



Programa de Posgrado en Biotecnología
Facultad de Ciencias
Universidad de la República

**“Diseño y evaluación de péptidos sintéticos
derivados de receptores *scavenger* como
potenciales agentes antiparasitarios”**

Tesis de Maestría
Presentada como requisito para optar al título de
Magíster en Biotecnología

B.C. María Clara González Porcile

Director Académico y Director de Tesis:
Dr. Gustavo Mourglia-Ettlin

Tribunal Evaluador:
Dra. María Moreno, Dra. Beatriz Munguía y Dr. Álvaro Pittini

Montevideo, noviembre de 2024

RESUMEN

Los agentes terapéuticos basados en péptidos sintéticos presentan grandes ventajas respecto a otros biofármacos, ya que la identificación de péptidos pequeños capaces de generar los mismos efectos biológicos que las formas recombinantes de proteínas completas, abriría una amplia variedad de intervenciones terapéuticas dadas las ventajas tecnológicas existentes para su producción. Una estrategia poco explorada hasta el momento para el diseño de péptidos sintéticos con acciones antimicrobianas e inmunomoduladoras, consiste en identificar dentro de la secuencia aminoacídica de inmunoreceptores capaces de reconocer estructuras de patógenos, pequeñas secuencias peptídicas que retengan la capacidad de reconocimiento de la proteína de origen. La superfamilia de receptores *scavenger* (RS) ricos en cisteína (SF-SRCR) constituye un grupo interesante de inmunoreceptores para este fin, ya que contiene varios miembros capaces de reconocer ligandos microbianos. A su vez, las propiedades de unión a componentes bacterianos por parte de SALSA, el RS prototípico de la SF-SRCR, han sido mapeadas dentro de sus dominios SRCR; limitándose a una secuencia consenso de 11 aminoácidos denominada *pbs1*. Por otro lado, nuestro grupo reportó que CD5 y CD6, miembros de la SF-SRCR, son capaces de reconocer antígenos tegumentarios de *E. granulosus* s.l., el parásito cestodo causante de la equinococosis quística (EQ), y que la administración exógena de sus formas recombinantes solubles, induce profilaxis en el modelo murino de EQ secundaria. Por ello, en la presente tesis se realizó un análisis sistematizado de las secuencias homólogas a *pbs1* presentes en todos los miembros de la SF-SRCR capaces de reconocer componentes microbianos: MARCO, SR-AI, CD163, CD5L, CD5, CD6, SALSA, SCARA5 y SSc5D. Una vez identificadas, se sintetizaron los péptidos correspondientes y se evaluó su biocompatibilidad con sistemas mamíferos, así como su capacidad de reconocimiento de componentes tegumentarios de *E. granulosus* s.l., su actividad antiparasitaria intrínseca, su acción inmunomoduladora, y su potencial valor (inmuno)profiláctico. Así, se obtuvieron 39 estructuras peptídicas biocompatibles, algunas de las cuales mostraron actividad protoscolicida intrínseca, así como acciones inmunomoduladoras; sugiriendo su utilidad futura para el diseño de posibles agentes inmunoterapéuticos frente a la EQ secundaria. Finalmente, los datos generados mediante la ejecución de la presente tesis serán de utilidad para la búsqueda y optimización de péptidos sintéticos con diversas aplicaciones (inmuno)tecnológicas.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AC (actividad citotóxica)
- ADAM (del inglés, *A Disintegrin And Metalloproteinase*)
- AGE (productos finales de glicación avanzada, del inglés *Advanced Glycation Endproducts*)
- AgB (antígeno B)
- AH (ctividad hemolítica)
- AIM (del inglés, *Apoptosis Inhibitor of Macrophages*; también llamado Api6)
- BSA (Albúmina Sérica Bovina)
- CD (Grupo de Diferenciación, del inglés, *Cluster of Differentiation*)
- CD5L (ligando de CD5, anteriormente llamado Sp α)
- C.H.E.A. (Comisión Honoraria de Experimentación Animal)
- CLEC (subfamilia de receptores lectina de tipo C presentes en células NK)
- CLEVER (del inglés, *Common Lymphatic Endothelial and Vascular Endothelial Receptor*)
- DI.LA.VE. (Dirección de Laboratorios Veterinarios “Dr. Miguel Rubino”)
- DMBT1 (del inglés, *Deleted in Malignant Brain Tumors 1*, actualmente conocido como SALSA)
- DMSO (dimetilsulfóxido)
- DNP (2,4-dinitrofenol)
- EQ (equinococosis quística)
- ECP (proteína catiónica del eosinófilo, del inglés, *Eosinophil Cationic Protein*)
- EGF (factor de crecimiento epidérmico, del inglés, *Epidermal Growth Factor*)
- ETD (Enfermedades Tropicales Desatendidas)
- FBS (suero fetal bovino, del inglés, *Fetal Bovine Serum*)
- FITC (isotiocianato de fluoresceína)
- Gp (plicoproteína)
- GMP (del inglés, *Good Manufacturing Practices*)
- HARE (del inglés, *Hyaluronic Acid Receptor for Endocytosis*)
- HCV (Virus de la Hepatitis C)

VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana)

Ig (inmunoglobulina)

IL (interleuquina)

HMGB (del inglés, *High Mobility Group Box*)

IFN (interferón)

LAMP (proteínas de membrana asociadas a lisosomas)

LDL (del inglés, *Low-Density Lipoprotein*)

LDLR (del inglés, *Low-Density Lipoprotein Receptor*)

LPS (lipopolisacárido)

LRP (del inglés, *LDL receptor-related protein*)

LTA (ácido lipoteicoico)

MARCO (receptor de macrófagos con estructura colágena)

MEGA-10 (decanoil-N-metilglucamida)

MGAP (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca)

MHC (Complejo Mayor de Histocompatibilidad)

MTT (bromuro de 3(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico)

MW (masa molecular)

OMS (Organización Mundial de la Salud)

pAc (anticuerpos polireactivos)

PAMP (patrón molecular asociado a patógenos)

PBMC (células mononucleares de sangre periférica)

PBS (buffer fosfato salino)

pbs1 (del inglés, *pathogen binding site 1*)

PEC (células peritoneales)

PET (tomografía por emisión de positrones)

pI (punto isoelectrico)

PGN (Peptidoglicano)

PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo)

PSC (protoscoleces)

PSEx (extracto tegumentario de PSC de *E. granulosus* s.l., del inglés, *Protoscolex Surface Extract*)

RAGE (receptor para productos finales de glicación avanzada)

ROS (especies reactivas del oxígeno)

RS (receptor *scavenger*)

RS-A (receptores *scavenger* de Clase A)

RS-B (receptores *scavenger* de Clase B)

RS-C (receptores *scavenger* de Clase C)

RS-D (receptores *scavenger* de Clase D)

RS-E (receptores *scavenger* de Clase E)

RS-F (receptores *scavenger* de Clase F)

RS-G (receptores *scavenger* de Clase G)

RS-H (receptores *scavenger* de Clase H)

RS-I (receptores *scavenger* de Clase I)

RS-K (receptores *scavenger* de Clase K)

RS-L (receptores *scavenger* de Clase L)

rshCD5/rshCD6 (formas recombinantes solubles de los ectodominios de CD5 y CD6, respectivamente)

sAc (anticuerpos específicos)

SAG (del inglés, *Salivary AGglutinin*)

SALSA (del inglés, *SALivary Streptococcal Agglutinin*)

SDS (dodecil-sulfato de sodio)

SCARA-1 (receptor *scavenger* A1, nomenclatura inicial)

SCARF (receptor *scavenger* de Clase F, nomenclatura inicial)

SF-SRCR (superfamilia de receptores *scavenger* ricos en cisteínas)

SPE (antígenos somáticos de PSC de *E. granulosus* s.l.)

SPECT (tomografía por emisión de fotón único)

SRCR (dominio proteico de receptor *scavenger* rico en cisteína)

TNF (factor de necrosis tumoral)

VLDLR (del inglés, *Very Low-Density Lipoprotein Receptor*)

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco al Dr. Gustavo Mourglia Ettlin por haberme dado esta oportunidad y por todos estos años compartidos. Gracias Gus por haber acompañado no solo mi camino académico, sino también por acompañar con las palabras justas mis decisiones e intereses, aun cuando estos no beneficiaran a los tuyos. Y gracias por dejar la puerta abierta, porque no sabemos cómo, pero los dos sabemos que esto sigue...

Gracias a Javi, mi amigo de la FQ, por haberme traído al mundo académico, por ayudarme en la mesada, por tantos mates compartidos, pero principalmente por haber aguantado esta cabecita durante todos estos años, sabiendo el mérito que eso representa.

Gracias a Ana Clara, por haberse involucrado en este proyecto como si fuera propio, al punto de haber “bautizado” los péptidos como se anotan en este manuscrito. Gracias Ana por tantas madrugadas, fines de semanas y siestas en el party, empujando juntas para que esto saliera, me hiciste el camino mucho más ameno.

Gracias a los integrantes de la casita de adelante: Boti, Ceci S, Pau, y Vero por su apoyo y colaboración durante todo este tiempo; y especialmente a Clau, por haberme “adoptado” cuando Gus estuvo de sabático. Le agradezco también al resto de los integrantes de la Cátedra de Inmunología; en especial a Ceci Casaravilla, Leti y Anabella, quienes también me ayudaron y animaron, sobre todo cuando los experimentos no salían.

Gracias a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por financiar mi beca de maestría (POS_NAC_M_2020_1_163935). Gracias a la Universidad de la República por la financiación del proyecto CSIC I+D titulado *“Modulación de la interacción hospedero-parásito mediante el uso de péptidos sintéticos derivados de receptores scavenger”* (N°2120_CSIC_I+D_2020; responsable: Dr. Mourglia-Ettlin), en cuyo marco se realizó la presente tesis; y al Programa de Posgrado en Biotecnología (Facultad de Ciencias, Universidad de la República), por su apoyo económico como estudiante del programa.

Gracias al Dr. Andrés Iriarte y al Dr. Sebastián Miles por su colaboración con los análisis bioinformáticos y estudios de modelado estructural.

En el ámbito personal, quiero agradecer a mis amigos de siempre, por acompañarme en este camino, aunque eso haya representado unas cuantas ausencias. Le agradezco también a Ani, mi amiga de la FQ, por haber estado presente en el transcurso de esta tesis a pesar de la distancia. Gracias a mis compañeros de trabajo y a mis amigas del gimnasio que son quienes me bancan en el día a día, gracias por su linda energía, sobre todo en este último tiempo.

Gracias a mi familia, mi gran sostén. Gracias a mis padres por marcarme el camino, gracias a mi hermano, abuelos, tíos y primos; sin su apoyo incondicional quizás no hubiera llegado hasta acá. Y, por último, gracias a Seba, mi compañero de todos los días por todos estos años de aguante.

INDICE

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedades Tropicales Desatendidas: Equinococosis quística.....	1
1.1.1. EQ: Agente etiológico y características generales.....	1
1.1.2. EQ: Diagnóstico y tratamiento.....	4
1.1.3. EQ: Respuesta inmune en hospederos intermediarios.....	8
1.2. Receptores scavenger.....	10
1.2.1. Superfamilia de RS Ricos en Cisteínas.....	15
1.2.2. Miembros de la SF-SRCR capaces de reconocer patógenos.....	18
1.3. Péptidos sintéticos como agentes terapéuticos.....	23
1.3.1. Los RS como fuente de péptidos con acciones terapéuticas.....	25

2. HIPÓTESIS.....	27
--------------------------	-----------

3. OBEJETIVOS.....	28
---------------------------	-----------

3.1. Objetivo general.....	28
3.2. Objetivos específicos.....	28

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Identificación de secuencias homólogas a <i>pbs1</i>	29
2.2. Diseño de péptidos con secuencias en tándem.....	29
2.3. Caracterización bioinformática y modelado estructural de los péptidos.....	30
2.4. Reactivos químicos generales.....	30
2.5. Síntesis, solubilización y almacenamiento de péptidos.....	31
2.6. Parásitos y Ratones.....	31

2.7. Actividad hemolítica de los péptidos.....	32
2.8. Actividad citotóxica de los péptidos.....	33
2.9. Ensayos de actividad protoscolicida: Cultivos axénicos.....	35
2.10. Ensayos de actividad protoscolicida: Cultivos celulares.....	36
2.11. Obtención de antígenos tegumentarios.....	36
2.12. Interacción física entre antígenos tegumentarios y células murinas.....	37
2.13. Cultivos de PEC estimulados con PSEx.....	38
2.14. Cultivos de células RAW264.7 estimulados con PSEx.....	39
2.15. Titulación de anticuerpos específicos y polireactivos.....	40
2.16. Cuantificación de citoquinas.....	41
2.17. Cuantificación de nitritos.....	42
2.18. Potencial profiláctico <i>in vivo</i> de los péptidos sintéticos.....	42
2.19. Análisis estadísticos.....	44

CAPÍTULO 3: Diseño de péptidos sintéticos basados en la secuencia *pbs1* y evaluación de su perfil de biocompatibilidad.

Resultados y discusión.....	45
3.1. Identificación de secuencias homólogas a <i>pbs1</i> en diversos RS.....	46
3.2. Modelado estructural de los péptidos 11-mer identificados.....	51
3.3. Caracterización fisicoquímica de los péptidos 11-mer identificados.....	54
3.4. Síntesis comercial de los péptidos 11-mer y optimización de su solubilización.....	56
3.5. Evaluación de la biocompatibilidad de los péptidos 11-mer con sistemas mamíferos.....	58
3.5.1. Actividad hemolítica de los péptidos 11-mer.....	59
3.5.2. Actividad citotóxica de los péptidos 11-mer.....	59

CAPÍTULO 4: Evaluación de la actividad antiparasitaria de los péptidos sintéticos 11-mer.

Resultados y discusión.....	63
4.1. Actividad protoscolicida intrínseca de los péptidos 11-mer: Cultivos axénicos metabólicamente estresantes.....	64
4.2. Actividad protoscolicida intrínseca de los péptidos 11-mer: Cultivos axénicos metabólicamente óptimos.....	71
4.3. Actividad protoscolicida de los péptidos 11-mer en presencia de células efectoras.....	74

CAPÍTULO 5: Efectos inmunomoduladores inducidos por los péptidos sintéticos 11-mer sobre cultivos celulares estimulados con antígenos parasitarios.

Resultados y discusión.....	77
5.1. Efecto de los péptidos 11-mer sobre la secreción de citoquinas por parte de PEC murinas estimuladas con antígenos parasitarios.....	78
5.2. Efecto de los péptidos 11-mer sobre la secreción de anticuerpos por parte de PEC murinas estimuladas con antígenos parasitarios.....	81
5.3. Efecto de los péptidos 11-mer sobre la interacción física entre células RAW264.7. y antígenos parasitarios.....	88
5.4. Efecto de los péptidos 11-mer sobre la secreción de citoquinas por parte de células RAW264.7. estimuladas con antígenos parasitarios.....	94
5.5. Efecto de los péptidos 11-mer sobre la producción de óxido nítrico por parte de células RAW264.7 estimuladas con antígenos parasitarios.....	98

CAPÍTULO 6: Péptidos sintéticos 35-mer: Diseño, caracterización, biocompatibilidad, acciones antiparasitarias y efectos inmunomoduladores.

Resultados y discusión	105
6.1. Diseño de péptidos 35-mer a partir de péptidos homólogos a <i>pbs1</i>	106
6.2. Modelado estructural de los péptidos 35-mer diseñados.....	110
6.3. Caracterización fisicoquímica de los péptidos 35-mer diseñados.....	112
6.4. Síntesis comercial y solubilización de los péptidos 35-mer.....	113
6.5. Biocompatibilidad de los péptidos 35-mer con sistemas mamíferos.....	115
6.5.1. Actividad hemolítica de los péptidos 35-mer.....	115
6.5.2. Actividad citotóxica de los péptidos 35-mer.....	116
6.6. Actividad protoscolicida de los péptidos 35-mer.....	117
6.6.1. Actividad protoscolicida intrínseca de los péptidos 35-mer: Cultivos axénicos metabólicamente estresantes.....	118
6.6.2. Actividad protoscolicida intrínseca de los péptidos 35-mer: Cultivos axénicos metabólicamente óptimos.....	122
6.6.3. Actividad protoscolicida de los péptidos 35-mer en presencia de células efectoras.....	125
6.7. Efectos inmunomoduladores de los péptidos 35-mer sobre PEC estimuladas con antígenos parasitarios.....	127
6.7.1. Efecto de los péptidos 35-mer sobre la secreción de citoquinas en PEC estimuladas con antígenos parasitarios.....	127
6.7.2. Efecto de los péptidos 35-mer sobre la producción de anticuerpos por PEC estimuladas con antígenos parasitarios.....	130
6.8. Efecto de los péptidos 35-mer sobre la interacción física entre células RAW264.7. y antígenos parasitarios.....	133
6.9. Efectos inmunomoduladores de los péptidos 35-mer sobre células RAW264.7. estimuladas con antígenos parasitarios.....	137

6.9.1. Efecto de los péptidos 35-mer sobre la secreción de citoquinas en células RAW264.7. estimuladas con antígenos parasitarios.....	137
6.9.2. Efecto de los péptidos 35-mer sobre la producción de NO en células RAW264.7. estimuladas con antígenos parasitarios.....	139

CAPÍTULO 7: Efectos profilácticos e inmunomoduladores inducidos sobre el modelo murino de EQ secundaria por parte de los péptidos sintéticos diseñados.

Resultados y discusión.....	143
7.1. Experimento #1: Valor profiláctico de los péptidos 11-mer derivados de CD5 y CD6.....	145
7.2. Experimento #2: Valor profiláctico de los péptidos 11-mer derivados de CD5.....	147
7.3. Experimento #3: Valor profiláctico de los péptidos 11-mer derivados de MARCO, SR-AI, CD5L, SALSA, SCARA5 y SSc5D.....	148
7.4. Experimento #4: Valor profiláctico de los péptidos 35-mer derivados de CD5 y CD6.....	149
7.5. Experimento #5: Valor profiláctico de los péptidos 35-mer derivados de MARCO, SR-AI y CD5L.....	151
7.6. Experimento #6: Valor profiláctico de los péptidos 11-mer derivados de MARCO, SR-AI, CD163, CD5L, SALSA, SCARA5 y SSc5D.....	152
7.7. Experimento #7: Valor profiláctico de los péptidos 11-mer y 35-mer derivados de SR-AI, MARCO, CD163, CD5L, SALSA, SCARA5 y SSc5D.....	153

CAPÍTULO 8: DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS.....156

CAPÍTULO 9: BIBLIOGRAFÍA.....174

ANEXO.....187

Capítulo 1.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedades Tropicales Desatendidas: Equinocosis quística.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) denomina Enfermedades Tropicales Desatendidas (ETDs) a un grupo de enfermedades infecciosas que se asocian comúnmente con entornos empobrecidos, especialmente en ambientes calurosos y húmedos de clima tropical o subtropical. La mayoría de las ETDs son enfermedades parasitarias, transmitidas por insectos o de propagación por el agua y/o suelo contaminado. La OMS aborda las ETDs de forma agrupada por dos razones principales. En primer lugar, aunque son enfermedades muy distintas desde el punto de vista médico, los efectos físicos de las ETDs se asocian a cuadros de discapacidad moderada/grave y con deficiencias/discapacidades duraderas y/o crónicas. En segundo lugar, al asociarse con entornos de pobreza, las ETDs tienden a solaparse geográficamente, concentrándose en zonas donde el agua de bebida es insalubre o demasiado escasa para la higiene personal, y donde básicamente no existe redes de saneamiento. El hecho de considerar a las ETDs en forma colectiva es importante, además, para los programas de control, pues muchas personas pueden sufrir más de una ETD en forma simultánea [www.who.int/topics/tropical_diseases/]. La lista actual de ETDs contiene 17 enfermedades distintas, siendo la equinocosis quística (EQ), o hidatidosis, la de mayor prevalencia e incidencia en Uruguay.

