. En Han *et al.*, 2019 emplean a las células de Kupffer, o macrófagos del hígado, que según los estímulos recibidos pueden diferenciarse a M1 o M2 y responder a las infecciones, pero su umbral de activación es mayor que el de otros tipos de macrófagos dado su perfil tolerogénico (80). Esto puede ser una de las razones de la discrepancia. Por otro lado, la concentración de HDL empleada en todos los trabajos mencionados (50 a 2000 µg/mL) fue considerablemente superior a la ensayada aquí (10 µg/mL). La elección de 10 µg/mL pretendió hacerla comparable con la utilizada para el EgAgB, y siendo la concentración máxima de EgAgB nativo a utilizar por los efectos que podría provocar *per se* en los macrófagos debido al contenido de LPS; según datos previos de nuestro grupo utilizando preparaciones equivalentes de EgAgB nativo, a partir de 20 µg/mL se observa la producción de IL-1β e IL-6 *per se* (33). Además, se conocía que en las concentraciones que se utilizó el EgAgB (1-10 µg/mL) se observa un efecto inhibitorio de la respuesta al LPS en los macrófagos. Además de esta diferencia en la concentración de HDL utilizada, los investigadores estimulan a las células con distintas concentraciones de LPS, generalmente

mayores (20 - 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) que la aquí utilizada (10 ng/mL), excepto en Taborda *et al.*, 2019 que emplean el LPS a 50 pg/mL . En este sentido es posible que el uso de concentraciones mayores podría requerir la presencia de concentraciones también mayores de HDL para inhibir los efectos. Corresponde mencionar también que en el trabajo realizado por Han *et al.*, 2021, se agregó LBP (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) al medio de cultivo, mientras que en los presentes ensayos no. Consideramos que esta diferencia no explicaría la ausencia de actividad moduladora observada en la preparación de HDL utilizada en este trabajo ya que se conoce que hay entre 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tal proteína en el SFB utilizado para suplementar los medios (81) y este agregado no fue necesario en los otros trabajos. En suma, la literatura sobre la HDL y lo observado en los ensayos aquí presentados sugieren que el EgAgB y la HDL podrían compartir la actividad inmunomoduladora siendo el EgAgB mucho más eficiente porque se necesitan concentraciones más elevadas de HDL para observar su efecto inhibitorio. La ausencia de actividad moduladora en la preparación de HDL utilizada es probablemente consecuencia de la concentración a la que fue testeada y sería necesario realizar nuevos experimentos testeando mayores concentraciones de HDL, particularmente HDL₃. Corresponde mencionar que no se contó con HDL₃ al inicio de este trabajo, razón por la cual se trabajó principalmente con la HDL total.

Los experimentos de competencia de unión del LPS* a los macrófagos y de unión del LPS a las preparaciones inmovilizadas en placas de ELISA permitieron determinar en paralelo la capacidad del EgAgB y la HDL de interactuar con el LPS, de forma indirecta y directa, respectivamente. En los ensayos de competencia quedó en evidencia la interferencia del EgAgB y la HDL en la interacción del LPS con los macrófagos, en forma dependiente de la dosis. Además, ensayos previos mostraron que esta interferencia era más eficiente cuando el EgAgB se pre o co-incubaba con el LPS en relación con la post-incubación (33) lo que en conjunto sugiere que compite desde la fase soluble por la unión del LPS a sus receptores celulares. El experimento de la unión directa del LPS a HDL₃ o EgAgB, mostró resultados compatibles con la función neutralizadora, indicando también la relevancia del papel de la LBP. La optimización de este ensayo requirió de 3 experimentos en los que se aplicaron variaciones en las soluciones amortiguadoras y en los tiempos de incubación, por lo cual en resultados se muestra un gráfico derivado de un único experimento con duplicados analíticos, en las condiciones que se optimizaron. El ensayo optimizado (sección 3.6) se repetirá para que los datos puedan ser tratados a nivel estadístico confirmando las tendencias muy claras y compatibles con los resultados mostrados por Han *et al.*, 2021 (74). En conjunto, se reportó aquí por primera vez la capacidad del EgAgB de unir el LPS, lo cual apoya la hipótesis sobre su función neutralizadora compartida con las lipoproteínas plasmáticas. En este sentido, la presencia de trazas de LPS en EgAgB_F y EgAgB_{NF} (y preparaciones de EgAgB realizadas anteriormente por el grupo) es compatible con esta capacidad de interacción, que resiste las condiciones disociativas, el aumento de concentración salina y el descenso de pH aplicados durante la purificación. Sería posible utilizar el ensayo de unión optimizado para evaluar en qué medida estas condiciones disociativas afectan la unión.

Es pertinente resaltar que los efectos de la HDL en los experimentos de competencia/unión fueron siempre más modestos que los de EgAgB_F y EgAgB_{NF}, lo que sugiere que el EgAgB nativo tendría una mayor potencia para neutralizar el LPS en solución en comparación a la HDL. Estos resultados podrían explicar, al menos en parte, por qué en los ensayos de inmunomodulación el EgAgB logra disminuir la respuesta de mediadores inflamatorios inducidos por LPS y la HDL no lo hace, siendo

necesarias concentraciones mayores para lograr tal efecto. Para profundizar en la comparación de la capacidad de unir LPS entre la HDL (HDL₃) y el EgAgB se podrían realizar ensayos de competencia inmovilizando a la HDL (HDL₃) e incubando posteriormente con LPS-biotina y concentraciones crecientes de EgAgB (en ausencia y presencia de LBP) y/o inmovilizar el EgAgB nativo e inhibir la unión del LPS con la HDL. La concentración de EgAgB/HDL necesarias para lograr un 50 % de inhibición de la unión podrían describir mejor las diferencias en sus afinidades por el LPS.

Con respecto a las características de la unión EgAgB-LPS, cabe notar que se vio reforzada en presencia de la LBP, de forma análoga a lo que sucede con la HDL₃ (74). Tal como ocurre en la señalización del LPS por el TLR4 (Figura 1.4), la LBP podría contribuir a extraer monómeros de LPS de las micelas de manera de que éstos puedan interactuar con las lipoproteínas. Alternativamente la LBP podría unirse directamente a la lipoproteína (HDL o EgAgB) y este complejo interactuar con las micelas de LPS, resultando en la disociación y unión de monómeros de LPS al complejo LBP-lipoproteína. Esta idea encuentra sustento en un artículo que reporta que la LBP es transportada en las lipoproteínas y actúa como cofactor en la neutralización de LPS (82). Por otra parte, se determinó que la LBP se une a ApoA-I (83), apolipoproteína mayoritaria de la HDL. Como se mencionó anteriormente, aunque ApoA-I y las subunidades proteicas del EgAgB no son similares en secuencia, presentan características similares en cuanto al plegamiento que adquieren y sus propiedades de unión a lípidos (28). Ambas muestran una estructura secundaria con gran proporción de hélices alfa, y distribución espacial de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos en caras opuestas de las hélices. Si la distribución de cargas y de regiones hidrofóbicas juegan un papel en la interacción de la Apo-AI con la LBP, quizás sea posible que el EgAgB pueda unirse a la LBP directamente. Para comprobar que el EgAgB y la HDL₃ unen directamente LBP o LBP-LPS, son necesarios experimentos que establezcan directamente dicha unión. Con este fin podrían realizarse ensayos inmovilizando las lipoproteínas a la placa e incubando con LBP en presencia y ausencia de LPS para luego detectar a la LBP con un anticuerpo específico. Se ha descrito además que la interacción entre el LPS y la HDL es facilitada no sólo por la LBP sino por otras proteínas capaces de transferir lípidos (84,85), y el lípido A parece ser la región clave en esta interacción, aunque los mecanismos subyacentes a la asociación siguen sin esclarecerse completamente (86). Sería interesante profundizar en las interacciones implicadas en la unión del LPS al EgAgB, incluyendo el papel del lípido A, motivo principalmente asociado a su actividad endotoxina.

En este trabajo se utilizó LPS para el análisis de mecanismos de modulación de la inflamación por los antecedentes sobre activación y modulación del EgAgB y considerando que los DAMPs generados como consecuencia de la infección por la hidátide pueden ser reconocidos por el TLR4 (como por ejemplo hialuronano (87)). Corresponde mencionar que el LPS no sería el motivo molecular óptimo para analizar posibles efectos inmunomoduladores durante la EQ, considerando que no es un PAMP presente en platelmintos sino en bacterias gram-negativas. Sin embargo, este agonista es un protagonista importante en el hígado porque la vena porta recoge el drenaje venoso del intestino, transportando nutrientes, metabolitos y componentes de origen propio y de la microbiota hacia el hígado (32). Por tal motivo, este órgano cuenta con mecanismos de tolerancia frente a PAMPs provenientes del intestino (incluyendo al LPS (88)) que inhiben la activación y actividad pro-inflamatoria de sus células. Entonces se podría hipotetizar, dados los efectos inhibitorios del EgAgB sobre macrófagos estimulados con LPS, que, en un contexto fisiológico, el EgAgB podría llegar a

limitar efectos pro-inflamatorios mediados por el LPS en el hígado, órgano donde se establece con mayor frecuencia el parásito.