1.1.1. EQ: Agente etiológico y características generales.

Las equinocosis (ya sean alveolar, poliquística o quística) son un grupo de infecciones zoonóticas causadas por el estadio larvario de cestodos pertenecientes al género *Echinococcus*. Originalmente, se consideraba a *E. granulosus* como único agente causante de EQ [Nakao et al., 2013]. Actualmente, se ha consensuado el agrupamiento de todas las especies responsables de EQ bajo el complejo genético multi-especie denominado *E. granulosus sensu lato* (s.l.). Así, diferentes variantes génicas, o genotipos, de *E. granulosus* s.l. se han ido identificando, mostrando diferencias entre

ellos respecto al hospedero intermediario de preferencia (por ejemplo: ovejas, búfalos, caballos, vacas, cerdos, etc.).

A través de avances recientes en sistemática filogenética, dentro del género *Echinococcus* actualmente se reconocen, al menos, nueve especies: *E. granulosus sensu stricto* (*E. granulosus* s.s., incluyendo los genotipos G1, G2 y G3), *E. equinus* (genotipo G4), *E. ortleppi* (genotipo G5), *E. canadensis* (incluyendo los genotipos G6 hasta G10), *E. multilocularis*, *E. vogeli*, *E. oligarthrus*, *E. felidis* y *E. shiquicus* [Nakao et al., 2013; Xiao et al., 2006; Hüttner et al., 2008]. Sin embargo, la discusión taxonómica de las especies causantes de las diversas formas de equinococosis continúa y aún no se ha llegado a un acuerdo final [Lymbery et al., 2015]. Esta cuestión taxonómica es de gran relevancia, ya que distintas especies del género *Echinococcus* causan distintos tipos de equinococosis en humanos. Así, mientras la EQ es causada por infecciones con *E. granulosus* s.s., *E. ortleppi* y *E. canadensis*, la equinococosis alveolar es causada por *E. multilocularis*, y la equinococosis poliquistica por *E. vogeli* y *E. oligarthrus*. Hasta el momento, no existen reportes de casos humanos de EQ debida a *E. equinus*, *E. felidis* o *E. shiquicus* [Álvarez-Rojas et al., 2014].

La EQ muestra una distribución cosmopolita, y representa un problema serio de salud pública en algunas regiones. Es una zoonosis considerada endémica en el cono sur de América del Sur, en la cuenca mediterránea, en el área centro-este de Asia y en el este de África [Budke et al., 2006; Cucher et al., 2016]. A nivel epidemiológico, los valores de incidencia en humanos pueden superar los 50 cada 100.000 personas-año en áreas endémicas, y se han reportado tasas de prevalencia tan altas como 5-10% en zonas del Perú, del este de África y del oeste de China [Craig et al., 2007]. Asimismo, la EQ en humanos es responsable anualmente de pérdidas aproximadas a 1 millón de DALYs (del inglés *Disability-Adjusted Life Years*), y de 3 mil millones de dólares en las industrias ganaderas [Budke et al., 2006]. Claramente, estos datos hacen de la EQ un importante problema de salud pública, asociado a grandes pérdidas económicas principalmente en países de recursos medios/bajos.

El ciclo de vida de *E. granulosus* s.l. se mantiene en la naturaleza alternando entre dos hospederos mamíferos, uno carnívoro (normalmente cánidos) que actúa como hospedero definitivo alojando la forma de gusano adulto en sus intestinos, y uno habitualmente herbívoro (ovejas, cabras, vacas, caballos, etc.) que se comporta como

hospedero intermediario albergando en sus vísceras el estadio larvario de metacestode o quiste hidático (**Figura 1.1.**). El hospedero definitivo puede estar infectado con cientos de gusanos adultos capaces de producir miles de huevos al día mediante reproducción sexual. Estos huevos se liberan al medio externo con las heces del hospedero, pasando a ser el estadio infeccioso para los potenciales hospederos intermediarios que, una vez que los ingieren, liberan la oncosfera en su tracto digestivo. Este último estadio penetra luego la mucosa intestinal y migra a través del torrente sanguíneo, alojándose normalmente en hígado o pulmones, diferenciándose al estadio de metacestode. En el interior de éstos, a partir de la membrana germinativa y mediante reproducción asexual, se producen los protoscoleces (PSC) que son liberados al líquido interno que mantiene distendido al quiste (líquido hidático). Luego, en caso de que las vísceras de un hospedero intermediario infectado sean el alimento de un potencial hospedero definitivo, los PSC tienen la potencialidad de diferenciarse en gusanos adultos intestinales en estos, cerrándose así el ciclo de vida del parásito.

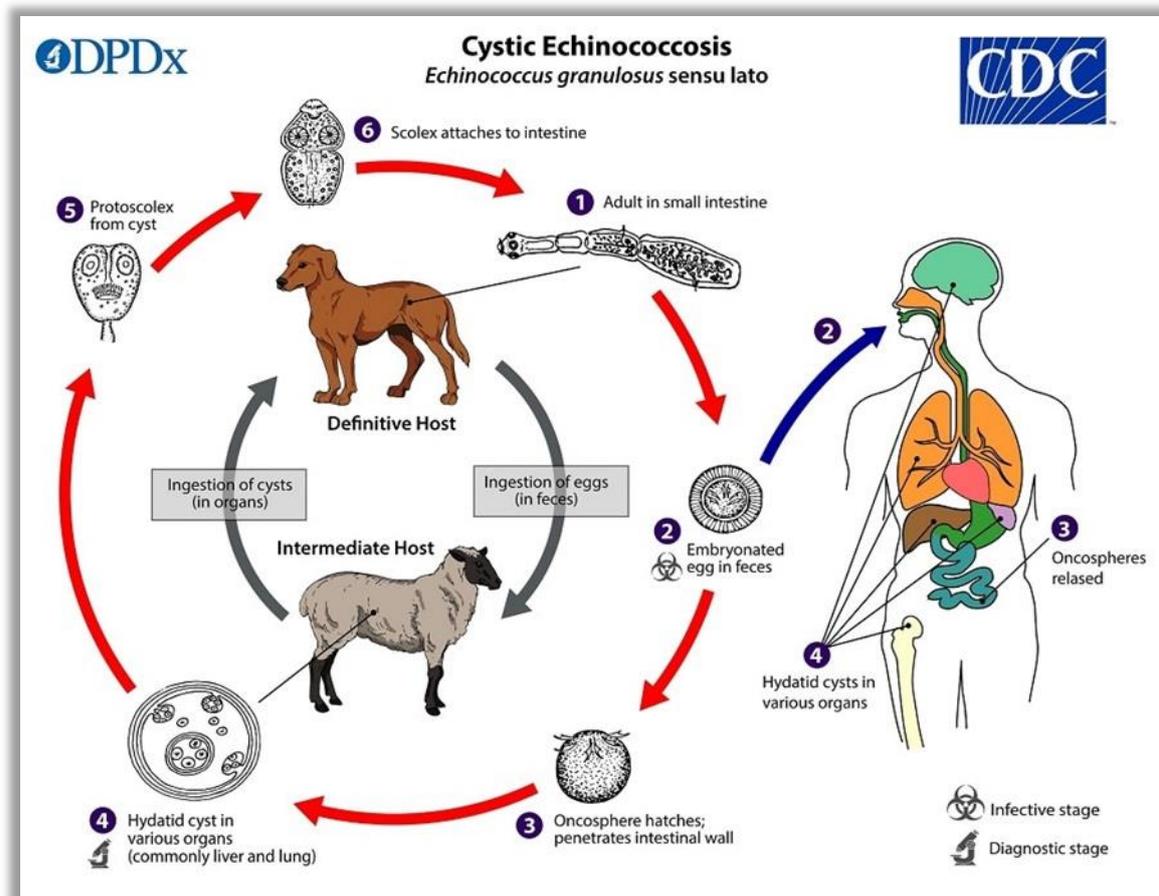


Figura 1.1. Ciclo de vida de *Echinococcus granulosus* s.l. La forma adulta (1) se establece en el intestino delgado de su hospedero definitivo y genera huevos embrionados que se liberan con las heces. El hospedero intermediario se infecta con estos huevos (2), la oncosfera eclosiona en sus intestinos (3) y, por circulación sanguínea, llega al órgano donde se transforma en metacestodo (principalmente hígado y pulmón). El metacestodo constituye el estadio diagnóstico de la enfermedad en humanos (4). El quiste madura y por reproducción asexual genera PSC, que son el estadio infectivo para el hospedero definitivo (5) y (6). El hombre puede actuar como un hospedador intermediario accidental, interrumpiendo el ciclo de vida del parásito. Adaptado de [CDC, 2019].

Cabe destacar que toda especie animal en la que sea naturalmente posible el establecimiento de metacestodos de *E. granulosus* s.l., puede considerarse hospedero intermediario, aunque si dicha especie no permite la continuidad del ciclo, se la denomina “hospedero intermediario accidental”, tal y como es el caso de los seres humanos [Agudelo-Higuera et al., 2016]. Además, resulta relevante destacar que el estadio de PSC tiene una peculiar plasticidad que le permite diferenciarse, también, hacia el estadio de metacestodo en caso de diseminarse en el interior de un hospedero intermediario infectado, derivando en un tipo de infección conocida como EQ secundaria [Thompson, 1995]. En humanos, la EQ secundaria se considera un problema muy serio asociado al procedimiento quirúrgico de remoción de quistes hidáticos primarios, tratamiento de referencia para la EQ. En este sentido, aunque los porcentajes reales de EQ secundaria son difíciles de analizar, diversos estudios han informado tasas del 10 al 35%, dependiendo principalmente del tipo de cirugía, de la ubicación geográfica del caso y del tiempo de seguimiento postcirugía [Abdelraouf et al., 2015; Velasco-Tirado et al., 2017; Pang et al., 2018]. De hecho, recientemente se publicó una revisión sistemática de la literatura, con metaanálisis, donde se analizaron más de 6.000 pacientes intervenidos quirúrgicamente y se estimó en un 8% la tasa global de EQ secundaria, pudiendo ascender hasta el 17% según las áreas geográficas estudiadas y el tipo de intervención realizado [Alzoubi et al., 2024].

1.1.2. EQ: Diagnóstico y tratamiento.

El diagnóstico de referencia actual para EQ en humanos se basa en estudios imagenológicos, y sigue los lineamientos estandarizados propuestos en 1981 por Gharbi y colaboradores [WHO Informal Working Group, 2003]. Esta categorización, apoyada y

recomendada por la OMS para guiar el tratamiento en forma caso-específica, clasifica los quistes hidáticos en tres grandes grupos: (i) activos (CE1 y CE2), (ii) transicionales (CE3) y (iii) inactivos (CE4 y CE5). Actualmente, el grupo “transicional” se ha subdividido en CE3a (quistes hidáticos con membranas internas separadas) y CE3b (quistes hidáticos con vesículas hijas íntegras), basándose principalmente en sus diferencias en perfiles metabólicos y de respuesta a los tratamientos no-quirúrgicos. En este sentido, los quistes hidáticos CE3a serían verdaderamente “transicionales” ya que pueden ser tanto activos como inactivos, mientras que los CE3b son siempre activos.

La clasificación de Gharbi es particularmente ventajosa en casos de quistes con localización hepática, ya que facilita y orienta el tratamiento médico en forma más racional que el basado solo en tamaño. Por otro lado, para aquellos quistes hidáticos inaccesibles a estudios por ultrasonido, se suelen utilizar otras técnicas imagenológicas, como la tomografía computarizada o la resonancia magnética [Brunetti et al., 2010].

En la actualidad, las técnicas de inmunodiagnóstico juegan un papel auxiliar en el diagnóstico de la EQ en humanos, ya que presentan limitaciones no menores en términos de sensibilidad y especificidad. Sin embargo, la serología suele utilizarse para ayudar en la confirmación del diagnóstico imagenológico, así como en la realización de estudios de tamizaje en regiones altamente endémicas. De hecho, la OMS recomienda que en el proceso diagnóstico de EQ se incluya, de ser posible, al menos un análisis de tipo inmunodiagnóstico [WHO Informal Working Group, 2003].

Por otro lado, los métodos serológicos utilizados en diagnóstico y seguimiento de pacientes con EQ consisten básicamente en la detección de anticuerpos IgG específicos contra antígenos de líquido hidático (nativos o recombinantes), mayoritariamente AgB. Sin embargo, se han reportado varias desventajas en su uso debido a su moderada o baja sensibilidad y especificidad diagnósticas, y a su pobre valor pronóstico durante el seguimiento postquirúrgico, ya que dichos anticuerpos perduran por largos períodos de tiempo en circulación [Manzano-Román et al., 2015]. A su vez, los niveles de IgG específicas varían con el número, el tamaño, la localización y el “estado vital” de los quistes [Lissandrin et al., 2016], haciendo que solamente un 60-80% de los casos de EQ en humanos confirmados por cirugía muestren serología positiva [Craig, 1997]. Estas debilidades influyen negativamente en el uso de técnicas serológicas por parte de los médicos clínicos tratantes. De todas formas, los niveles de subclases de IgG específicas

contra AgB son buenos marcadores del estado de la infección, ya que títulos elevados de IgG4 se asocian a fases evolutivas de la EQ (quistes tipo CE1, CE2 y CE3a-CE3b), mientras que títulos elevados de IgG1, IgG2 e IgG3 se correlacionan con fases involutivas de la enfermedad (quistes tipo CE4 y CE5) [Daeki et al., 2000]. Asimismo, se ha reportado que individuos con infección primaria presentan niveles menores de IgE e IgG4 específicas contra líquido hidático comparado con pacientes con recidivas [Riganò et al., 1995a, 1995b; 1996; Hernández-Pomi et al., 1997]. De esta manera, podría pensarse que la calidad de la respuesta humoral de pacientes con EQ, en términos de isotipos y subclases de anticuerpos inducidas, podría condicionar el desarrollo de la infección.

El espectro clínico de la EQ en humanos se extiende desde infecciones asintomáticas a severas, y raramente fatales. Actualmente existen cuatro aproximaciones para el manejo clínico de la enfermedad: en el caso de quistes activos las opciones son cirugía, técnicas percutáneas y/o quimioterapia, mientras que para quistes inactivos lo usual es el seguimiento continuo de su evolución. Para establecer la estrategia de manejo, se debe tomar en cuenta el estadio del quiste, su tamaño y localización anatómica, y las comorbilidades potencialmente asociadas [Brunetti & Junghanss, 2009; Piccoli et al., 2014; Rinaldi et al., 2014].

El tratamiento farmacológico para pacientes diagnosticados con EQ se basa principalmente en el uso de benzimidazoles, dentro de los cuales los más utilizados (albendazol, mebendazol y praziquantel) son a menudo parcialmente efectivos y rara vez permiten alcanzar la regresión completa de los quistes. Reportes con resultados obtenidos en más de 2.000 casos bien controlados tratados con benzimidazoles y evaluados hasta 12 meses, han demostrado que el 10-30% de los quistes “mueren”, lográndose para esos casos la regresión completa, el 50-70% responden parcialmente generando degeneración o reducción del tamaño de los quistes, y el 20-30% no desarrolla evidencia de respuesta mediante cambios morfológicos [Horton, 1997; Todorov et al., 1992; Horton, 2003; Junghanss et al., 2008]. Además, y sobre la base de un metaanálisis con 711 pacientes, se estimó que incluso 2 años después del inicio del tratamiento con benzimidazoles, el 40% de los quistes siguen activos [Stojkovic et al., 2009]. Sin embargo, la exposición prolongada a estos fármacos presenta diferentes efectos adversos [Chai et al., 2021]. Por tanto, surge la necesidad de explorar nuevas

alternativas que permitan desarrollar terapias más eficientes y con baja toxicidad para el hospedero.

El tratamiento quirúrgico sigue siendo la primera opción para quistes grandes CE2-CE3b con múltiples quistes hijos o para quistes superficiales únicos, sin embargo, se encuentra contraindicado en pacientes que presenten quistes inactivos o quistes múltiples de difícil acceso [Nunnari et al., 2012]. Para evitar riesgos de anafilaxis y disminuir las tasas de recidivas, se recomienda realizar el tratamiento quirúrgico combinado con quimioterapia [Arif et al., 2008, Shams et al., 2011].

Por último, dentro de los procedimientos percutáneos, se encuentra la técnica PAIR, cuyo objetivo es minimizar la viabilidad de la capa germinal; siendo recomendada para quistes en estadio CE1 y CE3a con diámetros >5 cm [WHO Informal Working Group, 2003]. Este procedimiento de drenaje percutáneo de quistes hidáticos hepáticos implica cuatro pasos secuenciales que se definen a partir del acrónimo “PAIR”, que denota punción percutánea del quiste mediante guía ecográfica (P), aspiración del líquido hidático (A), inyección de un agente protoscolicida (por ejemplo, etanol 95 % o NaCl 20%) (I) y reaspiración (R) [Nunnari et al., 2012]. El riesgo de EQ secundaria se puede minimizar mediante la administración de benzimidazoles antes y después del procedimiento, obteniéndose mejores resultados que realizando ambos tratamientos por separado [Khuroo et al., 1993, Smego et al., 2003].

Hasta la fecha, varios agentes químicos protoscolicidas han sido utilizados para la inactivación de los PSC del quiste hidático tanto en el contexto de la cirugía de remoción como en la realización de PAIR [Sharafi et al., 2017]. Un agente protoscolicida perfecto se define como eficaz en concentraciones bajas en un tiempo de exposición más corto, estable al diluirse con el líquido del quiste, no tóxico para tejidos del hospedero, de bajo costo y fácilmente disponible [Norouzi et al., 2020], sin embargo, no ha sido posible seleccionar uno que cumpla con todas las condiciones mencionadas. Recientemente, se han obtenido resultados prometedores en el campo de las nanopartículas combinadas con agentes protoscolicidas, principalmente aplicadas antes y después de la cirugía de remoción de quistes como alternativa para prevenir la infección secundaria [Albalawi et al., 2020, Norouzi et al., 2020, Shakibaie et al., 2022, Soleymani et al., 2024].