Los resultados obtenidos en esta tesis apoyan la idea de que la capacidad inmunomoduladora del EgAgB nativo observada en los experimentos con los macrófagos podría explicarse por el secuestro de este agonista, limitando la señalización por el TLR4 y la consecuente activación inflamatoria. Esta idea concuerda con observaciones realizadas en nuestro grupo por Sofía Lagos, que determinaron que el EgAgB inhibe la dimerización de este receptor en células dendríticas, impidiendo que se dispare la cascada de señalización que da lugar a la generación de mediadores solubles e inducción de la iNOS. Además, en Han *et al.*, 2021 describen que la producción intestinal de HDL₃, a diferencia de la HDL₂, secuestra el LPS de forma eficiente (74). Considerando el tamaño de las partículas, si el tamaño es un factor importante para el establecimiento de las interacciones entre estas lipoproteínas y el LPS, el EgAgB cumpliría con tal requisito ya que es más similar a la HDL₃ que a la HDL₂ ((52) y Figura 1.5). La neutralización por el EgAgB del LPS en el medio extracelular explicaría que en presencia del EgAgB resultara reducida la producción de IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- β y la producción de nitritos en los macrófagos estimulados con LPS. Las citoquinas IL-1 β e IL-6 son cruciales para la inducción de la producción de proteínas de la fase aguda de la respuesta y la inducción de fiebre a nivel fisiológico (10). IL-12 es crítica para el desarrollo de la respuesta Th1 (10), la cual se ha asociado a quistes inactivos (13). Por tanto, esta neutralización lógicamente limitaría los efectos inflamatorios locales y sistémicos, a la vez que inhibiría mecanismos que disparan la respuesta adaptativa. En experimentos *in vivo* comentados anteriormente (33), el EgAgB además de reducir la respuesta al LPS en cavidad peritoneal, potenció modestamente el nivel de IL-10, característica de la respuesta Th2-modificada, sin embargo, en los estudios de estimulación *in vitro* no fue posible detectar la IL-10 sugiriendo diferencias en los mecanismos que dirigen su expresión. Sería relevante estudiar si esta actividad de inmunomodulación se reproduce al inducir respuestas con otros agonistas distintos al LPS, particularmente con agonistas del TLR4 que quizás compartan motivos estructurales con el LPS. Además, sería interesante verificar el potencial del EgAgB para controlar la inflamación en modelos de sepsis asociados al LPS.

El hecho de que el EgAgB mostró más actividad inmunomoduladora que la HDL podría también ser consecuencia de su capacidad para interactuar con blancos diferenciales en los macrófagos, no utilizados por la HDL, que induzcan señales de apagado de la respuesta. Nuestro grupo reportó la capacidad de unión del EgAgB a monocitos y macrófagos, de manera dosis-dependiente. De acuerdo con ensayos de unión, esta interacción podría ser mediada por el EgAgB8/1 (componente proteico mayoritario de en la lipoproteína nativa), el EgAgB8/3 (aunque se encuentra poco representado en la partícula) y la fosfatidilcolina expuesta en la partícula proveería el entorno adecuado (28). Sería posible que estas subunidades del EgAgB reconozcan blancos diferentes a la HDL ya que esta última inhibió parcialmente la unión del EgAgB a los macrófagos y sólo cuando se usó en concentraciones mayores que el EgAgB (28) Alternativamente podría plantearse que ambas lipoproteínas usen un mismo receptor, pero la afinidad o el tipo de interacciones disparen señales distintas en la célula. Existe la posibilidad de que el EgAgB y la HDL compartan receptores involucrados en el eflujo del colesterol. La HDL controla el nivel de colesterol en los tejidos periféricos (59) mediado por los transportadores de membrana SR-B1, ABCA1 y ABCG1 (62,89–91), principalmente, los cuales se han asociado a efectos anti-inflamatorios/inmunomoduladores. De hecho, se conoce que las vías de señalización asociadas al metabolismo e inflamación se interceptan (92). La toma de colesterol altera

el nivel de colesterol en las balsas lipídicas en macrófagos y células dendríticas, interfiriendo con la activación por TLRs y la capacidad presentadora de antígeno (90,93–95). Sería posible que la toma de colesterol por el EgAgB imprima simultáneamente señales antiinflamatorias/inmunomoduladoras en células innatas, a través de interacciones con receptores asociados al eflujo de colesterol. Estas interacciones podrían explicar los efectos inhibitorios del EgAgB sobre la activación inmune que no pueden ser explicados por la neutralización del LPS únicamente.

Aún quedan numerosas incógnitas sobre el EgAgB y su función en la biología de *E. granulosus*. Las propiedades descritas por nuestro y otros grupos provienen de la lipoproteína derivada del LH, pero el EgAgB se expresa en otras estructuras de la hidátide y en otros estadios del parasito, por lo cual podría ejercer funciones en distintas etapas del ciclo de vida de este cestodo. No conocemos cómo alcanza la interfaz con el hospedero, pero el desarrollo de una respuesta de anticuerpos específica contra el EgAgB en el hospedero indica que en algún punto esto sucede. Su papel como transportador lipídico es aún más desconocido; para cumplir esta función el EgAgB debería tomar contacto con componentes del hospedero que suministren los lípidos esenciales (tráfico de ida), como células o lipoproteínas, para luego retornar a las estructuras parasitarias a realizar su entrega (tráfico de vuelta). Suponemos que el tráfico de ida podría involucrar la transcitosis del EgAgB, tal como ocurre para la HDL a través del receptor SR-B1 en células endoteliales (96) y/o el transporte vía exosomas, dado que el EgAgB se detectó en vesículas extracelulares en el LH (97). El tráfico de vuelta podría implicar que el EgAgB cediera los lípidos al tegumento de la capa germinativa por un mecanismo independiente (98) o dependiente de transportadores, aunque aún no identificados. Eventualmente el EgAgB podría transferir los lípidos a las lipoproteínas plasmáticas que sí se conoce alcanzan el interior de la hidátide ya que las apolipoproteínas plasmáticas principales han sido identificadas en el LH (99).

En síntesis, se logró alcanzar los objetivos de esta tesina, obteniendo preparaciones nativas de EgAgB a partir de LH que fueron útiles a los efectos de analizar sus propiedades inmunomoduladoras y su capacidad de unión al LPS en comparación con la HDL. De la comparación de las propiedades de estas lipoproteínas se observó que: a) el EgAgB es capaz de reducir la respuesta de citoquinas inducida por el LPS en macrófagos en forma dosis dependiente, a concentraciones entre 1 y 10 µg/mL, mientras que la HDL no, y b) ambas lipoproteínas logran inhibir la unión del LPS a los macrófagos y muestran capacidad para unir el LPS *in vitro*, mostrando el EgAgB mayor actividad específica. Estas observaciones sugieren que el EgAgB podría ejercer actividades moduladoras de la inflamación actuando como una proteína barrendera que neutralice el LPS y quizás otros agonistas de TLR4. Finalmente, esta investigación ha generado nuevas incógnitas en cuanto a las diferencias en la capacidad inmunomoduladora y neutralizadora del LPS de la HDL y del EgAgB y cómo es la unión del LPS-LBP-lipoproteína que demandan estudios adicionales.

Bibliografía

1. Thompson RCA. Biology and Systematics of *Echinococcus*. *Adv Parasitol*. 2017;95:65–109.
2. Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: a road map for neglected tropical diseases 2021-2030. In Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2021. p. 102–5. Available from: <http://www.wipo.int/amc/en/mediation/rules/>
3. Vigilato M, Zanette L, Molina Flores B, Rocha F, Larrieu E. Informe Epidemiológico en la Región de América del Sur 2019-2021. 2022 Oct.
4. Romig T, Ebi D, Wassermann M. Taxonomy and molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus* sensu lato. *Vet Parasitol*. 2015 Oct 30;213(3–4):76–84.
5. Zhang W, Wen H, Li J, Lin R, McManus DP. Immunology and immunodiagnosis of cystic echinococcosis: An update. Vol. 2012, *Clinical and Developmental Immunology*. 2012.
6. Motran CC, Silvano L, Chiapello LS, Theumer MG, Ambrosio LF, Volpini X, et al. Helminth infections: Recognition and modulation of the immune response by innate immune cells. Vol. 9, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2018.
7. Keegan AD, Leonard WJ, Zhu J. Recent advances in understanding the role of IL-4 signaling. *Fac Rev*. 2021 Aug 25;10.
8. Doyle AG, Herbein G, Montaner LJ, Minty AJ, Caput D, Ferrara P, et al. Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: Comparison with interleukin-4 and interferon- γ . *Eur J Immunol*. 1994 Jun;24(6):1441–5.
9. 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*. 1992 Jul 1;176(1):287–92.
10. Murphy K (Kenneth M), Weaver C, Janeway C. *Janeway's immunobiology*. 9th ed. Toledo M, Boicchio A, Acevedo-Quiñones C, Zayetz E, Divakaran D, editors. 2017.
11. Lighaam L, Rispens T. The Immunobiology of Immunoglobulin G4. *Semin Liver Dis*. 2016 Jul 28;36(03):200–15.
12. Díaz A, Allen JE. Mapping immune response profiles: The emerging scenario from helminth immunology. Vol. 37, *European Journal of Immunology*. 2007. p. 3319–26.
13. Siracusano A, Delunardo F, Teggi A, Ortona E. Cystic Echinococcosis: Aspects of Immune Response, Immunopathogenesis and Immune Evasion from the Human Host. Vol. 12, *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*. 2012.
14. Riffkin M, Seow HF, Jackson D, Brown L, Wood P. Defence against the immune barrage: Helminth survival strategies. *Immunol Cell Biol*. 1996 Dec;74(6):564–74.
15. Ortona E, Margutti P, Delunardo F, Nobili V, Profumo E, Riganò R, 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*. 2005 Sep 11;142(3):528–38.
16. Gottstein B, Soboslay P, Ortona E, Wang J, Siracusano A, Vuitton DA. Immunology of Alveolar and Cystic Echinococcosis (AE and CE). In 2017. p. 1–54.