1.1.3. EQ: Respuesta inmune en hospederos intermediarios.

La respuesta inmune frente a *E. granulosus* s.l. en hospederos intermediarios se divide clásicamente en dos fases secuenciales: una asociada al pre-enquistamiento y otra luego del mismo (post-enquistamiento), diferenciadas por la formación de la capa laminar alrededor de las oncósferas (o de los PSC) en proceso de desarrollo hacia metacestodo [Rogan et al., 2015]. Conceptualmente, esta transición se asocia con la pérdida de susceptibilidad del parásito respecto al ataque inmunitario del hospedero, ya sea en el contexto de la EQ primaria (causada por la ingesta de oncósferas) o secundaria (debida a la siembra interna de PSC) [Tamarozzi et al., 2016]. Por ello, el estudio de la respuesta inmune temprana, durante el pre-enquistamiento, ha sido foco de gran parte del estudio sobre la inmunobiología de la EQ.

La respuesta inmune frente a oncósferas infectivas resulta difícil de estudiar debido a que en infecciones naturales ocurre de manera asintomática, mientras que a nivel experimental su obtención y manipulación no es sencilla por motivos de bioseguridad. Sin embargo, se sabe que las oncósferas activan una respuesta inmune potente que suele eliminarlas en su mayoría en pocos días, induciendo además altos niveles de protección frente a desafíos posteriores. Ambos eventos se han demostrado en modelos murinos utilizando diversas rutas de inoculación [Dempster et al., 1991; Dempster et al., 1992; Zhang et al., 2001] y en ovejas desafiadas experimentalmente con exposición oral a oncósferas [Heath et al., 1981; Heath & Lawrence, 1996]. Así, la protección reportada dependería de la exposición del hospedero a antígenos presentes en las oncósferas y no sería consecuencia directa de la respuesta inmune generada tras el desarrollo del metacestodo [Lightowers et al., 2010]. La protección observada depende de la presencia de anticuerpos específicos y de la activación del sistema complemento, mejorando en presencia de neutrófilos [Tamarozzi et al., 2016].

La mayor parte de la información disponible sobre los mecanismos de eliminación del parásito en la fase de pre-enquistamiento se ha obtenido mediante el uso de modelos de EQ secundaria. En este sentido, el modelo más utilizado consiste en la inoculación intraperitoneal de PSC viables en ratones inmunocompetentes [González-Porcile et al., 2024], modelando así el desarrollo de una EQ secundaria debida a la ruptura (accidental o derivada de una intervención quirúrgica) de un quiste primario fértil. En este modelo, el porcentaje de PSC inoculados que se diferencia a quistes varía según diversos

parámetros [Baz et al., 2006; Tamarozzi et al., 2016], siendo uno de los más relevantes la cepa de ratones utilizada [Mourglia-Ettlin et al., 2016a] y el genotipo parasitario [Cucher et al., 2013].

La inoculación de PSC en la cavidad peritoneal de ratones inmunocompetentes provoca una fuerte respuesta inflamatoria local con reclutamiento rápido de neutrófilos, macrófagos y eosinófilos, seguido de linfocitos, y observándose activación del sistema complemento [Tamarozzi et al., 2016]. Además, se ha reportado que los PSC pueden activar neutrófilos e inducir la producción de óxido nítrico (NO) por PBMC [Amri et al., 2007; Virginio et al., 2007]. Asimismo, se ha demostrado en distintos sistemas *in vitro* e *in vivo* que los macrófagos, el NO, la proteína catiónica de eosinófilos (ECP) y el sistema complemento son capaces de afectar negativamente la viabilidad de los PSC durante la etapa de pre-enquistamiento [Tamarozzi et al., 2016].

En cuanto a los anticuerpos, estos alcanzan altos niveles en solo unas pocas semanas post-inoculación de PSC viables, mientras que sus niveles son bajos si se utilizan PSC muertos; sugiriéndose así que la respuesta inmune claramente es dependiente del desarrollo efectivo del proceso infeccioso [Ferragut & Nieto, 1996; Severi et al., 1997; Dematteis et al., 1999]. En este sentido, se ha reportado que tanto *in vivo* como *in vitro* los anticuerpos contribuyen a la actividad protoscolicida general de la respuesta inmune del hospedero intermediario frente a la EQ secundaria [Dempster et al., 1992; Mourglia-Ettlin et al., 2016a; Miles et al., 2020a]; y en particular, nuestro grupo ha reportado muy recientemente que los anticuerpos polireactivos podrían ser potenciales marcadores humorales de resistencia frente a la EQ, tanto en humanos como en el modelo murino de EQ secundaria [García-Luna et al., 2021].

Sin embargo, y aunque los PSC son susceptibles a la respuesta inmune durante la fase de pre-enquistamiento, un porcentaje de los mismos sobrevive y es capaz de desarrollarse en quistes hidáticos en el hospedero intermedio. Esto implica que la respuesta inmune temprana no es completamente efectiva para evitar el establecimiento de la infección, sugiriendo por lo tanto la existencia de fenómenos de evasión inmune y mecanismos inmunomoduladores dirigidos por el parásito para hacer frente a la respuesta inmune del hospedero. En este sentido, se ha demostrado que poco tiempo después de la inoculación de los PSC se desarrolla a nivel sistémico una respuesta celular mixta con componentes de tipo Th1 (IFN- γ) y Th2 (IL-4), junto con altos niveles

de IL-10. Asimismo, se observó que la inoculación de PSC muertos induce niveles más altos de IFN- γ en comparación con la inoculación de PSC viables, sugiriéndose así que la producción de IL-10 e IL-4 podría ser inducida activamente por el parásito en favor del establecimiento de la infección [Dematteis et al., 1999].

En línea con estos datos, y al analizar con mayor detalle la respuesta local de citoquinas durante la primera semana post-inoculación de PSC, se demostró que la inducción de IFN- γ se eleva en los primeros 3 días, mientras que la de IL-4 e IL-5 aumenta a partir del día 5 [Mourglia-Ettlin et al., 2011]. Por otra parte, se ha reportado que ratones transfectados con genes para la producción de IFN- γ o IL-12 desarrollan un número significativamente menor de quistes luego de la inoculación de PSC viables, mientras que la transfección con genes para la producción de IL-4 deriva en un aumento en el número de quistes desarrollados [Al-Qaoud & Abdel-Hafez, 2008]. En consonancia con estos datos, se reportó también que el co-cultivo de PBMC con PSC en presencia de IFN- γ resulta en una alta tasa de muerte de los parásitos, en paralelo con altos niveles de producción de NO, mientras que lo contrario se observó al realizar los co-cultivos en presencia de IL-4 o IL-10 [Amri et al., 2007; Amri et al., 2009]. De esta forma, la literatura propone que la inducción temprana de respuestas de tipo Th2 favorecería el establecimiento de la infección, mientras que las respuestas de tipo Th1 serían perjudiciales para el parásito. Sin embargo, es importante destacar que toda esta evidencia experimental se obtuvo trabajando con PSC como estadio infeccioso, pudiendo no ser exactamente extrapolable a la situación natural de infección del hospedero intermediario con el estadio de oncósfera [Tamarozzi et al., 2016].

1.2. Receptores scavenger.

Los receptores *scavenger* (RS), o receptores barrenderos, constituyen un supergrupo de proteínas estructuralmente diversas que exhiben una amplia gama de funciones biológicas. Estos receptores se expresan predominantemente en células de origen mieloide y reconocen una inmensa variedad de ligandos que incluyen tanto moléculas endógenas, modificadas o no, como estructuras moleculares presentes en patógenos microbianos. Originalmente, los RS se definieron como receptores de superficie celular capaces de unir e internalizar exclusivamente lipoproteínas de baja densidad modificadas, aunque actualmente se les conoce una alta variedad de ligandos

(endógenos y exógenos), así como localizaciones celulares diversas. Este reconocimiento suele promover la eliminación de componentes exógenos y/o endógenos mediante mecanismos que incluyen endocitosis, fagocitosis, adhesión y/o señalización celular [PrabhuDas et al., 2017].

Actualmente, los RS se clasifican en 11 clases según sus homologías de secuencia aminoacídica (total o parcial); aunque en cada clase también se incluyen variaciones relacionadas (**Figura 1.2.**). La alta variedad de ligandos reconocidos por los RS hace que estos participen en la regulación de diversos estados fisio(pato)lógicos, como son la aterosclerosis, las infecciones, la inmunovigilancia y el cáncer, entre otros [Zani et al., 2015]. Por ello, a continuación, se describe muy brevemente cada una de las clases de RS, así como se brindan ejemplos particulares de cada una.

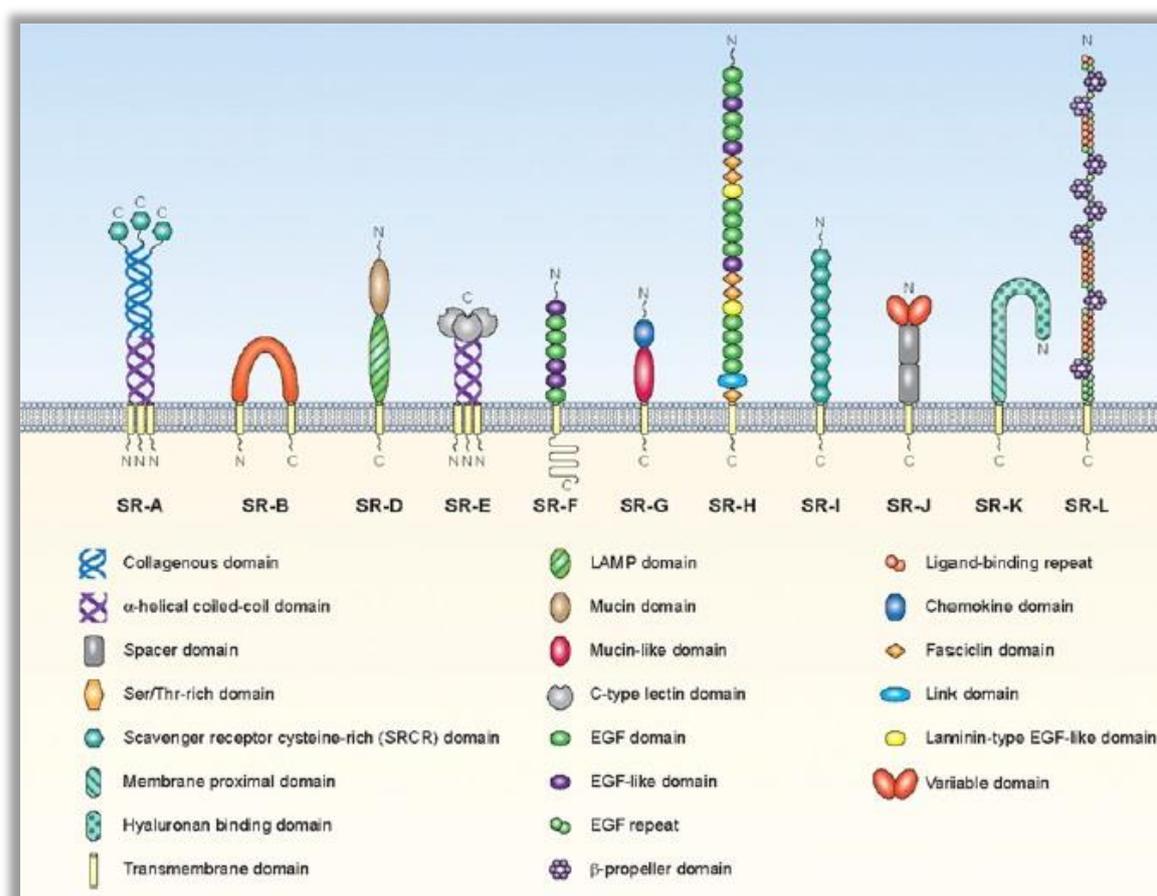


Figura 1.2. Representación esquemática de las diferentes clases de RS. Los RS se dividen en 12 clases. Los distintos dominios de proteínas o carbohidratos se encuentran codificados en la figura. No se representa la clase C ya que se encuentra presente únicamente en *Drosophila melanogaster*. [PrabhuDas et al., 2017].

Clase A (RS-A). Los RS-A se expresan principalmente en macrófagos tisulares y en ciertos subtipos de macrófagos, como las células de Kupffer y los macrófagos tímicos (tanto corticales como medulares). También han sido identificados en las vénulas del alto endotelio de los ganglios y en subpoblaciones de células dendríticas. Los miembros de esta clase tienen una estructura compuesta por una cola citoplásmica N-terminal, un dominio transmembrana, una región espaciadora, un dominio α -hélice, un dominio de tipo colágeno y un dominio C-terminal de tipo Receptor *Scavenger Rico en Cisteína* (SRCR, del inglés *Scavenger Receptor Cysteine Rich*). El RS prototípico de esta clase es RS-AI, el cual, a su vez, presenta tres isoformas como variantes de *splicing* alternativo: RS-AI, RS-AII y RS-AIII. Dicho receptor fue inicialmente aislado e identificado a partir de ARNm de pulmón bovino; sin embargo, posteriormente ha sido identificado en otras especies incluyendo ratones y humanos. Otros miembros de esta clase incluyen al “receptor de macrófagos con estructura colágena” (MARCO), el RS A5 (SCARA-5) y el RS con dominio de lectina de tipo C (SRCL-I/II) [PrabhuDas et al., 2017].

Clase B (RS-B). Los RS-B son CD36, LIMP2 y RS-BI (y su forma de *splicing* alternativo RS-BII). Todos ellos se caracterizan por poseer dos dominios transmembrana que flanquean un bucle extracelular, con sus extremos tanto N- como C-terminales ubicados en el citoplasma celular. El dominio extracelular de estos receptores se encuentra altamente N-glicosilado, y esta modificación les proporciona protección frente a las proteasas que abundan en sitios inflamados. El receptor prototípico de esta clase, CD36, es uno de los RS más estudiados. Inicialmente CD36 se identificó como un receptor para trombospondina, capaz de modular la angiogénesis y las interacciones célula-célula. Además, está involucrado en múltiples procesos relacionados con la biología de los macrófagos y juega un rol importante en la respuesta inmune frente a hongos y bacterias [PrabhuDas et al., 2017].

Clase C (RS-C). Los RS-C se describieron originalmente en *Drosophila melanogaster* y se encuentran solamente en insectos, como moscas y mosquitos, formando parte de un rudimentario sistema inmune innato. Así, por ejemplo, la ausencia del RS-C1 en *D. melanogaster* reduce su capacidad de fagocitar hongos y bacterias patógenas, reflejando una conservación generalizada para los RS durante la evolución del sistema inmune innato [Zani et al., 2015]. Los RS-C se componen de 320-629

aminoácidos y son proteínas de membrana de tipo I (RS-C1 y RS-C2) o proteínas solubles secretadas (RS-C3 y RS-C4), con dominios extracelulares que contienen una región CCP en su extremo N-terminal, que precede al motivo MAM. Actualmente, no se reconocen miembros de esta clase en mamíferos [PrabhuDas et al., 2017].

Clase D (RS-D). CD68 es el único miembro de la RS-D. Es una glicoproteína transmembrana de tipo I perteneciente a la familia de proteínas de membrana asociadas a lisosomas (o LAMP), y está compuesto por un dominio extracelular de 300 aminoácidos rico en treonina y serina, que pueden servir como sitios de unión a carbohidratos, y una cola citoplasmática corta. El dominio extracelular de CD68 en humanos comparte un 75% de identidad de secuencia aminoacídica con su homólogo en ratones. Este receptor se expresa en monocitos y macrófagos de cavidad peritoneal, pulmones, hígado, bazo, células de Langerhans y microglías, y presenta una función clásica de RS para LDL oxidada. Además, es un marcador de diferenciación para células hematopoyéticas hacia linaje monocito/macrófago [PrabhuDas et al., 2017].

Clase E (RS-E). Los RS-E son proteínas transmembrana de tipo 2 con motivos de lectina tipo C y actividad RS clásica demostrada. Según su estructura, estas proteínas pertenecen a una subfamilia de receptores lectina tipo C de células NK conocidos como CLEC. El complejo génico de receptores para células NK codifica una gran variedad de receptores tipo CLEC (por ejemplo: CLEC, LOX-1 y dectina-1), los cuales se expresan en estas células, así como en otros leucocitos [PrabhuDas et al., 2017].

Clase F (RS-F). En la actualidad se conocen tres miembros pertenecientes a esta clase. SCARF (o SCARF-1) fue el primero identificado y se lo describió como un receptor endotelial clásico para LDL modificada. Actualmente, SCARF es el RS prototípico de la clase F, caracterizándose por presentar un dominio extracelular de unión a ligando con múltiples repeticiones de dominios similares a los factores de crecimiento epidérmicos, un dominio transmembrana y una larga cola citoplásmica. Esta última es rica en aminoácidos de carga positiva, incluyendo una región rica en serina/prolina seguida de una región rica en glicina. Además de su expresión en células endoteliales, SCARF también se expresa en macrófagos y células dendríticas, donde colabora en la unión de calreticulina, y péptidos asociados, para su internalización vía moléculas MHC de tipo I [PrabhuDas et al., 2017].

Clase G (RS-G). Actualmente, RS-PSOX es el único representante de la clase G. En humanos, RS-PSOX es una proteína de membrana de tipo 1 compuesta por 254 aminoácidos, conteniendo un dominio extracelular N-terminal, una sola región transmembrana y un dominio citoplásmico corto. El dominio extracelular media la endocitosis de fosfatidilserina y de LDL oxidada, entregándolas al sistema endosomal-lisosoma. A su vez, el dominio extracelular de RS-PSOX contiene un motivo relacionado a quimioquinas, seguido de un tallo tipo mucina, el cual puede ser escindido por metaloproteasas ADAM generando así la liberación del ectodominio soluble. En humanos RS-PSOX se expresa en células vasculares del músculo liso, en células endoteliales, monocitos, macrófagos, podocitos renales y en lesiones ateroscleróticas. RS-PSOX tiene una importante función en la inmunidad innata, ya que es capaz de reconocer diversas estructuras moleculares presentes en patógenos; principalmente bacterias [Zani et al., 2015].

Clase H (RS-H). Los RS-H son proteínas transmembrana que contienen dominios tipo fasciclina, tipo EGF y EGF de tipo lámina (FEEL). Actualmente, sus miembros son dos: FEEL-1 (también conocido como estabilina-1 o CLEVER-1) y FEEL-2 (también conocido como estabilina-2 o HARE). Respecto a su localización, FEEL-1 se expresa predominantemente en macrófagos, células mononucleares, células madre hematopoyéticas y células endoteliales; mientras que FEEL-2 se encuentra principalmente en células endoteliales sinusoidales. Ambos RS están involucrados en la adhesión de linfocitos, su transmigración, en la angiogénesis, en el *clearance* de cuerpos apoptóticos y en el tráfico intracelular [PrabhuDas et al., 2017].