17. Andrade MA, Siles-Lucas M, Espinoza E, Arellano JLP, Gottstein B, Muro A. *Echinococcus multilocularis* laminated-layer components and the E14t 14-3-3 recombinant protein decrease NO production by activated rat macrophages in vitro. *Nitric Oxide*. 2004 May;10(3):150–5.
18. Li J, Zhang WB, Loukas A, Lin RY, Ito A, Zhang LH, et al. Functional expression and characterization of *Echinococcus granulosus* thioredoxin peroxidase suggests a role in protection against oxidative damage. *Gene*. 2004 Feb;326:157–65.
19. Dzik JM. Molecules released by helminth parasites involved in host colonization. *Acta Biochim Pol*. 2006;53(1):33–64.
20. Seoane PI, Ruckerl D, Casaravilla C, Barrios AA, Pittini Á, MacDonald AS, et al. Particles from the *Echinococcus granulosus* laminated layer inhibit IL-4 and growth factor-driven Akt phosphorylation and proliferative responses in macrophages. *Sci Rep*. 2016 Dec 14;6.
21. Pittini Á, Martínez-Acosta YE, Casaravilla C, Seoane PI, Ruckerl D, Quijano C, et al. Particles from the *Echinococcus granulosus* Laminated Layer Inhibit CD40 Upregulation in Dendritic Cells by Interfering with Akt Activation. *Infect Immun*. 2019 Dec;87(12).
22. Dey A, Allen J, Hankey-Giblin PA. Ontogeny and Polarization of Macrophages in Inflammation: Blood Monocytes Versus Tissue Macrophages. *Front Immunol*. 2015 Jan 22;5.
23. Panaro MA, Brandonisio O, Acquafredda A, Sisto M, Mitolo V. Evidences for iNOS Expression and Nitric Oxide Production in the Human Macrophages. Vol. 3, *Endocrine & Metabolic Disorders*. 2003.
24. Rutschman R, Lang R, Hesse M, Ihle JN, Wynn TA, Murray PJ. Cutting Edge: Stat6-Dependent Substrate Depletion Regulates Nitric Oxide Production. *The Journal of Immunology*. 2001 Feb 15;166(4):2173–7.
25. Caroff M, Novikov A. LPS Structure, Function, and Heterogeneity. In: *Endotoxin Detection and Control in Pharma, Limulus, and Mammalian Systems*. Springer International Publishing; 2019. p. 53–93.
26. Zweigner J, Schumann RR, Weber JR. The role of lipopolysaccharide-binding protein in modulating the innate immune response. Vol. 8, *Microbes and Infection*. 2006. p. 946–52.
27. Bode JG, Ehling C, Häussinger D. The macrophage response towards LPS and its control through the p38 MAPK-STAT3 axis. Vol. 24, *Cellular Signalling*. 2012. p. 1185–94.
28. Silva-Álvarez V, Folle AM, Ramos AL, Kitano ES, Iwai LK, Corraliza I, et al. *Echinococcus granulosus* Antigen B binds to monocytes and macrophages modulating cell response to inflammation. *Parasit Vectors*. 2016 Feb 4;9(1).
29. Rossol M, Heine H, Meusch U, Quandt D, Klein C, Sweet MJ, et al. LPS-Induced Cytokine Production in Human Monocytes and Macrophages. Vol. 31, *Critical Reviews™ in Immunology*. 2011.
30. Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol*. 2014 Nov;23(1):37–45.
31. Bailey JD, Shaw A, McNeill E, Nicol T, Diotallevi M, Chuaiphichai S, et al. Isolation and culture of murine bone marrow-derived macrophages for nitric oxide and redox biology. *Nitric Oxide*. 2020 Aug;100–101:17–29.
32. Albillos A, de Gottardi A, Rescigno M. The gut-liver axis in liver disease: Pathophysiological basis for therapy. *J Hepatol*. 2020 Mar;72(3):558–77.
33. Folle López AM. El antígeno B de *Echinococcus granulosus* en el transporte de lípidos y mensajes inmunomoduladores en la interfaz hospedero-parásito [Tesis de Doctorado]. [Montevideo]: Udelar. FC - PEDECIBA; 2022.

34. Oriol C, Oriol R. Physicochemical Properties of a Lipoprotein Antigen of *Echinococcus Granulosus*. *Am J Trop Med Hyg.* 1975 Jan 1;24(1):96–100.
35. Aziz A, Zhang W, Li J, Loukas A, McManus DP, Mulvenna J. Proteomic characterisation of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid from sheep, cattle and humans. *J Proteomics.* 2011 Aug;74(9):1560–72.
36. González-Sapienza G, Cachau RE. Identification of Critical Residues of an Immunodominant Region of *Echinococcus granulosus* Antigen B. *Journal of Biological Chemistry.* 2003 May;278(22):20179–84.
37. Barbieri M, Fernández V, González G, Luaces VM, 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.* 1998 Feb;20(2):51–61.
38. Leggatt GR, McManus DP. Identification and diagnostic value of a major antibody epitope on the 12 kDa antigen from *Echinococcus granulosus* (hydatid disease) cyst fluid. *Parasite Immunol.* 2007 Oct 9;16(2):87–96.
39. 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.* 2000 Nov;38(11):3979–83.
40. Lorenzo C, Ferreira HB, Monteiro KM, Rosenzvit M, Kamenetzky L, García HH, 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.* 2005 Jun;43(6):2764–70.
41. Saghir N, Conde PJ, Brophy PM, Barrett J. A new diagnostic tool for neurocysticercosis is a member of a cestode specific hydrophobic ligand binding protein family ¹. *FEBS Lett.* 2000 Dec 29;487(2):181–4.
42. Chemale G, Ferreira HB, Barrett J, Brophy PM, Zaha A. *Echinococcus granulosus* antigen B hydrophobic ligand binding properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics.* 2005 Mar;1747(2):189–94.
43. Chemale G, Haag KL, Ferreira HB, Zaha A. *Echinococcus granulosus* antigen B is encoded by a gene family. *Mol Biochem Parasitol.* 2001 Sep;116(2):233–7.
44. Alvite G, Esteves A. Lipid binding proteins from parasitic platyhelminthes. *Front Physiol.* 2012;3.
45. Arend AC, Zaha A, Ayala FJ, Haag KL. The *Echinococcus granulosus* antigen B shows a high degree of genetic variability. *Exp Parasitol.* 2004 Sep;108(1–2):76–80.
46. Zhang W, Li J, Jones MK, Zhang Z, Zhao L, Blair D, 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.* 2010 Aug;4(8).
47. Zheng H, Zhang W, Zhang L, Zhang Z, Li J, Lu G, et al. The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. *Nat Genet.* 2013 Oct 8;45(10):1168–75.
48. Lightowlers MW, Liu D, Haralambous A, Rickard MD. Subunit composition and specificity of the major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus*. *Mol Biochem Parasitol.* 1989 Dec;37(2):171–82.
49. Monteiro KM, Scapin SMN, Navarro MVAS, Zanchin NIT, Cardoso MB, da Silveira NP, et al. Self-assembly and structural characterization of *Echinococcus granulosus* antigen B recombinant subunit oligomers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics.* 2007 Feb;1774(2):278–85.

50. Oriol C, Oriol R. Physicochemical Properties of a Lipoprotein Antigen of *Echinococcus granulosus*. *Am J Trop Med Hyg.* 1975 Jan 1;24(1):96–100.
51. Silva-Álvarez V, Folle AM, Ramos AL, Zamarreño F, Costabel MD, García-Zepeda E, et al. *Echinococcus granulosus* antigen B: A Hydrophobic Ligand Binding Protein at the host-parasite interface. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2014 Feb 1;93:17–23.
52. Obal G, Ramos AL, Silva V, Lima A, Batthyany C, Bessio MI, et al. Characterisation of the native lipid moiety of *Echinococcus granulosus* antigen B. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012 May;6(5).
53. González G, Nieto A, Fernández C, O'rn A, Wernstedt C, Hellman U. Two different 8 kDa monomers are involved in the oligomeric organization of the native *Echinococcus granulosus* antigen B. *Parasite Immunol.* 1996 Dec 31;18(12):587–96.
54. Oriol R, Williams JF, Pérez Esandi M V. Evaluation of Purified Lipoprotein Antigens of *Echinococcus Granulosus* in the Immunodiagnosis of Human Infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1971 Jul 1;20(4):575–9.
55. Tsai IJ, Zarowiecki M, Holroyd N, Garciarrubio A, Sanchez-Flores A, Brooks KL, et al. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature.* 2013 Apr 13;496(7443):57–63.
56. Tielens AGM, Hellemond IJ, A. Tielens. Unusual Aspects of Metabolism in Flatworm Parasites. In: Aaron G. Maule and Nikki J. Marks., editor. *Parasitic Flatworms Molecular Biology, Biochemistry, Immunology and Physiology.* 2006. p. 387–407.
57. Silva-Álvarez V, Franchini GR, Pórfido JL, Kennedy MW, Ferreira AM, Córscico B. Lipid-Free Antigen B Subunits from *Echinococcus granulosus*: Oligomerization, Ligand Binding, and Membrane Interaction Properties. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015 Mar 13;9(3):e0003552.
58. da Silva ED, Cancela M, Monteiro KM, Ferreira HB, Zaha A. Antigen B from *Echinococcus granulosus* enters mammalian cells by endocytic pathways. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018 May 4;12(5):e0006473.
59. Ouimet M, Barrett TJ, Fisher EA. HDL and reverse cholesterol transport: Basic mechanisms and their roles in vascular health and disease. *Circ Res.* 2019 May 10;124(10):1505–18.
60. Röhrl C, Stangl H. HDL endocytosis and resecretion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids.* 2013 Nov;1831(11):1626–33.
61. Takahashi Y, Smith JD. Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1999 Sep 28;96(20):11358–63.
62. Pagler TA, Rhode S, Neuhofer A, Laggner H, Strobl W, Hinterndorfer C, et al. SR-BI-mediated High Density Lipoprotein (HDL) Endocytosis Leads to HDL Resecretion Facilitating Cholesterol Efflux. *Journal of Biological Chemistry.* 2006 Apr;281(16):11193–204.
63. Shepherd J, Aitken A, McManus D. A protein secreted in vivo by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. *Mol Biochem Parasitol.* 1991 Jan;44(1):81–90.
64. Riganò R, Profumo E, Bruschi F, Carulli G, Azzarà A, Ioppolo S, et al. Modulation of Human Immune Response by *Echinococcus granulosus* Antigen B and Its Possible Role in Evading Host Defenses. *Infect Immun.* 2001 Jan;69(1):288–96.
65. Riganò R, Buttari B, Profumo E, Ortona E, Delunardo F, Margutti P, et al. *Echinococcus granulosus* Antigen B Impairs Human Dendritic Cell Differentiation and Polarizes Immature Dendritic Cell Maturation towards a Th2 Cell Response. *Infect Immun.* 2007 Apr;75(4):1667–78.