Clase I (RS-I). CD163 es el RS prototípico de la clase I. Es una glicoproteína de membrana de 130 kDa que se expresa únicamente en monocitos y macrófagos, y se une a los complejos haptoglobina-hemoglobina promoviendo el *clearance* de la hemoglobina plasmática. Por ello, ha recibido el nombre funcional "RS de hemoglobina" para describir su principal función en macrófagos tisulares. A modo general, los RS de clase I son receptores transmembrana de tipo I caracterizados por contener múltiples dominios SRCR del grupo B en su dominio extracelular. A su vez, la estructura de cada dominio SRCR ofrece potenciales sitios de unión a ligandos en bucles hidrofílicos, hojas β , en una α -hélice y en una cavidad hidrofóbica [PrabhuDas et al., 2017].

Clase J (RS-J). RAGE es el único miembro de la clase J. Es el receptor para productos finales de glicación avanzada (AGEs), siendo capaz de interactuar con un amplio espectro de ligandos aparte de los AGEs, tales como la HMGB-1 y la proteína S-100. RAGE se compone de un solo dominio transmembrana que conecta al ectodominio de reconocimiento de ligandos ubicado en el extremo N-terminal con un dominio citoplasmático corto. El dominio extracelular también contiene tres regiones *Ig-like*. RAGE está involucrado principalmente en el reconocimiento de moléculas endógenas liberadas en el contexto de infecciones, estrés fisiológico y/o inflamación crónica; y su señalización media procesos inflamatorios, de estrés oxidativo y/o de inducción de apoptosis [PrabhuDas et al., 2017].

Clase K (RS-K). La clase K está compuesta únicamente por el receptor CD44, el cual, aunque no presenta homología estructural con ningún otro RS conocido, comparte varias características funcionales por las cuales ha sido recientemente incluido dentro de la familia de RS. CD44 es una glicoproteína de superficie celular conocida como “receptor para hialuronano”. Se trata de una proteína transmembrana multidominio de un solo tramo, con una pequeña cola citosólica capaz de realizar una limitada señalización directa. El dominio extracelular contiene motivos capaces de unir diversos ligandos que incluyen hialuronano, glicoproteínas, proteoglicanos, metaloproteasas de matriz extracelular, factores de crecimiento y citoquinas [PrabhuDas et al., 2017].

Clase L (RS-L). La clase L está compuesta por los miembros de la familia de genes LDLR, entre los cuales destacan RS-L1, LRP-1b, LRP-2, LRP-4, LRP-8 y VLDLR. Esta familia de genes se denomina así debido a su miembro más conocido: LDLR, que actúa como el principal receptor para el recambio del colesterol plasmático. En mamíferos, los RS-L exhiben un notable grado de conservación en su secuencia aminoacídica, poniendo de manifiesto la importancia de sus miembros para la supervivencia de todas las especies [PrabhuDas et al., 2017].

1.2.1. Superfamilia de RS Ricos en Cisteínas.

La Superfamilia de RS Ricos en Cisteínas (SF-SRCR, del inglés *Super-Family of Scavenger Receptors Cysteine-Rich*) se describió a comienzos de 1990, luego de la identificación de una serie de receptores que contenían uno o varios dominios extracelulares homólogos al dominio C-terminal rico en cisteínas (Cys) del RS-AI

expresado en macrófagos (un receptor RS-A) [Freeman et al., 1990]. Dado que algunos miembros de la SF-SRCR tienen funciones de RS, se ha generado cierta confusión entre ambos grupos/familias de receptores, siendo oportuno aclarar ambos conceptos. Así, como se mencionó previamente, los RS se definen actualmente como aquellas glicoproteínas (solubles o de membrana) involucradas en el reconocimiento y/o endocitosis de moléculas poli-aniónicas, ya sean de origen endógeno o exógeno [Sarrías et al., 2004a]. Sin embargo, no se ha identificado hasta el momento un dominio proteico en particular que confiera actividad *scavenger*, por lo que constituyen una familia funcional de receptores sin relaciones estructurales [Gough & Gordon, 2000]. En contraposición, los miembros de la SF-SRCR, si bien están estructuralmente muy relacionados, comparten escasas funciones.

Actualmente, la SF-SRCR está compuesta por más de 30 miembros (secretados y/o de membrana) que muestran ser filogenéticamente muy antiguos y altamente conservados; a la vez que pueden pertenecer a diversas clases de RS. Los dominios SRCR están compuestos por 90-110 aminoácidos y se caracterizan por un alto, y bien definido, contenido de Cys [Martínez et al., 2011]. Asimismo, estos dominios pueden clasificarse en 2 grupos: los SRCR de tipo A son aquellos codificados por al menos 2 exones y contienen 6 residuos de Cys que forman 3 enlaces disulfuro intradominio; y los SRCR de tipo B se caracterizan por estar codificados por un único exón y contener 8 residuos de Cys que forman 4 enlaces disulfuro intradominio. En ambos casos, las posiciones relativas de las Cys son constantes y establecen patrones fijos de enlaces disulfuro [Resnick et al., 1996]. Cabe destacar que, hasta la fecha, no se ha reportado la coexistencia de dominios SRCR de tipo A y de tipo B dentro de un mismo receptor; por ello, a estos últimos se los puede agrupar según contengan SRCR de tipo A (**Figura 1.3.**) o de tipo B (**Figura 1.4.**).

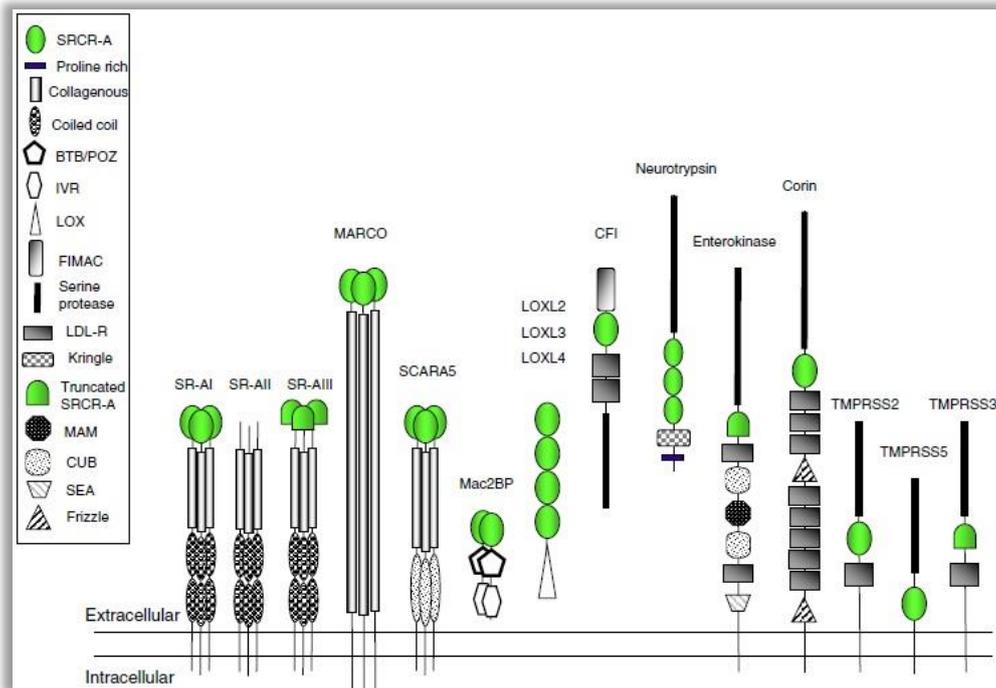


Figura 1.3. Representación esquemática de los SRCR de grupo A humanos. Se representan todos los SRCR de clase A humanos, los distintos dominios de proteínas o carbohidratos se encuentran codificados en la figura. [Martínez et al., 2011].

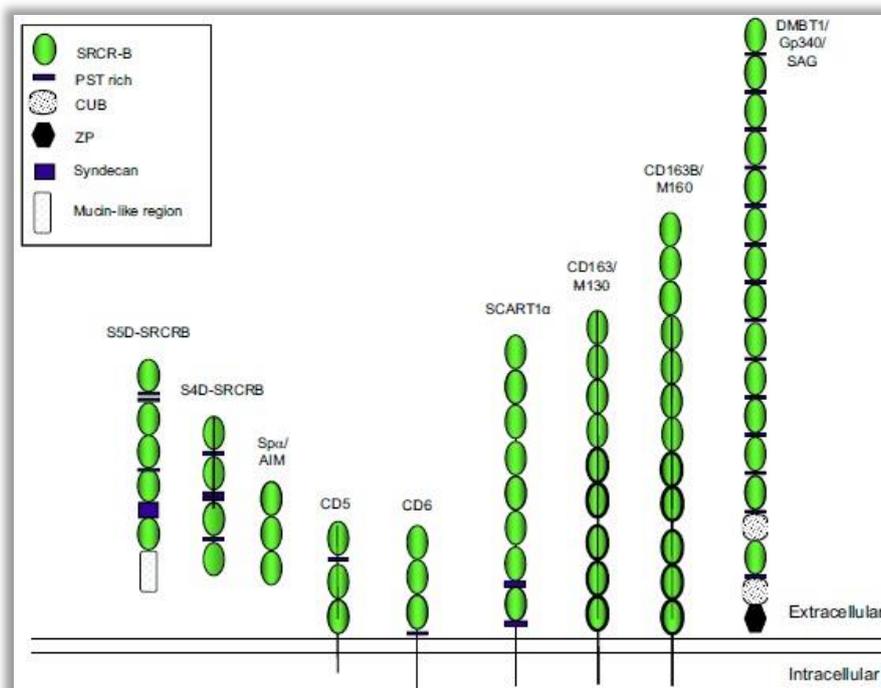


Figura 1.4. Representación esquemática de los SRCR de grupo B humanos. Se representan todos los SRCR de clase B humanos, los distintos dominios de proteínas o carbohidratos se encuentran codificados en la figura. [Martínez et al., 2011].

1.2.2. Miembros de la SF-SRCR capaces de reconocer patógenos.

Desde un punto de vista funcional, actualmente se plantea que los dominios SRCR estarían involucrados en interacciones de tipo proteína-proteína, tanto homo- como hetero-típicas [Bowdish & Gordon, 2009]. Algunos miembros de la SF-SRCR han sido involucrados en el desarrollo del sistema inmune y en la regulación de sus respuestas innatas y adaptativas [Aruffo et al., 1997; Chappell et al., 2015; Sanjurjo et al., 2015]; mientras que existe evidencia sobre otros miembros con capacidad de reconocer ligandos microbianos [Martínez et al., 2011]. Por ello, a continuación, se describen muy brevemente los nueve miembros de la SF-SRCR capaces de reconocer estructuras microbianas.

MARCO. Es una glicoproteína de membrana trimérica en su forma nativa, donde cada monómero consta de cinco regiones: una cola citoplasmática N-terminal corta, una región transmembrana, un dominio espaciador, una región involucrada en la trimerización de proteínas y un dominio SRCR de grupo A en su extremo C-terminal (**Figura 1.3.**). La expresión de MARCO en tejidos murinos se localiza en macrófagos de la interfaz entre la pulpa roja y la pulpa blanca del bazo, conocidos como macrófagos de la zona marginal, y también de la región medular de los ganglios linfáticos. Por su parte, los estudios sobre la expresión de MARCO en tejidos humanos mostraron su distribución en macrófagos de varios tipos tisulares. Entre las principales funciones de este receptor se encuentra su rol en la unión y fagocitosis de patógenos bacterianos [Martínez et al., 2011, Mukouhara et al., 2011, Novakowski et al., 2016, Kang et al., 2020]; así como también se ha visto involucrado en el reconocimiento e internalización de virus a través de su dominio SRCR [Li et al., 2023].

SR-AI. Es una glicoproteína de superficie de 220 kDa, trimérica de tipo II e identificada inicialmente como receptor para LDL en pulmón bovino. La proteína trimérica consta de tres subunidades idénticas de 77 kDa, cada una conteniendo un dominio N-terminal intracelular, una región transmembrana, un dominio espaciador, un dominio helicoidal seguido de un dominio tipo colágeno, y un dominio SRCR en el extremo C-terminal que es específico-de-isoforma; siendo de tipo A para SR-AI (**Figura 1.3.**). Tal como se comentó anteriormente, existen tres variantes de *splicing* para este receptor que dan lugar a la formación de SR-AI, SR-AII y SR-AIII, respectivamente. SR-AI se expresa principalmente en macrófagos, incluidas las células de Kupffer en el

hígado y los macrófagos alveolares. Además de estar involucrado en la aterogénesis, SR-AI también se ha implicado en funciones homeostáticas de los macrófagos, como la adhesión a la matriz extracelular. La eliminación de células apoptóticas por macrófagos fagocíticos, y de partículas inhaladas por parte de macrófagos alveolares, también parece estar mediada por SR-AI. Por último, en lo que respecta a su capacidad de reconocimiento de patógenos, se ha demostrado que SR-AI es capaz de unir y mediar eficazmente la fagocitosis de varios patógenos bacterianos [Martínez et al., 2011].

CD163. Es una glicoproteína transmembrana de tipo I específica de macrófagos, identificada en varias especies [Fabriek et al., 2005]. Estructuralmente, tiene un ectodominio que consta de 9 dominios SRCR en tándem (todos de tipo B), un dominio transmembrana y una cola citoplásmica intracelular que está sujeta a variantes de *splicing* alternativo, conteniendo su isoforma principal 49 aminoácidos (**Figura 1.4.**). CD163 es una proteína específica de monocitos/macrófagos y su expresión está fuertemente regulada, positivamente, por inductores antiinflamatorios (como glucocorticoides e IL-10); a la vez que negativamente, por agentes proinflamatorios (como LPS, TNF- α e IFN- γ). Esta proteína está involucrada en el metabolismo del hierro por su capacidad de unir y mediar la endocitosis del complejo hemoglobina-haptoglobina. Además, es capaz de actuar como receptor de reconocimiento para patrones moleculares de bacterias, tanto Gram-positivas como Gram-negativas [Martínez et al., 2011, Plevriti et al., 2024], así como también estaría involucrado en el reconocimiento de motivos virales [Gao et al., 2022, Liu et al., 2024].

CD5L. Esta proteína es conocida también como Sp α , Api6 y AIM (en este último caso, su homólogo murino), y contiene dominios SRCR de tipo B. CD5L posee una señal secretoria seguida de tres dominios SRCR en tándem (**Figura 1.4.**); una estructura muy similar a la de CD5 y CD6, otros miembros de la SF-RSCR capaces de reconocer estructuras microbianas. La expresión de CD5L en humanos se encuentra principalmente restringida a tejidos linfoides (bazo, ganglios linfáticos, timo, médula ósea e hígado fetal), pero está ausente en leucocitos de sangre periférica. Por el contrario, la expresión de AIM murina se restringe a macrófagos tisulares, aunque sólo una fracción de estos expresa la proteína [Miyazaki et al., 1999]. En este sentido, existen subpoblaciones de macrófagos que expresan AIM en sitios inflamados y en corteza tímica; sugiriendo que AIM participa tanto en la regulación de la respuesta

inflamatoria como en el desarrollo de timocitos. Además, tanto CD5L (humanos) como AIM (ratones) se encuentran solubles en circulación sanguínea [Gebe et al., 2000; Sarrias et al., 2004b], y CD5L es capaz de unirse a células mieloides en reposo, a monocitos de sangre periférica y a células B y T [Gebe et al., 1997]. Al igual que otros miembros de la SF-SRCR, CD5L también puede actuar como receptor de reconocimiento microbiano dada su capacidad de unir LPS y LTA bacteriano, así como también mananos y β -glucanos fúngicos [Sarrias et al., 2005; Martínez et al., 2014]. Estudios recientes demuestran que la administración intravenosa de CD5L ofrece protección en un modelo murino de shock séptico conteniendo la diseminación bacteriana, a la vez que reduce los niveles de endotoxinas y de patrones moleculares asociados a daño [Oliveira et al., 2024].

SALSA. Es una glicoproteína soluble y/o de membrana, también conocida como DMBT1 (*Deleted in Malignant Brain Tumors 1*), gp340 o SAG (*Salivary AGglutinin*), que presenta una estructura con 12-15 dominios SRCR (dependiendo de la variante de *splicing* alternativo) en tándem, todos del tipo B, separados por tramos de 20-23 aminoácidos. Además, también contiene dominios CUB y ZP (**Figura 1.4**). La expresión de SALSA se ha reportado en varios tipos tisulares diferentes, principalmente en pulmón, tráquea, glándula salival, intestino delgado y estómago, así como también en células del sistema inmune; incluyendo células T y B, bazo, timo, ganglios linfáticos, médula ósea y macrófagos alveolares [Martínez et al., 2011]. Entre las distintas funciones reportadas para SALSA se encuentra la modulación de la respuesta inmune innata, de la inflamación y de la homeostasis epitelial, principalmente mediante la unión concomitante de microorganismos y ligandos leucocitarios y epiteliales. Dichos ligandos incluyen a la IgA secretoria, a la lactoferrina y a diversas proteínas del sistema complemento. Los dominios SRCR de SALSA son clave para su interacción con ligandos bacterianos [Reichhardt et al., 2020].

SCARA5. Es una glicoproteína transmembrana de tipo II con alta homología respecto a SR-AI/II [Jiang et al., 2006]. Estructuralmente es similar a SR-AI/II y MARCO, ya que contiene un dominio N-terminal corto, un dominio transmembrana, una región espaciadora, un dominio de tipo colágeno y un dominio SRCR de tipo A en su extremo C-terminal (**Figura 1.3**). La región de tipo colágeno sería determinante para la formación de trímeros proteicos, de manera similar a lo que ocurre para SR-AI/II y

MARCO. Sin embargo, en contraste con estos dos receptores, SCARA5 no se expresa en macrófagos, sino que lo hace en testículos, vejiga, tráquea, glándula suprarrenal, piel, pulmón y ovario. SCARA5 parecería estar implicado en la homeostasis epitelial, tiene capacidad de unión a bacterias y se encuentra involucrado en el metabolismo del hierro al unirse a la ferritina y al complejo hemoglobina-haptoglobina [Martínez et al., 2011].

SSc5D. Es una glicoproteína soluble constituida por cinco dominios SRCR de tipo B (**Figura 1.4.**). Su patrón de expresión es restringido, expresándose en monocitos/macrófagos, linfocitos T y células epiteliales de placenta, bazo y colon [Gonçalves et al., 2009]; también puede encontrarse en suero y sus niveles aumentan en condiciones inflamatorias [Balakrishnan et al., 2014]. SSc5D también es capaz de actuar como receptor de reconocimiento de patrones microbianos, particularmente bacterianos, siendo capaz de unirse tanto a *L. monocytogenes* como a distintas cepas de *E. coli*, permitiendo en este último caso, discriminar entre cepas patógenas de no patógenas [Bessa-Pereira et al., 2016]. Este receptor también estaría involucrado en la correcta función placentaria [Gonçalves et al., 2009] y estudios recientes muestran que se encuentra disminuido en exosomas plasmáticos obtenidos a partir de pacientes infectados con *M. tuberculosis*, sugiriendo que estaría involucrado en mecanismos de evasión del sistema inmune [Biadglegne et al., 2022].