66. Bao J, Qi W, Sun C, Tian M, Jiao H, Guo G, et al. *Echinococcus granulosus* sensu stricto and antigen B may decrease inflammatory bowel disease through regulation of M1/2 polarization. *Parasit Vectors*. 2022 Dec 1;15(1).
67. Bailey A, Mohiuddin SS. *Biochemistry, High Density Lipoprotein*. 2023.
68. Von Eckardstein A, Kardassis D. *High Density Lipoproteins From Biological Understanding to Clinical Exploitation* [Internet]. 2015. Available from: <http://www.springer.com/series/164>
69. Ridgway N, McLeod R. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. Elsevier; 2008.
70. Norata GD, Pirillo A, Ammirati E, Catapano AL. Emerging role of high density lipoproteins as a player in the immune system. *Atherosclerosis* [Internet]. 2012;220(1):11–21.
71. Jee Song G, Kim SM, Park KH, Kim J, Choi I, Cho KH. SR-BI mediates high density lipoprotein (HDL)-induced anti-inflammatory effect in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Jan 30;457(1):112–8.
72. Tabora NA, Blanquiceth Y, Urcuqui-Inchima S, Latz E, Hernandez JC. High-Density Lipoproteins Decrease Proinflammatory Activity and Modulate the Innate Immune Response. Vol. 39, *Journal of Interferon and Cytokine Research*. Mary Ann Liebert Inc.; 2019. p. 760–70.
73. De Nardo D, Labzin LI, Kono H, Seki R, Schmidt S V., Beyer M, et al. High-density lipoprotein mediates anti-inflammatory reprogramming of macrophages via the transcriptional regulator ATF3. *Nat Immunol*. 2014 Feb;15(2):152–60.
74. Han YH, Onufer EJ, Huang LH, Sprung RW, Davidson WS, Czepielewski RS, et al. Enterically derived high-density lipoprotein restrains liver injury through the portal vein. *Science* (1979). 2021 Jul 23;373(6553).
75. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug;227(5259):680–5.
76. Juyi L, Yan J, Xiufang W, Zhaoqing Z, Junliang L, Mingxing Z, et al. Analysis of the chemical components of hydatid fluid from *Echinococcus granulosus*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013 Oct 21;46(5):605–10.
77. Nishi K, Yamasaki K, Otagiri M. Serum Albumin, Lipid and Drug Binding. In 2020. p. 383–97.
78. van Bergenhenegouwen J, Kraneveld AD, Rutten L, Garssen J, Vos AP, Hartog A. Lipoproteins attenuate TLR2 and TLR4 activation by bacteria and bacterial ligands with differences in affinity and kinetics. *BMC Immunol*. 2016 Dec 28;17(1):42.
79. Thermo Fisher Scientific Inc., editor. *Cell culture basic handbook*. 2020.
80. Nguyen-Lefebvre AT, Horuzsko A. Kupffer Cell Metabolism and Function. *J Enzymol Metab*. 2015;1(1).
81. Tobias PS, Mathison J, Mintz D, Lee JD, Kravchenko V, Kato K, et al. Participation of Lipopolysaccharide-binding Protein in Lipopolysaccharide-dependent Macrophage Activation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1992 Sep;7(3):239–45.
82. Wurfel MM, Kunitake ST, Lichenstein H, Kane JP, Wright SD. Lipopolysaccharide (LPS)-binding Protein Is Carried on Lipoproteins and Acts as a Cofactor in the Neutralization of LPS [Internet]. 1994. Available from: <http://rupress.org/jem/article-pdf/180/3/1025/1676109/1025.pdf>
83. Vreugdenhil ACE, Snoek AMP, Van 'T Veer C, Greve JWM, Buurman WA. LPS-binding protein circulates in association with apoB-containing lipoproteins and enhances endotoxin-LDL/VLDL interaction. *Journal of Clinical Investigation*. 2001;107(2):225–34.