CD5 y CD6. Los receptores CD5 y CD6 son glicoproteínas de membrana de 67 kDa y 105-130 kDa, respectivamente, con ectodominios compuestos exclusivamente por tres dominios SRCR de tipo B en tándem, una región transmembrana y una cola citoplasmática adaptada para la señalización intracelular [Sarrias et al., 2004a] (**Figura 1.4.**). La homología que presentan entre sí no solo es importante desde un punto de vista estructural, sino también en cuanto a sus perfiles de expresión y a sus propiedades funcionales, ya que ambos receptores se expresan principalmente en timocitos desde las etapas tempranas de maduración, en linfocitos T maduros y en la subpoblación de linfocitos B1a; estando siempre físicamente asociados al TCR o al BCR según corresponda. Así, su localización sugiere que ambos receptores estarían bien posicionados para regular señales inducidas mediante reconocimiento antígeno-específico [Martínez et al., 2011].

Al igual que otros miembros de la SF-SRCR, los receptores CD5 y CD6 tienen la capacidad de reconocer ligandos microbianos. El ectodominio de CD6 (pero no el de

CD5) es capaz de unir LPS presente en bacterias Gram-negativas, así como LTA y PGN de bacterias Gram-positivas; y, de hecho, la afinidad de la interacción CD6-LPS mostró ser equivalente a la reportada para CD14 [Sarrias et al., 2007]. Por otro lado, el ectodominio de CD5 (pero no el de CD6) es capaz de interactuar con motivos β -glucanos presentes en las paredes de hongos saprófitos y patógenos, exhibiendo una afinidad de unión equivalente a la reportada para Dectina-1 [Vera et al., 2009]. Ambos ectodominios son capaces de inducir agregación microbiana (fúngica en el caso de CD5 y bacteriana en el de CD6), lo cual podría facilitar la eliminación de los patógenos de la circulación por parte de células fagocíticas. Asimismo, se describió que la unión de los ligandos microbianos a las formas unidas a membrana de CD5 y CD6 inducen señales de activación intracelular [Sarrias et al., 2007; Vera et al., 2009].

Por otro lado, además de hongos y bacterias, los ectodominios de CD5 y CD6 han mostrado capacidad para reconocer ligandos virales. En este sentido, CD5 sería un receptor clave para la invasión de linfocitos T humanos por HCV [Sarhan et al., 2012], mientras que, resultados preliminares sugieren que, CD6 sería capaz de interactuar con la proteína gp120 de HIV-1 [Carrasco et al., 2014]. Finalmente, nuestro grupo ha reportado que ambos receptores son también capaces de detectar componentes parasitarios, específicamente estructuras presentes en el tegumento de PSC de *E. granulosus* s.l. [Mourglia-Ettlin et al., 2018].

Así, y aunque aún no existen reportes al respecto, cabría suponer que la interacción de CD5 y CD6 con sus ligandos microbianos tendría consecuencias funcionales importantes en linfocitos T y B1a mediante modulación o interferencia de la señalización antígeno-específica; un fenómeno ampliamente reportado para otros receptores innatos [Netea et al., 2004; Caron et al., 2005; Yanaba et al., 2009]. Sin embargo, la relevancia práctica de la capacidad exhibida por CD5 y CD6 de reconocer antígenos microbianos se ha evidenciado luego de observar que, la infusión de las formas recombinantes solubles de sus ectodominios de origen humanos (denominadas rshCD5 y rshCD6), tiene efectos beneficiosos en diversos modelos murinos de infección. Así, mientras rshCD6 ha mostrado interesantes funciones profilácticas y terapéuticas en modelos murinos de infecciones bacterianas [Sarrias et al., 2007; Martínez-Florensa et al., 2014; Martínez-Florensa et al., 2016, Martínez-Florensa et al.,

2018], rshCD5 ha mostrado funciones equivalentes en modelos murinos de infecciones fúngicas [Vera et al., 2009; Velasco-de-Andrés et al., 2020].

En este sentido, resulta particularmente importante para el desarrollo de la presente tesis destacar que, tanto rshCD5 como rshCD6, mostraron funciones profilácticas significativas en el modelo murino de EQ secundaria; ya que su infusión pre-inoculación de PSC redujo la proporción de ratones efectivamente infectados, así como el número de quistes hidáticos desarrollados y la carga parasitaria total por ratón [Mourglia-Ettlin et al., 2018]. Desde un punto de vista mecanístico, estos efectos profilácticos podrían atribuirse, por un lado, a una inmunomodulación inducida mediante el bloqueo de componentes parasitarios claves presentes en el tegumento de los PSC. En este sentido, la adición de rshCD5 o rshCD6 a cultivos de células peritoneales murinas estimuladas con antígenos tegumentarios mostró una alteración, potencialmente beneficiosa para el hospedero, en el perfil de citoquinas inducido [Mourglia-Ettlin et al., 2018]. Además, mediante estudios proteómicos de interactomas, se identificaron posibles ligandos parasitarios para rshCD5 y/o rshCD6 presentes en el tegumento de PSC [Miles et al., 2020b]; muchos de los cuales fueron reportados previamente como importantes blancos terapéuticos contra *E. granulosus* s.l., ya sea como candidatos vacunales y/o como dianas farmacológicas. Por otro lado, los mencionados efectos profilácticos observados tras la infusión de rshCD5 o rshCD6 en el modelo murino de EQ secundaria, también podrían atribuirse a las acciones antiparasitarias intrínsecas recientemente reportadas *in vitro* para ambas proteínas recombinantes [García-Luna et al., 2024].

1.3. Péptidos sintéticos como agentes terapéuticos.

Los péptidos son biomoléculas compuestas por hasta 50 aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces de tipo peptídico. Al igual que las proteínas, son ubicuos en toda la biología y están involucrados en una amplia gama de funciones celulares y fisiológicas, con estructuras a veces muy complejas capaces de exhibir diferentes conformaciones dependiendo de su secuencia aminoacídica y de su entorno.

En cuanto agentes terapéuticos, los péptidos están ganando cada vez más atención por diversos motivos. Por un lado, en términos de producción, su síntesis generalmente

puede realizarse de manera automatizada en sistemas no-biológicos, resultando relativamente sencillo el control de su pureza. Por otro lado, los medicamentos basados en péptidos ofrecen normalmente un alto grado de especificidad atribuido a la complejidad de sus estructuras, tanto en la forma lábil del péptido “solo” como en sus potenciales estructuras cuaternarias al interactuar con su(s) blanco(s) terapéutico(s). Así, su toxicidad tiende a ser generalmente baja gracias a su alta especificidad y a que se metabolizan fácilmente liberando los aminoácidos que los componen como producto de degradación. Además, la aceptación generalizada de la terapéutica con los mismos por parte de médicos y pacientes ha intensificado aún más el interés de las compañías farmacéuticas para su desarrollo, haciendo que algunos medicamentos basados en péptidos actualmente aprobados y disponibles en el mercado se consideren casos de éxito en farmacoeconomía [Da-Costa et al., 2015; de-la-Fuente-Núñez et al., 2017].

Los medicamentos basados en péptidos actualmente aprobados para terapéutica humana abarcan un amplio abanico de acciones farmacológicas, como, por ejemplo: inhibidores enzimáticos, agonistas/antagonistas hormonales, analgésicos, antibióticos, antivirales, etc. [da-Costa et al., 2015]. Por su parte, a nivel experimental se ha puesto un gran foco en el desarrollo de péptidos con actividades antimicrobianas e inmunomoduladoras, ya que la aparición de patógenos resistentes a tratamientos clásicos es un desafío por demás interesante para el uso de medicamentos basados en este tipo de biomolécula. Así, se han logrado importantes avances en el campo de los péptidos antibacterianos [Mansour et al., 2015; Pfalzgraff et al., 2018; Lei et al., 2019], antifúngicos [Pertinhez et al., 2018; Galgóczy et al., 2019; Nikapitiya et al., 2020] y antivirales [Liu et al., 2013; Kazmirchuk et al., 2017; John et al., 2019]; y muy tímidamente en el área antiparasitaria [Vizioli & Salzet, 2002; Maciel et al., 2008].

El principal desafío en el desarrollo de péptidos como agentes terapéuticos radica en la estrategia utilizada para la selección de estructuras candidatas, ya que las estrategias reportadas son muy variadas y van desde el diseño racional *in silico* hasta el *screening* sistematizado utilizando bibliotecas de péptidos con secuencias aleatorias. En este aspecto, una estrategia relativamente poco explorada para la selección de péptidos candidatos con potencial antimicrobiano (incluyendo antibacterianos, antivirales, antifúngicos y/o antiparasitarios), se basa en el uso de la secuencia aminoacídica de receptores inmunes capaces de reconocer estructuras de patógenos. Así, mediante

diversas estrategias se podrían identificar péptidos derivados de dichas secuencias que retengan la capacidad de reconocimiento, y que, por lo tanto, pudiesen actuar al menos como agentes bloqueantes para dichos patógenos.

1.3.1. Los RS como fuente de péptidos con acciones terapéuticas.

Los RS serían un interesante grupo de inmunoreceptores a analizar dado su amplio y diverso abanico de ligandos microbianos [Zani et al., 2015]; y en particular, la SF-SRCR sería de gran relevancia dada la evidencia existente en cuanto a la capacidad que tienen algunos de sus miembros para reconocer ligandos microbianos. Como se mencionó previamente, ejemplos de dichos receptores serían MARCO, SR-AI, CD163, CD5L, CD5, CD6, CD163, SALSA, SCARA5 y SSc5D [Martínez et al., 2011], y, de hecho, para algunos de ellos, sus propiedades de unión a estructuras de patógenos han sido previamente mapeadas con precisión dentro de sus dominios SRCR. En este sentido, el caso prototípico de la SF-SRCR sería el receptor SALSA, que como se mencionó anteriormente, es una glicoproteína soluble que contiene 12-15 dominios SRCR de tipo B, y cuyas propiedades de unión a componentes bacterianos se han mapeado dentro de los mismos en una secuencia consenso de 11 aminoácidos (GRVEVLYRGSW) denominada *pbs1* (del inglés, *pathogen binding site 1*). Dicha secuencia se compone de un motivo de 9 aminoácidos (VEVLxxxxW) identificado en 13 de sus 15 posibles dominios SRCR [Bikker et al., 2004]. De manera interesante, cabe mencionar que estudios similares de mapeo se han realizado también para los receptores MARCO [Elomaa et al., 1998; Brännström et al., 2002], CD163 [Fabriek et al., 2009] y CD5 y CD6 [Martínez-Florensa et al., 2018].

En este sentido, y en base a la relevancia práctica antes mencionada para los receptores CD5 y CD6, cabe destacar que los péptidos homólogos a *pbs1* derivados de los dominios SRCR de CD6 han mostrado afinidades de unión con motivos bacterianos similares a la observada para rshCD6 (proteína compuesta por los tres dominios SRCR que conforman el ectodominio de CD6). Sin embargo, solo el péptido mapeado en el dominio SRCR 3 (el más proximal del receptor) exhibió propiedades funcionales importantes, tales como aglutinación bacteriana *in vitro* y mejora de la supervivencia de ratones con sepsis polimicrobiana experimental; tanto al utilizarse como agente profiláctico o terapéutico [Martínez-Florensa et al., 2018]. Además, por otro lado,

nuestro grupo analizó la capacidad de unión a componentes del tegumento de PSC de *E. granulosus* s.l. por parte de los homólogos a *pbs1* derivados de los tres dominios SRCR de CD5 y de CD6, y reportó que los mismos retienen, parcialmente, el perfil de ligandos parasitarios. En particular, mediante estudios proteómicos de interactomas obtenidos de ensayos de tipo *pull-down*, se identificaron 45 proteínas parasitarias diferentes en los interactomas obtenidos a partir de los 6 péptidos homólogos a *pbs1* presentes en CD5 y CD6; siendo muchas de ellas identificadas también en ensayos análogos realizados en paralelo con rshCD5 y rshCD6 [Miles et al., 2020b]. Por lo tanto, los péptidos homólogos a *pbs1* derivados de CD5 y CD6, al igual que los presentes en otros miembros de la SF-SRCR capaces de reconocer estructuras microbianas, merecerían ser blanco de estudios funcionales adicionales tendientes a evaluar su potencial valor como agentes profilácticos y/o terapéuticos en el modelo murino de EQ secundaria.

2. HIPÓTESIS

Los RS CD5 y CD6 son capaces de reconocer componentes presentes en el tegumento de PSC de *E. granulosus* s.l., y la infusión de sus formas recombinantes solubles (rshCD5 y rshCD6) induce acciones profilácticas en el modelo murino de EQ secundaria. En este sentido, la evidencia existente sugiere que dichos efectos podrían atribuirse tanto a la inducción de inmunomodulación mediante bloqueo de componentes parasitarios clave, así como a posibles acciones antiparasitarias intrínsecas ejercidas por rshCD5 y rshCD6. Por otro lado, péptidos sintéticos derivados de los dominios SRCR de CD5 y CD6 homólogos a la secuencia aminoacídica *pbs1*, tienen capacidad de unión a componentes parasitarios presentes en el tegumento de PSC de *E. granulosus* s.l., y, de hecho, muchos de dichos componentes serían los mismos ligandos parasitarios de rshCD5 y rshCD6.

Por todo ello, nuestra **hipótesis de trabajo** plantea que *el uso de péptidos sintéticos derivados de la estructura primaria de los dominios SRCR presentes en miembros de la SF-SRCR capaces de reconocer componentes microbianos, sería de utilidad profiláctico/terapéutica al retener la capacidad de reconocimiento de patógenos microbianos de sus RS de origen. De esta forma, la administración exógena de dichos péptidos permitiría modular la respuesta antiparasitaria en el modelo murino de EQ secundaria.* Así, los resultados preclínicos a obtener permitirán postular el potencial uso de péptidos sintéticos previo a la cirugía de remoción de quistes hidáticos en pacientes con EQ, con el objetivo de disminuir las altas tasas de recidivas postquirúrgicas reportadas.

3. OBEJETIVOS

3.1. Objetivo general.

Evaluar el potencial antiparasitario e inmunomodulador de péptidos sintéticos derivados de la secuencia aminoacídica de RS capaces de reconocer estructuras microbianas; haciendo uso de *E. granulosus* s.l. como modelo de estudio.

3.2. Objetivos específicos.

1. Identificar *in silico* péptidos homólogos a la secuencia *pbs1* presentes en la estructura primaria de los receptores MARCO, SR-AI, CD163, CD5L, CD5, CD6, SALSA, SCARA5 y SSc5D.
2. Analizar *in vitro* el perfil de biocompatibilidad de los péptidos sintéticos sobre sistemas celulares de origen murino.
3. Evaluar la actividad antiparasitaria *in vitro* de los péptidos sintéticos utilizando PSC de *E. granulosus* s.l.
4. Caracterizar *in vitro* los efectos inmunomoduladores de los péptidos sintéticos sobre cultivos celulares estimulados con antígenos parasitarios.
5. Diseñar péptidos de tipo tándem a partir de secuencias homólogas a *pbs1* y evaluar *in vitro* su potencial antiparasitario e inmunomodulador.
6. Evaluar *in vivo* los efectos profilácticos e inmunomoduladores de los péptidos sintéticos utilizando el modelo murino de EQ secundaria.

Capítulo 2.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Identificación de secuencias homólogas a *pbs1*.

La identificación de secuencias homólogas al péptido consenso 11-mer *pbs1* GRVEVLYRGSW [Bikker et al., 2004] presentes en los dominios *SRCR* de los RS MARCO, SR-AI, CD163, CD5L, CD5, CD6, SALSA, SCARA5 y SSc5D, se realizó mediante el siguiente flujo de trabajo bioinformático. En primer lugar, se buscaron en la base de datos de genomas *Ensembl* (EMBL-EBI, <https://www.ensembl.org/>) los genes codificantes para los correspondientes receptores humanos según su nombre; y partiendo de los resultados obtenidos, se seleccionaron aquellos cuyas secuencias estuvieran verificadas en la base de datos de secuencias no redundantes *RefSeq* (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>).

A continuación, se descargaron las secuencias mencionadas y tomando como referencia la secuencia de *pbs1*, se procedió a buscar y localizar de forma manual, secuencias con características similares; como, por ejemplo, la longitud y la posición de ciertos aminoácidos conservados (en particular VEVLxxxxW, donde x corresponde a cualquier aminoácido, [Bikker et al., 2004]). Luego, utilizando la base de datos de dominios conservados *Conserved Domain Database* (CDD, NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>), se verificó que efectivamente las secuencias peptídicas seleccionadas se localizasen dentro de los dominios *SRCR* de los receptores en estudio. Posteriormente, se analizaron manualmente las secuencias en detalle registrando cuál aminoácido ocupaba cada posición, de forma tal que las secuencias idénticas se contabilizasen una única vez.

2.2. Diseño de péptidos con secuencias en tándem.

Partiendo de las secuencias homólogas a *pbs1* identificadas, se diseñaron para cada RS, secuencias lineales 35-mer en formato tándem. En este caso, y según el número de secuencias homólogas a *pbs1* identificadas en cada receptor, estos se

agruparon en tres categorías: (i) receptores con una única secuencia homóloga, (ii) receptores con tres secuencias homólogas distintas, y (iii) receptores con más de tres secuencias homólogas distintas.

Las secuencias peptídicas en tándem se diseñaron de forma que contuviesen tres secuencias homólogas a *pbs1* (distintas o idénticas según la categoría del receptor), espaciadas entre sí por un residuo de Prolina. Así, para los receptores de la categoría (i), sus tándems correspondieron a una única secuencia homóloga a *pbs1* repetida tres veces; mientras que para los receptores de la categoría (ii), sus tándems correspondieron a la secuencia lineal de los tres homólogos a *pbs1* identificados. Por último, para los receptores de la categoría (iii) se diseñaron varios tándems 35-mer, cada uno de ellos conteniendo la secuencia lineal de tres homólogos a *pbs1* distintos identificados. Esquemáticamente, las secuencias en tándem (35-mer) tuvieron el siguiente formato general:

(homólogo 1, 11-mer) → Pro → (homólogo 2, 11-mer) → Pro → (homólogo 3, 11-mer)

2.3. Caracterización bioinformática y modelado estructural de los péptidos.

El análisis de frecuencia para los distintos residuos aminoacídicos presentes en cada posición de las secuencias peptídicas se realizó utilizando el software WebLogo (<https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>), mientras que la diversidad de secuencias presentes (identidad y similitud) se evaluó aplicando el software LALIGN (www.ebi.ac.uk/Tools/psa/lalign/). Por su parte, el modelado tridimensional de las estructuras peptídicas se realizó utilizando el software PEPFold3 (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD3/>) [Lamiable et al., 2016]. En todos los casos, se aplicaron los parámetros incluidos por defecto en cada software.

2.4. Reactivos químicos generales.

Los reactivos químicos utilizados, incluyendo solventes orgánicos, fueron todos de nivel analítico y provinieron de las marcas Dorwil (Argentina) o Sigma (USA), salvo que se indique lo contrario.

2.5. Síntesis, solubilización y almacenamiento de péptidos.

Los péptidos seleccionados se sintetizaron a nivel comercial (Beijing SBS Genetech Co., Ltd., China), obteniéndolos en forma liofilizada con alta pureza ($\geq 90\%$). Una vez recibidos, se solubilizaron y almacenaron en condiciones estables para su uso posterior.

En primer lugar, y con el objetivo de optimizar el protocolo de solubilización, los péptidos se clasificaron según sus características fisicoquímicas, tales como carga y carácter ácido-base. Luego, se ensayaron distintos diluyentes (agua, NH_4HCO_3 y DMSO), y se estableció de forma empírica, una estrategia de solubilización adecuada. Brevemente, para determinar la carga, se asignó inicialmente un valor de -1 por cada residuo aminoácido de carácter ácido (Asp, Glu y extremo C-terminal) y +1 por cada residuo de carácter básico (Arg, Lys, His y extremo N-terminal), para luego calcular la carga neta del péptido. Para los péptidos ácidos (carga neta <0), se ensayó agua (500 μL) como primer solvente utilizando 1 mg de péptido. En caso de no lograr su solubilización, se adicionaron 100 μL de NH_4HCO_3 100 mM, y, de ser necesario aún, se adicionaron finalmente 100 μL de DMSO. En el caso de los péptidos básicos (carga neta >0), también se ensayó agua (500 μL) como primer solvente utilizando 1 mg de péptido, y en caso de ser necesario, se adicionaron luego 100 μL de DMSO. Por último, para los péptidos neutros (carga neta $=0$), se ensayó DMSO (100 μL) como primer solvente utilizando 1 mg de péptido, y, posteriormente, se llevó a volumen final con agua.

Finalmente, los péptidos solubilizados (rango de concentraciones finales: 1,4-2,0 mg/mL) se filtraron por membrana de 0,22 μm bajo campana de flujo laminar para asegurar su esterilidad; y se almacenaron a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ en alícuotas listas para usar.

2.6. Parásitos y Ratones.

La obtención de PSC de *E. granulosus* s.l. se realizó mediante la punción aséptica de quistes hidáticos fértiles de origen pulmonar bovino [Baz et al., 1995]. Una vez obtenidos, los PSC se lavaron con buffer fosfato salino (PBS) pH 7,2 conteniendo gentamicina (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y posteriormente se determinó su viabilidad mediante tinción (exclusión) con eosina 0,5% (m/v) [Dematteis et al., 2003]. Se utilizaron lotes de PSC

con diversa viabilidad según los requerimientos de cada actividad, tal y como se describe en los protocolos correspondientes.

Los ratones utilizados, salvo que se aclare lo contrario, se correspondieron con hembras normales de la cepa endogámica Balb/c de 8-12 semanas de edad. Estos se adquirieron del Bioterio de Cría de la Dirección de Laboratorios Veterinarios “Dr. Miguel Rubino” (DI.LA.VE.) del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP); y posteriormente, se mantuvieron en el Laboratorio de Experimentación Animal del Área Inmunología en el Instituto de Higiene (Universidad de la República) bajo condiciones reguladas y controladas de luz/oscuridad (ciclos de 12h/12h) y temperatura (21°C), alimentándose *ad libitum* con ración y agua esterilizadas.

Las actividades con animales de experimentación se realizaron conforme a la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (C.H.E.A., Universidad de la República), siguiendo la Ley Nacional Uruguay N°18.611. Los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética para el Uso de Animales (Facultad de Química, Universidad de la República), con número de aprobación de protocolo 101900-001214-17 (www.expe.edu.uy).

2.7. Actividad hemolítica de los péptidos.

La potencial toxicidad de los péptidos sintéticos se evaluó inicialmente mediante la determinación de su actividad hemolítica (AH); en particular su AH₅₀ (concentración de péptidos que induce un 50% de lisis en una suspensión fresca de eritrocitos). Para ello, inicialmente se generó una suspensión de eritrocitos murinos frescos al 1% (v/v), partiendo de sangre fresca obtenida mediante punción del plexo retro-orbital de ratones hembra normales de la cepa exogámica CD-1 (12 meses de edad). Estos ratones se adquirieron del Bioterio de Cría del Instituto de Higiene (Universidad de la República). Una vez obtenida la sangre, se la mezcló inmediatamente con una solución de citrato de sodio (3,8% m/v) en relación 9:1 (sangre:citrato), y luego se centrifugó a 2.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C. A continuación, se descartó el plasma y se agregó un volumen equivalente de suero fisiológico isotónico, mezclando suavemente por inversión. Luego, se centrifugó la suspensión en las mismas condiciones antes descritas, y se descartó el suero fisiológico; repitiendo tres veces este proceso de lavado.

Posteriormente, para preparar la suspensión de eritrocitos frescos al 1% (v/v), se tomaron 180 μ L de pellet de células y se llevó a volumen final (18 mL) con suero fisiológico isotónico.

La AH de los péptidos se ensayó en placas de 96 pocillos de fondo en U (Deltalab, España), mezclando 180 μ L de la suspensión de eritrocitos con 20 μ L de solución de péptido a distintas concentraciones (rango final de trabajo: 1,6-100 μ g/mL). Como controles negativos y positivos de hemólisis, se utilizaron soluciones de PBS estéril y de SDS al 1% (v/v), respectivamente. Todas las condiciones se ensayaron al menos por triplicado, incubando la placa durante 1h a 37°C (sin agitación). Luego, se centrifugó la placa a 2.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C, se transfirieron 75 μ L del sobrenadante de incubación a placas de 96 pocillos de fondo plano, y se realizó la lectura de absorbancia a 560 nm (hemoglobina en solución), utilizando un espectrofotómetro para microplacas Titertek Multiscan Plus (Flow Laboratories, Helsinki, Finlandia). La AH de cada péptido, a cada concentración, se determinó siguiendo protocolos de referencia [Cibulski et al., 2016]:

$$AH (\%) = (Abs_{péptido} - Abs_{PBS}) / (Abs_{SDS} - Abs_{PBS})$$

2.8. Actividad citotóxica de los péptidos.

La potencial toxicidad de los péptidos sintéticos se evaluó también mediante la determinación de su actividad citotóxica (AC); en particular su AC₅₀ (concentración de péptido que reduce al 50% la viabilidad de un cultivo celular eucariota). En particular, se utilizó la línea celular RAW264.7 (TIB-71™). Esta línea, derivada de macrófagos murinos, se estableció originalmente partiendo de tumores de ratones Balb/c macho, inducidos mediante el uso del virus de la leucemia murina de Abelson (<https://www.atcc.org/>). Las células RAW264.7 se mantuvieron rutinariamente, hasta el pasaje 30, en cultivos a 37°C con atmósfera controlada de CO₂ 5% utilizando frascos T-25 (Greiner Bio-One, Austria), realizando cambios de medio cada 48-72 hs. El medio utilizado fue DMEM alto en glucosa (Sigma, USA) conteniendo estreptomycin (100 μ g/mL), penicilina (60 μ g/mL) y suero fetal bovino al 5% (v/v) (FBS, Capricorn, Alemania).

Los cultivos se repicaron rutinariamente al alcanzar confluencia; es decir, aproximadamente una vez por semana. Brevemente, las células se despegaron de forma mecánica mediante el uso de *scraper* (Greiner Bio-One, Austria) y el contenido de un frasco se trasvasó a un tubo cónico de 15 mL; se centrifugó a 1.200 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C, y, a continuación, se descartó el sobrenadante y se suspendió el *pellet* celular en 10 mL de PBS estéril. Luego, se realizó el recuento de células totales utilizando cámara de Neubauer, y se determinó el volumen de suspensión a tomar para el repique, de forma tal que el nuevo subcultivo tuviese 1×10^5 células totales. Estas se suspendieron en un nuevo frasco T-25 conteniendo 10 mL de medio DMEM completo, obteniéndose así un nuevo subcultivo.

La AC de los péptidos se ensayó directamente sobre cultivos de células RAW264.7, los cuales se incubaron con distintas concentraciones de cada uno de los péptidos en estudio. Brevemente, en placa de 96 pocillos de fondo plano (Greiner Bio-One, Austria) se sembraron 2×10^5 células en 200 μ L de medio DMEM completo, y se incubaron durante 24 hs a 37°C en atmósfera controlada de CO₂ al 5% (sin agitación). Luego, se retiró el medio y se agregaron distintas concentraciones de los péptidos a ensayar (rango final: 6,3-100 μ g/mL) diluidos en 200 μ L de medio DMEM completo. Como controles negativos y positivos de citotoxicidad, se utilizaron células en medio de cultivo y en presencia de DMSO 10% (v/v), respectivamente. Todas las condiciones se ensayaron al menos por triplicado y se incubaron durante 72 hs a 37°C en atmósfera controlada con CO₂ al 5% (sin agitación).

Luego, se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT, en el cual las células viables reducen, mediante acción de la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial, el bromuro de 3(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT) a cristales púrpuras -insolubles- de formazán [Ghasemi et al., 2021]. Para ello, brevemente, se retiró el sobrenadante de cultivo, se adicionaron 200 μ L por pocillo de MTT 0,5 mg/mL (Sigma, USA) en PBS estéril, y se incubó durante 4 hs a 37°C en atmósfera controlada con CO₂ al 5% (sin agitación). Luego, con precaución de no retirar los cristales de formazán, se descartó cuidadosamente el sobrenadante, se agregaron 200 μ L por pocillo de DMSO puro y se solubilizaron los cristales mediante agitación suave durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, se transfirieron 150 μ L de sobrenadante a una placa de 96 pocillos de fondo plano (Deltalab, España), y se

determinó la absorbancia a 560 nm utilizando un espectrofotómetro para microplacas Titertek Multiscan Plus (Flow Laboratories, Helsinki, Finlandia). La AC de cada péptido, a cada concentración, se determinó siguiendo protocolos de referencia [Cibulski et al., 2016]:

$$AC (\%) = (Ab_{SPéptido} - Ab_{SPBS}) / (Ab_{SDMSO} - Ab_{SPBS})$$

2.9. Ensayos de actividad protoscolicida: Cultivos axénicos.

Para analizar la potencial actividad protoscolicida intrínseca de los péptidos sintéticos en estudio, se realizaron cultivos axénicos de PSC de *E. granulosus* s.l. en presencia de los péptidos sintéticos, siguiendo protocolos reportados recientemente por nuestro grupo de trabajo [Miles et al., 2023]. En primer lugar, se resuspendieron los PSC en PBS estéril conteniendo estreptomycin (100 µg/mL), penicilina (60 µg/mL) y anfotericina B (250 ng/mL). Luego, en placas de 96 pocillos de fondo plano (Greiner Bio-One, Austria) se incubaron, en cada pocillo, 100 PSC con viabilidad $\geq 98\%$ en 100 µL de medio de incubación estéril, en presencia de concentraciones crecientes de los péptidos sintéticos en estudio (rango final: 0,3125 a 5 µM). Cada condición se analizó al menos por cuadruplicado.

Con el objetivo de evaluar los efectos de los péptidos sintéticos sobre los PSC en ausencia y en presencia de nutrientes, estos ensayos se realizaron utilizando tanto PBS como RPMI (Capricorn, Alemania) como medios de incubación, respectivamente; en ambos casos adicionando estreptomycin (100 µg/mL), penicilina (60 µg/mL) y anfotericina B (250 ng/mL). Asimismo, los cultivos en ausencia de nutrientes (PBS) se incubaron durante 48 hs a 37°C en atmósfera controlada de CO₂ al 5%, mientras que los cultivos en presencia de nutrientes (RPMI) se incubaron en las mismas condiciones, pero durante 5 días [Miles et al., 2023].

Una vez finalizados los cultivos, la viabilidad de los PSC se determinó mediante tinción con eosina siguiendo protocolos habituales [Dematteis et al., 1999], y la actividad protoscolicida se expresó normalizada respecto a los controles de viabilidad basal correspondientes (PBS o RPMI en ausencia de péptidos).

2.10. Ensayos de actividad protoscolicida: Cultivos celulares.

Además de la potencial actividad protoscolicida intrínseca de los péptidos sintéticos en estudio, se realizaron co-cultivos de PSC de *E. granulosus* s.l. con células RAW264.7, en presencia de los péptidos sintéticos. Para ello, en placa de 96 pocillos de fondo plano (Greiner Bio-One, Austria), se sembraron, por pocillo, 2×10^5 células RAW264.7 junto con 50 PSC (viabilidad inicial 100%) y 20 $\mu\text{g/mL}$ de péptidos sintéticos. Las incubaciones se realizaron en un volumen final de 200 μL de medio de cultivo DMEM alto en glucosa conteniendo estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$), penicilina (60 $\mu\text{g/mL}$) y suero fetal bovino al 5% (v/v); y se incubaron durante 72 hs a 37°C en atmósfera controlada de CO₂ al 5% (sin agitación). Como controles se utilizaron: (i) células RAW264.7 solas, (ii) PSC solos, (iii) células RAW264.7 junto con PSC, (iv) células RAW264.7 junto con PSC en presencia de LPS (0,1 $\mu\text{g/mL}$), y (v) PSC solos en presencia de LPS (0,1 $\mu\text{g/mL}$). Cada condición se analizó al menos por cuadruplicado.

Luego de 72 hs, se tomaron fotografías con aumento 10x de todas las condiciones ensayadas, utilizando un microscopio digital con cámara acoplada (Axiocam, ZEISS, Alemania) y su respectiva interfaz (ZEN, ZEISS, Alemania). Finalmente, los PSC se clasificaron siguiendo criterios morfológicos de integridad física, de acuerdo con protocolos desarrollados por nuestro grupo [Mourglia-Ettlin et al., 2016b], se calculó el porcentaje de PSC viables en cada condición y se normalizó el resultado final respecto del control (iii); es decir, células RAW264.7 junto con PSC.

2.11. Obtención de antígenos tegumentarios.

El extracto de proteínas del tegumento de PSC de *E. granulosus* s.l. se obtuvo siguiendo el protocolo originalmente descrito por Hernández & Nieto (1994), el cual ha sido ampliamente utilizado por nuestro grupo de trabajo [Mourglia-Ettlin et al., 2018; Miles et al., 2019; 2020; 2023]. Brevemente, se incubaron PSC con viabilidad $\geq 90\%$ en una solución de extracción de proteínas superficiales compuesta por el detergente zwitteriónico decanoil-N-metilglucamida (MEGA-10) al 1% (m/v) en PBS con EDTA 5 mM y PMSF 2 mM. La incubación se realizó siguiendo una relación de 125.000 PSC viables por cada 1 mL de solución de extracción, con rotación constante durante 2 hs a temperatura ambiente. El sobrenadante resultante se centrifugó y dializó

exhaustivamente contra PBS a temperatura ambiente para evitar la precipitación de MEGA-10.

A la fracción obtenida, denominada PSEx, se la filtró a través de membrana estéril de 0,22 μm , se le realizó cuantificación de contenido proteico y, finalmente, se la conservó en alícuotas a -20°C hasta su uso. La concentración proteica se determinó mediante el método del ácido bicinónico adaptado para el trabajo en placas de microtitulación (Kit QuantiPro BCA Assay, Sigma, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando una solución de albúmina sérica bovina (BSA) en PBS 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como cota superior de la curva estándar.

2.12. Interacción física entre antígenos tegumentarios y células murinas.

La interacción física de los componentes tegumentarios de PSC de *E. granulosus* s.l. con células inmunes murinas se analizó mediante ensayos de citometría de flujo siguiendo protocolos generales previamente reportados por nuestro grupo [Mourglia-Ettlin et al., 2018], utilizando PSEx conjugado covalente a FITC como sonda fluorescente y células de la línea RAW264.7 como modelo. Brevemente, el conjugado PSEx-FITC se obtuvo dializando 1 mg de PSEx contra buffer NaHCO_3 100 mM pH 9 y posteriormente incubándolo con 500 μg de FITC disuelto en DMSO. La mezcla se incubó durante 8 hs en oscuridad con agitación continua, se dializó exhaustivamente contra PBS, y, finalmente, el conjugado PSEx-FITC se almacenó en alícuotas - protegidas de la luz- a 4°C hasta su uso.

Para los ensayos de unión, en primer lugar, se optimizó la cantidad de PSEx-FITC a utilizar (0,1 μg , 1,0 μg y 10,0 μg), seleccionando aquella concentración que no generase una señal saturada. Luego, los ensayos de unión se realizaron incubando células RAW264.7 con la sonda PSEx-FITC en presencia de masas crecientes de cada uno de los péptidos sintéticos en estudio. Brevemente, se pre-incubó durante 1 h a 4°C (sin agitación) la sonda PSEx-FITC (2 μg) con distintas masas de péptidos (5, 20 y 50 μg) disueltos en una solución de PBS conteniendo BSA 0,1% (m/v) y NaN_3 0,02% (m/v). Luego, en una placa de 96 pocillos de fondo V (Deltalab, España), se dispensaron, por pocillo, 2×10^5 células RAW264.7 en 100 μL de PBS, y se centrifugaron a 1.200 r.p.m. durante 7 min a 4°C . A continuación, se descartaron los sobrenadantes, se

dispensaron 150 μ L por pocillo de las distintas condiciones previamente incubadas (PSEx-FITC + péptido), y se incubó la placa en oscuridad durante 30 min a 4°C (sin agitación). Posteriormente, se centrifugó la placa a 1.200 r.p.m. durante 7 min a 4°C, se realizó un lavado dispensando 100 μ L de PBS y se volvió a centrifugar la placa en las mismas condiciones. Luego de descartar el sobrenadante, las células se fijaron mediante incubación con 100 μ L de *FACS Buffer* (BectonDickinson®) conteniendo paraformaldehído 0,5% (v/v), y se almacenaron a 4°C en oscuridad durante toda la noche (sin agitación).

Finalmente, las células se adquirieron en un citómetro de flujo *FACSCalibur*® (Becton Dickinson) utilizando el software *CellQuest*®. El análisis de datos se realizó mediante el uso del software libre *Flowing Software* (www.flowingsoftware.btk.fi). La magnitud de la interacción entre las células RAW264.7 y la sonda PSEx-FITC, se determinó evaluando la media geométrica de la intensidad de fluorescencia en el canal FL-1, correspondiente a la fluorescencia de FITC.