84. Kirschning CJ, Au-Young J, Lamping N, Reuter D, Pfeil D, Seilhamer JJ, 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*. 1997 Dec;46(3):416–25.
85. Vesey CJ, Kitchens RL, Wolfbauer G, Albers JJ, Munford RS. Lipopolysaccharide-Binding Protein and Phospholipid Transfer Protein Release Lipopolysaccharides from Gram-Negative Bacterial Membranes. *Infect Immun*. 2000 May;68(5):2410–7.
 86. Brandenburg K, Jürgens G, Andrä J, Lindner B, Koch MHJ, Blume A, et al. Biophysical characterization of the interaction of high-density lipoprotein (HDL) with endotoxins. *Eur J Biochem*. 2002 Dec 2;269(23):5972–81.
 87. Taylor KR, Yamasaki K, Radek KA, Nardo A Di, Goodarzi H, Golenbock D, et al. Recognition of Hyaluronan Released in Sterile Injury Involves a Unique Receptor Complex Dependent on Toll-like Receptor 4, CD44, and MD-2. *Journal of Biological Chemistry*. 2007 Jun;282(25):18265–75.
 88. Grunfeld C, Marshall M, Shigenaga JK, Moser AH, Tobias P, Feingold KR. Lipoproteins inhibit macrophage activation by lipoteichoic acid. *J Lipid Res*. 1999 Feb;40(2):245–52.
 89. Zannis VI, Chroni A, Krieger M. Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J Mol Med*. 2006 Apr 25;84(4):276–94.
 90. Murphy AJ, Woollard KJ, Hoang A, Mukhamedova N, Stirzaker RA, McCormick SPA, et al. High-Density Lipoprotein Reduces the Human Monocyte Inflammatory Response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Nov;28(11):2071–7.
 91. Cai L, Wang Z, Meyer JM, Ji A, van der Westhuyzen DR. Macrophage SR-BI regulates LPS-induced pro-inflammatory signaling in mice and isolated macrophages. *J Lipid Res*. 2012 Aug;53(8):1472–81.
 92. Odegaard JI, Chawla A. The Immune System as a Sensor of the Metabolic State. *Immunity*. 2013 Apr;38(4):644–54.
 93. Zhu X, Owen JS, Wilson MD, Li H, Griffiths GL, Thomas MJ, et al. Macrophage ABCA1 reduces MyD88-dependent Toll-like receptor trafficking to lipid rafts by reduction of lipid raft cholesterol. *J Lipid Res*. 2010 Nov;51(11):3196–206.
 94. Wang S hui, Yuan S guang, Peng D quan, Zhao S ping. HDL and ApoA-I inhibit antigen presentation-mediated T cell activation by disrupting lipid rafts in antigen presenting cells. *Atherosclerosis*. 2012 Nov;225(1):105–14.
 95. Chowdhury SM, Zhu X, Aloor JJ, Azzam KM, Gabor KA, Ge W, et al. Proteomic Analysis of ABCA1-Null Macrophages Reveals a Role for Stomatin-Like Protein-2 in Raft Composition and Toll-Like Receptor Signaling. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2015 Jul;14(7):1859–70.
 96. Terpstra V, van Amersfoort ES, van Velzen AG, Kuiper J, van Berkel TJC. Hepatic and Extrahepatic Scavenger Receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Aug;20(8):1860–72.
 97. Agudelo Higuera NI, Brunetti E, McCloskey C. Cystic Echinococcosis. *J Clin Microbiol*. 2016 Mar;54(3):518–23.
 98. Cháves-González LE, Morales-Calvo F, Mora J, Solano-Barquero A, Verocai GG, Rojas A. What lies behind the curtain: Cryptic diversity in helminth parasites of human and veterinary importance. *Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases*. 2022;2:100094.
 99. Folle AM, Kitano ES, Lima A, Gil M, Cucher M, Mourglia-Ettlin G, et al. Characterisation of Antigen B Protein Species Present in the Hydatid Cyst Fluid of *Echinococcus canadensis* G7 Genotype. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Jan 3;11(1).