2.13. Cultivos de PEC estimulados con PSEx.

Los efectos de los péptidos sintéticos sobre la interacción entre antígenos tegumentarios de PSC de *E. granulosus* s.l. y células inmunes murinas, se evaluó en sistemas de cultivo *in vitro*. En particular, se utilizaron cultivos de PEC murinas para evaluar los efectos sobre la producción de citoquinas y anticuerpos específicos y/o polireactivos, inducidas por antígenos tegumentarios de PSC. Las PEC se obtuvieron mediante lavado peritoneal manual. Para ello, la cavidad peritoneal de cada ratón se lavó al menos tres veces con 3 mL/ratón de PBS frío suplementado con FBS al 2% (v/v). Luego, las suspensiones celulares se centrifugaron a 1.200 r.p.m. durante 7 min a 4°C, y posteriormente, las células se trataron con buffer de lisis comercial (*Red Blood Cell Lysing Buffer*®, Sigma, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, las células se lavaron dos veces con PBS estéril, se resuspendieron en PBS estéril suplementado con FBS al 2% (v/v) y se contabilizaron mediante uso de cámara de Neubauer.

Para realizar los cultivos celulares, las PEC se resuspendieron en medio RPMI 1640 completo estéril (10% SFB, 50 μ M de β -mercaptoetanol, 100 μ g/mL

estreptomycin y 100 U/mL de penicilina) y se incubaron en placas de 96 pocillos de fondo plano (Greiner Bio-One, Austria) a razón de 3×10^5 PEC por pocillo. Las mismas se estimularon con PSEx 15 $\mu\text{g/mL}$ y péptidos sintéticos 45 $\mu\text{g/mL}$, en un volumen total de 200 μL . Cada condición se ensayó al menos por triplicado, en cultivos de 72 hs a 37°C en atmósfera controlada de CO₂ al 5% (sin agitación). Como controles se utilizaron tres condiciones: (i) PEC solas (control basal), (ii) PEC estimuladas con PSEx 15 $\mu\text{g/mL}$ (control de referencia), y (iii) PEC estimuladas con LPS 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (control positivo). Este ensayo se realizó varias veces, utilizando el sobrenadante resultante para titular anticuerpos o para cuantificar citoquinas, según se requiriese.

2.14. Cultivos de células RAW264.7 estimulados con PSEx.

Como se mencionó en el ítem anterior, los efectos de los péptidos sintéticos sobre la interacción entre antígenos tegumentarios de PSC de *E. granulosus* s.l. y células inmunes murinas, se evaluó en sistemas de cultivo *in vitro*. En particular, se utilizaron cultivos de células RAW264.7 para evaluar los efectos ejercidos por los péptidos sobre la producción de óxido nítrico y de citoquinas, inducidas por antígenos tegumentarios de PSC. Las células RAW264.7 se resuspendieron en DMEM alto en glucosa (Sigma, USA) conteniendo estreptomycin (100 $\mu\text{g/mL}$), penicilina (60 $\mu\text{g/mL}$) y suero fetal bovino al 5% (v/v) (FBS, Capricorn, Alemania) y se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano (Greiner Bio-One, Austria) a razón de 1×10^5 células en 50 $\mu\text{L/pocillo}$, y se incubaron durante 24 hs a 37°C en atmósfera controlada de CO₂ al 5% (sin agitación).

Luego, para el ensayo de cuantificación de citoquinas, las células RAW264.7 se incubaron con 200 $\mu\text{L/pocillo}$ en DMEM completo conteniendo PSEx 15 $\mu\text{g/mL}$ y péptidos sintéticos 45 $\mu\text{g/mL}$; y se incubó la placa durante 72 hs a 37°C en atmósfera controlada de CO₂ al 5% (sin agitación). Por otro lado, para el ensayo de cuantificación de nitritos, las células RAW264.7 se sembraron en 200 $\mu\text{L/pocillo}$ en DMEM completo conteniendo PSEx 2 $\mu\text{g/mL}$ y péptidos sintéticos 20 $\mu\text{g/mL}$; y se incubó la placa durante 24 hs a 37°C en atmósfera controlada de CO₂ al 5% (sin agitación). Se utilizaron tres controles: (i) células RAW264.7 solas (control basal), (ii) células RAW264.7 estimuladas con PSEx 15 $\mu\text{g/mL}$ o 2 $\mu\text{g/mL}$ para cuantificar citoquinas o nitritos, respectivamente (control de referencia), y (iii) células RAW264.7 estimuladas con LPS

1 µg/mL o 0,1 µg/mL para cuantificar citoquinas o nitritos, respectivamente (control positivo).

2.15. Titulación de anticuerpos específicos y polireactivos.

La producción de anticuerpos específicos y polireactivos se evaluó mediante ensayos de ELISA, utilizando los sobrenadantes de cultivo obtenidos de PEC estimuladas con PSEx en presencia/ausencia de los péptidos en estudio. Para la determinación de anticuerpos específicos, se sensibilizaron placas con antígenos somáticos de *E. granulosus* s.l. obtenidos mediante sonicación de PSC (SPE, [Dematteis et al., 1999]); mientras que para la determinación de anticuerpos polireactivos se utilizó el hapteno DNP (2,4-dinitrofenol) acoplado a BSA. Este último, es frecuentemente utilizado como parámetro sustituto para medir respuestas de anticuerpos polireactivos [Gunti & Notkins, 2015]. En todos los casos, se determinó el título de anticuerpos de para los isotipos IgM, IgA e IgG.

Ambos protocolos de titulación de anticuerpos fueron muy similares, siguiendo reportes previos de nuestro grupo [Mourglia-Ettlin et al., 2016a; García-Luna et al., 2020]. Brevemente, se sensibilizaron placas de microtitulación de 96 pocillos (Thermo, USA) con 50 µL/pocillo de DNP-BSA (4 µg/mL) o SPE (10 µg/mL) en PBS, incubándolas durante toda la noche a 4°C. Luego, se descartaron los sobrenadantes y las placas se bloquearon mediante incubación durante 1 h a temperatura ambiente con una solución (100 µL/pocillo) de BSA al 1% (m/v) en PBS. A continuación, las placas se lavaron una vez con PBS-Tween-20 al 0,05% (v/v) (PBS-T), se dispensaron 50 µL/pocillo de las muestras diluidas al 2/3 en PBS conteniendo BSA al 0,5% (m/v) y Tween-20 al 0,05% (v/v) (PBS-BSA-T), y posteriormente, se incubaron durante toda la noche a 4°C. Después, se descartaron los sobrenadantes y las placas se lavaron dos veces con PBS-T. Luego, se dispensaron 50 µL/pocillo de una dilución apropiada de anticuerpos monoclonales de cabra específicos contra IgM, IgA o IgG de ratón, cada uno conjugado a peroxidasa (Sigma, USA), diluidos en PBS-BSA-T, y posteriormente, las placas se incubaron durante 1 h a 37°C.

Finalmente, luego de lavar tres veces las placas con PBS-T, más un lavado adicional con PBS, se determinó la actividad enzimática de la peroxidasa. Para ello, se

dispensaron 50 μL /pocillo de una solución de buffer acetato de sodio 0,1 M pH 5,5 conteniendo como sustrato H_2O_2 al 1% (v/v) y como cromógeno TMB (6 mg/mL), y se incubaron las placas durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. La reacción se detuvo adicionando 25 μL /pocillo de H_2SO_4 1M y las placas se leyeron a 450 nm utilizando un espectrofotómetro para microplacas Titertek Multiscan Plus (Flow Laboratories, Helsinki, Finlandia). El título de anticuerpos se definió como la lectura de absorbancia de las muestras ensayadas, y se normalizó respecto a los valores de título obtenidos del control de referencia (PEC incubadas con PSEx).

2.16. Cuantificación de citoquinas.

La producción de las citoquinas IL-6, IL-10 y TNF- α en respuesta al estímulo con PSEx se evaluó en los sobrenadantes de cultivo de PEC y de células RAW264.7, tanto en presencia como en ausencia de los péptidos en estudio. Para ello, se realizaron ensayos de ELISA tipo captura utilizando diversos *kits* comerciales (*R&D Systems, USA*) y siguiendo las indicaciones del fabricante.

Brevemente, en placas de microtitulación de 96 pocillos (Thermo, USA) se dispensaron 100 μL /pocillo del anticuerpo de captura y se incubaron a temperatura ambiente durante toda la noche. Luego, las placas se lavaron con PBS-Tween-20 al 0,05% (v/v) (PBS-T) y se bloquearon dispensando 300 μL /pocillo de una solución de PBS conteniendo BSA al 1% (m/v) (PBS-BSA) e incubando las placas durante 2 hs a temperatura ambiente, protegidas de la luz y sin agitación. A continuación, se realizaron 3 lavados con PBS-T y, posteriormente, se dispensaron 100 μL /pocillo de muestra diluida en PBS-BSA. En paralelo, se sembró por duplicado una curva de calibración (rango de concentraciones: 15,6-1,000 pg/mL) también diluida en PBS-BSA.

Luego de 2 hs de incubación a temperatura ambiente, las placas se lavaron 3 veces, se adicionó 100 μL /pocillo de los anticuerpos de detección correspondientes (anticuerpos específicos contra IL-6, IL-10 y TNF- α ; conjugados a biotina) diluidos en PBS-BSA, y las placas se incubaron durante 2 hs a temperatura ambiente; en oscuridad y sin agitación. A continuación, se lavaron las placas 3 veces con PBS-T, se agregaron 100 μL /pocillo de estreptavidina conjugada a peroxidasa (streptavidin-HRP), y las placas se incubaron finalmente por 20 min a temperatura ambiente; en oscuridad y sin

agitación. Finalmente, las placas se lavaron 3 veces con PBS-T, se adicionaron 100 μL /pocillo de solución reveladora conteniendo H_2O_2 1% (v/v) como sustrato y TMB (6 mg/mL) como cromógeno en buffer acetato de sodio 0,1 M pH 5,5, y se incubaron las placas durante 20 min a temperatura ambiente; en oscuridad, sin agitación.

La reacción se detuvo adicionando 25 μL /pocillo de H_2SO_4 1 M y la absorbancia a 450 nm se midió utilizando un espectrofotómetro para microplacas Titertek Multiscan Plus (Flow Laboratories, Helsinki, Finlandia). La concentración de citoquinas se determinó a partir de la curva de calibración siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

2.17. Cuantificación de nitritos.

La producción de óxido nítrico (NO) se evaluó determinando la concentración de nitritos mediante reacción de Griess en los sobrenadantes de cultivo de células RAW264.7 estimuladas con PSEx; en presencia o ausencia de los péptidos en estudio. Para ello, en placa de 96 pocillos de fondo plano (Deltalab, España) se dispensaron 50 μL /pocillo de muestra. En paralelo, se construyó una curva de calibración partiendo de una solución de medio de cultivo DMEM completo conteniendo NaNO_3 1mM. A continuación, se agregaron 50 μL /pocillo del reactivo de Griess (sulfanilamida 1% m/v en ácido fosfórico 30% en agua y NEDA 0.1% m/v en ácido fosfórico 30% en agua), se incubó la placa durante 15 y 30 min a temperatura ambiente (en oscuridad y sin agitación) y se determinó la absorbancia a 560 nm utilizando un espectrofotómetro para microplacas Titertek Multiscan Plus (Flow Laboratories, Helsinki, Finlandia).

2.18. Potencial profiláctico *in vivo* de los péptidos sintéticos.

Para evaluar el potencial profiláctico de los péptidos sintéticos en estudio, se utilizó el modelo murino de EQ secundaria [González-Porcile et al., 2024], siguiendo a grandes rasgos las estrategias reportadas para el uso profiláctico de los ectodominios recombinantes solubles de CD5 y CD6 [Mourglia-Ettlin et al. 2018]. Asimismo, y por motivos logísticos de disponibilidad de ratones y parásitos, se realizó el estudio en tres etapas.

En primer lugar, se trabajó con tres grupos de ratones (n=10/grupo), los cuales se inocularon por vía intraperitoneal (i.p.) con: (i) una solución de PBS estéril conteniendo una mezcla de los tres péptidos 11-mer derivados de CD5 (20 µg/péptido/ratón), (ii) una solución de PBS estéril conteniendo una mezcla de los tres péptidos 11-mer derivados de CD6 (20 µg/péptido/ratón), o (iii) una solución de PBS estéril (grupo control). En todos los casos, se inocularon 200 µL de solución utilizando agujas estériles de calibre 27G. Luego de 30 min, todos los individuos de los tres grupos se inocularon i.p. con 200 µL de una suspensión conteniendo 2.000 PSC viables/ratón; utilizando agujas estériles de calibre 23G. A excepción de los ensayos descritos a continuación, en este estudio se realizó el seguimiento semanal del peso vivo de los ratones, utilizando una balanza digital.

En segundo lugar, y de manera análoga, se ensayaron los péptidos 35-mer derivados de CD5 y CD6; siguiendo un esquema modificado de dosis y administración. Nuevamente, se trabajó con tres grupos de ratones (n=9-10/grupo), los cuales se inocularon i.p. con una solución de PBS estéril conteniendo: (i) el péptido 35-mer derivado de CD5, (ii) el péptido 35-mer derivado de CD6, o (iii) solo PBS estéril (grupo control). En ese caso, 30 min antes de inocular los PSC se administró una primera dosis de péptido (50 µg/ratón), seguido de una segunda dosis de péptidos 24 hs post-desafío.

En tercer lugar, y siguiendo el último esquema descrito, se ensayaron los péptidos 11-mer y 35-mer, derivados de los restantes receptores en estudio (SR-AI, MARCO, SALSA, CD163, CD5L, SCARA5 y SSc5D). Brevemente, se trabajó con tres grupos de ratones (n=8/grupo), a los cuales, 30 min previo al desafío con los PSC de *E. granulosus* s.l., se les inoculó por vía i.p. una solución de PBS estéril conteniendo: (i) una mezcla de todos los péptidos 11-mer diseñados (20 µg/péptido/ratón; a excepción de los péptidos derivados de CD5 y CD6), (ii) una mezcla de todos los péptidos 35-mer diseñados (20 µg/péptido/ratón; a excepción de los péptidos derivados de CD5 y CD6), y (iii) solo PBS estéril (grupo control). A las 24 hs post-desafío, todos los individuos recibieron una segunda dosis de péptidos idéntica a la primera.

En los tres conjuntos de experimentos, se realizó la eutanasia de todos los individuos 7 meses post-desafío, y mediante necropsia, se analizó el resultado de los diversos tratamientos sobre el desarrollo de la infección. Para ello, se realizó la eutanasia de los ratones mediante exceso de anestesia inhalatoria (Isoflurano,

Laboratorio Cristalia, Brasil), e inmediatamente, se procedió a realizar la necropsia. Para ello, se colocó cada individuo en posición supina y se expuso cuidadosamente la cavidad peritoneal. Los quistes encontrados se removieron utilizando cucharas con bordes poco afilados y se colocaron identificados por ratón en placas de Petri conteniendo PBS estéril. Después del procesamiento de cada ratón, se realizó una evaluación parasitológica del resultado de la infección determinando: (a) *Número de individuos infectados por grupo* (se consideró individuo infectado a todo aquel que exhibió al menos un quiste hidatídico peritoneal en el punto final de la infección), (b) *Masa quística por ratón infectado* (se definió como la sumatoria de las masas individuales de cada quiste dentro de un mismo ratón infectado), y (c) *Carga parasitaria por ratón infectado* (se definió como la sumatoria de los volúmenes individuales de cada quiste dentro de un mismo ratón infectado). Este parámetro se evaluó mediante técnica de desplazamiento de agua siguiendo el Principio de Arquímedes.

2.19. Análisis estadísticos.

El procesamiento general de datos se realizó utilizando *Microsoft Office Excel*[®], mientras que para la construcción de gráficos y la realización de los análisis estadísticos se utilizó *GraphPad Prism*[®]. Los análisis de comparación entre grupos de ratones se realizaron mediante el test no-paramétrico de Mann-Whitney-Wilcoxon, mientras que las comparaciones de los resultados obtenidos *in vitro* se realizaron con el test paramétrico de ANOVA (múltiples comparaciones, con corrección de Tukey). En todos los casos las diferencias se consideraron significativas frente a valores de $p < 0,05$.

Capítulo 3.

Diseño de péptidos sintéticos basados en la secuencia pbs1 y evaluación de su perfil de biocompatibilidad.

Resultados y discusión.

A continuación, se presentan los principales resultados obtenidos en relación con la generación de péptidos sintéticos derivados de la estructura primaria de diversos RS (Objetivo específico #1); así como con la evaluación de sus perfiles de biocompatibilidad con sistemas mamíferos (Objetivo específico #2). En este sentido, se describen los flujos de trabajo bioinformáticos, los péptidos diseñados, la optimización de la solubilización de sus formas sintéticas y la evaluación de su biocompatibilidad.

Objetivo específico #1: *Identificar in silico péptidos homólogos a la secuencia consenso pbs1 descrita para el receptor SALSA, en la estructura primaria de los receptores scavenger MARCO, SR-AI, CD163, CD5L, CD5, CD6, SALSA, SCARA5 y SSc5D.*

Objetivo específico #2: *Analizar el perfil de biocompatibilidad en sistemas celulares de origen murino por parte de los péptidos diseñados.*

3.1. Identificación de secuencias homólogas a *pbs1* en diversos RS.

La secuencia consenso *pbs1* (GRVEVLYRGSW) está compuesta por 11 aminoácidos de longitud (11-mer) y ha sido mapeada dentro de varios dominios *SRCR* presentes en el RS SALSA [Bikker et al., 2004]. Dicha secuencia contiene la estructura de 9 aminoácidos VEVLxxxxW (donde x corresponde a cualquier aminoácido) como motivo característico de unión a componentes bacterianos [Bikker et al., 2002]. Por ello, y dada la alta homología estructural existente entre los RS de la SF-SRCR capaces de reconocer estructuras microbianas [Martínez et al., 2011], se realizó la búsqueda de secuencias homólogas a *pbs1* dentro de la secuencia aminoacídica de los mismos. De esta forma, se partió de la estructura primaria de los receptores en estudio, y, mediante el uso combinado de diversas herramientas bioinformáticas, se siguió un flujo de trabajo diseñado para identificar péptidos 11-mer potencialmente capaces de interactuar con antígenos microbianos; incluidos antígenos parasitarios.

Los nueve RS analizados se esquematizan en la **Figura 3.1.**, indicando el número de dominios *SRCR* que contiene cada uno, así como la numeración que le corresponde a los mismos. Entre los receptores en estudio, dos de ellos son solubles (CD5L y SSc5D), tres se expresan en membrana (MARCO, SR-AI y SCARA5), y los cuatro restantes se caracterizan por ser capaces de presentar ambas localizaciones (CD163, CD5, CD6 y SALSA) [Martínez et al., 2011]. Como se observa en la **Tabla 3.1.**, el tamaño de los receptores analizados osciló entre 347 (CD5L) y 2.542 (SALSA) aminoácidos de longitud, mientras que el número de dominios *SRCR* presentes varió desde 1 (MARCO, SR-AI y SCARA5) hasta 15 (SALSA).

La identificación *in silico* de las secuencias homólogas a *pbs1* se realizó a partir de las secuencias completas de los nueve RS seleccionados en base a su reportada capacidad para interactuar con componentes microbianos; a saber: MARCO, SR-AI, CD163, CD5L, CD5, CD6, SALSA, SCARA5 y SSc5D [Martínez et al., 2011]. Muy brevemente, para el flujo de trabajo bioinformático diseñado se buscaron, en bases de datos de alta calidad, los genes codificantes para los correspondientes receptores humanos según su nombre. A continuación, se descargaron sus secuencias y, tomando como referencia a *pbs1*, se buscaron y localizaron manualmente, secuencias 11-mer con características similares; prestando particular atención a aquellas que contuviesen el motivo VEVLxxxxW. Luego, utilizando una base de datos de dominios conservados, se

verificó que efectivamente las secuencias peptídicas identificadas se localizasen dentro de los dominios *SRCR* presentes en los receptores en estudio. Finalmente, se identificaron aquellas secuencias homólogas a *pbs1* que apareciesen en más de un dominio *SRCR*; ya sea dentro de un mismo receptor o en receptores distintos. Los resultados mostrados en la **Tabla 3.1.** resumen el número y origen de los péptidos identificados luego de aplicar los criterios mencionados. Así, se obtuvieron en total 26 péptidos 11-mer, distintos tanto respecto a *pbs1* como entre sí, presentes en los dominios *SRCR* de los RS en estudio.

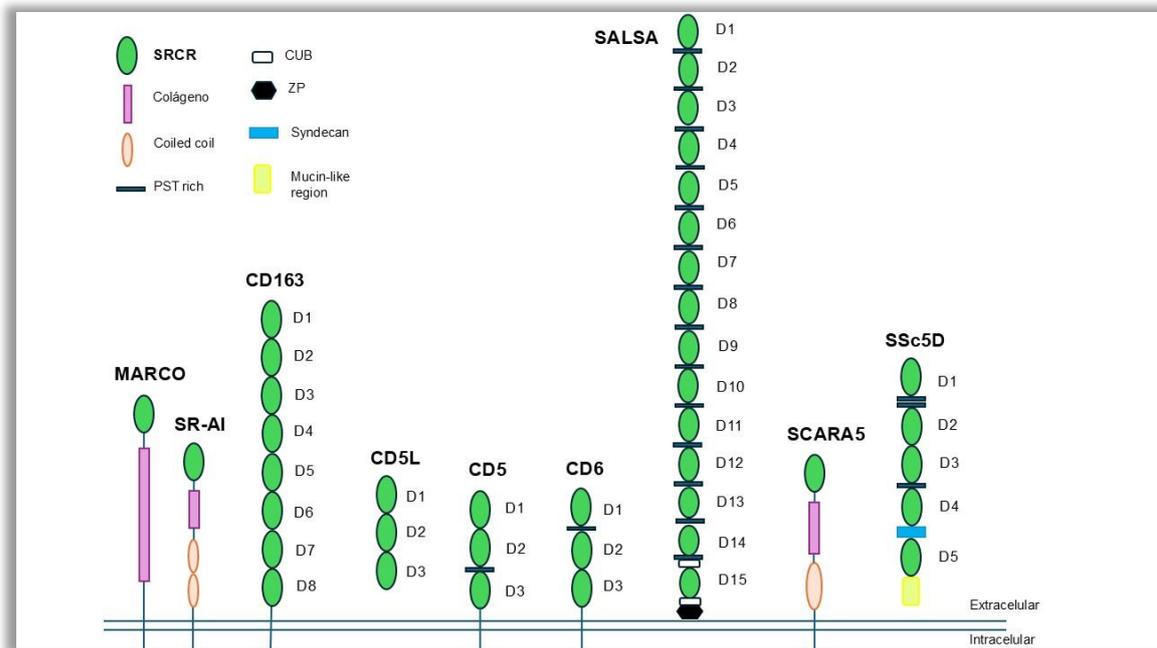


Figura 3.1. Representación esquemática de los RS estudiados. Se representan todos los RS analizados y se identifican sus respectivos dominios *SRCR*, según fueron numerados en la tesis. *CUB*, dominio C1r/C1s Uegf Bmp1 domain. *PST rich*, zona rica en prolina-serina-treonina. *ZP*, dominio zona pelúcida.

Tabla 3.1. Receptores en estudio. Resumen de los RS estudiados, y descripción de su tamaño, número de dominios SRCR y número de secuencias 11-mer homólogas a *pbs1*, y distintas, identificadas.

RECEPTOR			NÚMERO DE...	
Nombre	Código de acceso	Tamaño (a.a.)	Dominios SRCR	Péptidos 11-mer
MARCO	NM_006770.4	520	1	1
SR-AI	NM_138715.3	451	1	1
CD163	NM_203416.4	1.121	8	8
CD5L	NM_005894.3	347	3	3
CD5	NM_014207.4	945	3	3
CD6	NM_006725.5	668	3	3
SALSA	NM_001377530.1	2.542	15	4
SCARA5	NM_173833.6	495	1	1
SSc5D	NM_001144950.2	1.573	5	3

En cada dominio SRCR se identificó, generalmente, una única secuencia homóloga a *pbs1*; siendo la gran mayoría de las mismas diferente entre sí. Las excepciones correspondieron a los receptores SALSA y SSc5D. En el caso de SALSA, se identificó la secuencia consenso *pbs1* en 11 de sus dominios SRCR (D2, D3, D4, D5, D6, D7, D9, D10, D11, D12 y D14), mientras que, adicionalmente, se identificaron tres secuencias homólogas a *pbs1* distintas entre sí: una en el dominio D1, otra compartida entre los dominios D8 y D13, y finalmente, otra en el dominio D15. De esta forma, en SALSA se contabilizaron tres péptidos homólogos distintos adicionales a la secuencia *pbs1* repetida 11 veces dentro de los 15 dominios SRCR presentes en SALSA (**Figura 3.1.**). Por su parte, para el receptor SSc5D, se identificaron tres secuencias homólogas a *pbs1* diferentes entre sí: una presente en los dominios D1, D2 y D3, otra distinta en el dominio D4, y una adicional en el dominio D5 (**Figura 3.1.**). Por último, cabe destacar que, para los receptores CD5 y CD6, se identificaron los mismos péptidos 11-mer previamente seleccionados siguiendo un flujo de trabajo bioinformático distinto al aplicado en la presente tesis [Martínez-Florensa et al., 2018; Miles et al., 2020b]; validando así, al menos indirectamente, nuestra estrategia.

Los péptidos identificados se codificaron, inicialmente, con el nombre de su receptor de origen, individualizándolos según el dominio SRCR en el que se encontraron. Sin embargo, a efectos de simplificar tanto el trabajo con los mismos como la interpretación de resultados y su discusión, se les asignó un código de identificación

consecutivo desde **p1** a **p27**; correspondiendo **p20** a la secuencia consenso *pbs1* (Tabla 3.2.). Por lo tanto, así se reportarán a lo largo de la presente tesis, destacando el receptor de origen (y localización dentro de este), cuando se considere pertinente.

Tabla 3.2. Péptidos 11-mer identificados. Resumen de los péptidos identificados, indicando el RS de origen, la secuencia aminoacídica del péptido y el código utilizado a lo largo de la tesis para su identificación. En negritas se destacan los péptidos que contienen la secuencia *VEVLxxxW* exacta y completa.

Nombre	Código	Secuencia	Secuencia vs. <i>pbs1</i> (%)		
			Distancia p	Identidad	Similitud
MARCO	p1	GRAEVYYSGTW	36,4	63,6	81,8
SR-AI	p2	GRVEILHSGQW	36,4	63,6	90,9
CD163.D1	p3	GRVEVKVQEEW	45,5	54,5	63,6
CD163.D2	p4	GRIEIKFQGRW	54,5	45,5	81,8
CD163.D3	p5	GRLEVRFQGEW	45,5	54,5	81,8
CD163.D4	p6	GTVEVEIQRL	63,6	-	-
CD163.D5	p7	GRVEVKHGDW	45,5	54,5	72,7
CD163.D6	p8	GRVELKTLGAW	45,5	54,5	72,7
CD163.D7	p9	GRVEIYHEGSW	36,4	63,6	90,9
CD163.D8	p10	GRVEIWHGGSW	36,4	63,6	81,8
CD5L.D1	p11	GRVEVEQKGQW	36,4	63,6	81,8
CD5L.D2	p12	GRVEVKHQNQW	45,5	54,5	90,9
CD5L.D3	p13	GRLEVLHKGW	36,4	63,6	90,9
CD5.D1	p14	GQLEVYLKDGW	63,6	36,4	72,7
CD5.D2	p15	GVVEFYSGSLG	72,7	-	-
CD5.D3	p16	GTVEVRQGAQW	54,5	45,5	63,6
CD6.D1	p17	GTVEVRLEASW	45,5	54,5	72,7
CD6.D2	p18	GRVEMLEHGEW	36,4	63,6	81,8
CD6.D3	p19	GQVEVHFRGW	36,4	63,6	81,8
PBS-1	p20	GRVEVLYRGSW	0,0	100	100
SAG.D1	p21	GRVEILYRGSW	9,1	90,9	100
SALSA.D8.D13	p22	GRVEVLYQGSW	9,1	90,9	100
SALSA.D15	p23	GRVEIYHGGTW	45,5	54,5	81,8
SCARA5	p24	GRVEVYHRRW	45,5	54,5	63,6
SSc5D.D1.D2.D3	p25	GRLEVWHGGRW	45,5	54,5	72,7
SSc5D.D4	p26	GRLEVWHDQRW	54,5	45,5	63,6
SSc5D.D5	p27	GRLEVWHAGR	45,5	54,5	72,7

Los resultados resumidos en la **Tabla 3.2.** muestran las secuencias de cada péptido seleccionado; observándose que, de los 26 péptidos identificados, solo **p22** exhibió la secuencia *VEVLxxxxW* completa. Resulta interesante que, dicho péptido,

también derivó del receptor SALSA, y, al igual que **p21**, difirió solo en un aminoácido con la secuencia de *pbs1*. Así, y dado que VEVLxxxxW sería el motivo mínimo capaz de retener la interacción de SALSA con estructuras bacterianas [Bikker et al., 2002], los 25 péptidos restantes podrían tener, *a priori*, una menor capacidad de interacción con bacterias que *pbs1*. En este sentido, y luego de analizar las frecuencias para los distintos residuos aminoacídicos presentes en cada posición de la secuencia 11-mer, se observó que solo las posiciones 1 y 4 se mantuvieron constantes en los 27 péptidos estudiados, correspondiéndose con G (glicina) y E (ácido glutámico), respectivamente. Por el contrario, se observó que las posiciones 6, 7, 8 y 10 de la secuencia 11-mer son las que presentaron mayor variabilidad entre los péptidos identificados (**Figura 3.2**).

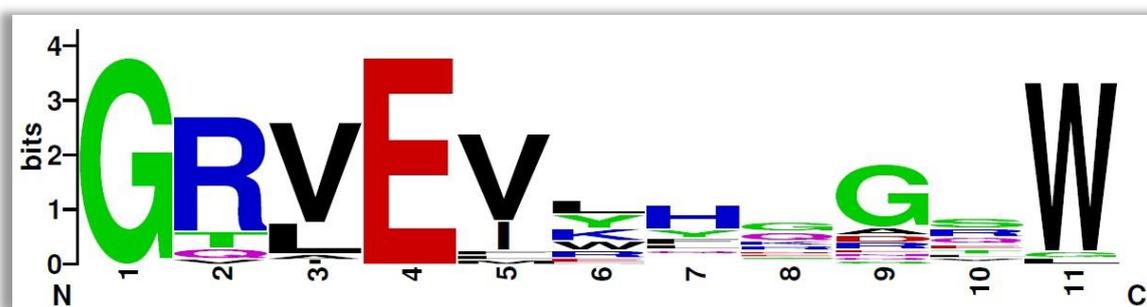


Figura 3.2. Análisis de frecuencias aminoacídicas. Se compararon entre sí todas las secuencias de los péptidos 11-mer en estudio, con interés de identificar patrones asociados a los distintos residuos aminoacídicos que ocupan las distintas posiciones.

Por otro lado, para comparar la diversidad de secuencias presente en los péptidos 11-mer identificados, se realizaron estudios de alineamiento contra la secuencia consenso *pbs1*. Los resultados obtenidos de identidad y similitud (para una cobertura del 100% sobre la secuencia de 11 aminoácidos de *pbs1*) se resumen, también, en la **Tabla 3.2**. Allí, por un lado, se observa que el rango de identidad osciló desde 36,4% para **p14** hasta 90,9% para **p21** y **p22** (estos últimos ambos derivados del receptor SALSA). En este aspecto, cabe destacar que para **p6** y **p15** no se pudo obtener un valor de identidad con cobertura del 100%; por lo cual, los mismos serían <36,4%; infiriéndose así que ambos serían los péptidos con menor homología respecto a *pbs1*. Por otro lado, y en línea con estos resultados, el rango de similitud varió desde 63,6% (**p3**, **p16**, **p24** y **p26**) hasta 100%; en este último caso nuevamente para **p21** y **p22**. La ausencia de un valor de identidad para **p6** y **p15** impidió el cálculo de sus valores de similitud respecto a *pbs1* (**Tabla 3.2**).

En línea con el estudio de homología realizado, y para enriquecer dicho análisis, se realizó, en colaboración con el Dr. Andrés Iriarte del Laboratorio de Biología Computacional (DDBT, Instituto de Higiene, UdelaR), un análisis de tipo evolutivo con las secuencias de los 27 péptidos 11-mer en estudio. A nivel gráfico, los resultados se reportan en la **Figura 3.3.** donde se observó, nuevamente, que los péptidos **p21** y **p22** son los de mayor cercanía en su secuencia respecto a *pbs1*; mientras que **p6**, **p15**, **p16** y **p17** son los más distantes. A nivel numérico, estas diferencias se reportan en la **Tabla 3.2.** como valores de “distancia p”, los cuales corresponden a la proporción de aminoácidos en cada posición que son distintos respecto a *pbs1*. Este valor se obtuvo dividiendo el número de diferencias halladas entre el total de aminoácidos evaluados, sin aplicar ninguna corrección adicional. Así, se observó que el rango de valores para “distancia p” osciló desde 9,1% para **p21** y **p22**, como se esperaba, y 72,7% para **p15** (**Tabla 3.2.**). Por lo tanto, se confirmó mediante esta estrategia que, por un lado, los péptidos **p21** y **p22** exhibieron la mayor similitud de secuencia con *pbs1*, mientras que, por otro lado, el péptido **p15** fue el de mayor diferencia, seguido por **p6** y **p14**. En este sentido, resulta interesante destacar que **p21** y **p22** derivaron ambos del receptor SALSA, al igual que *pbs1*; mientras que **p14** y **p15** derivaron del receptor CD5.

3.2. Modelado estructural de los péptidos 11-mer identificados.

La secuencia específica de aminoácidos en un péptido es el motivo principal que dictamina la estructura tridimensional adoptada por el mismo; y esta, generalmente, se encuentra en estrecha relación con sus posibles funciones biológicas. Por ello, y dado el amplio rango de identidad de secuencias respecto a *pbs1* obtenido para los péptidos identificados (**Tabla 3.2.**), se procedió a realizar el modelado estructural de cada uno de ellos. Así, en colaboración con el Dr. Sebastián Miles (DDBT, Instituto de Higiene, UdelaR), se modeló la estructura tridimensional de los péptidos. A continuación, se muestran los modelos obtenidos, agrupándolos según presenten estructuras de hélice α (**Figura 3.4.**), de hoja β (**Figura 3.5.**), o estructuras desordenadas denominadas *random coil* (**Figura 3.6.**).

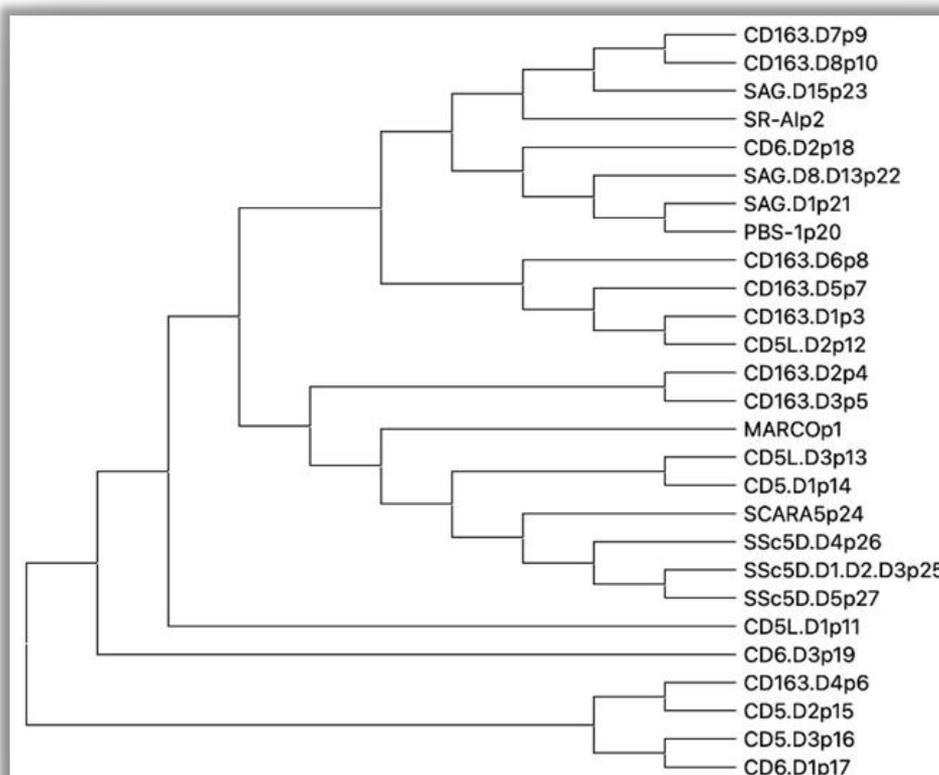


Figura 3.3. Análisis evolutivo. Se compararon entre sí todas las secuencias de los péptidos 11-mer en estudio, con interés de identificar posibles relaciones evolutivas entre los mismos.

En la **Figura 3.4.** se observa que 12 de los 27 péptidos 11-mer en estudio presentaron algún tipo de estructura compatible con hélices α . Entre ellos, 2 péptidos adquirieron dicha estructura a lo largo de toda su secuencia (**p13** y **p26**), mientras que otros 2 solo la exhibieron en su interior (**p11** y **p20**). En este sentido, por lo tanto, cabe destacar que **p11** (derivado del dominio D1 del receptor CD5L) sería el péptido de mayor similitud estructural con *pbs1* (**p20**), aunque presente una identidad de secuencia intermedia con el mismo (63,6%). Los restantes péptidos con estructuras de hélice α las exhibieron en sus extremos, ya sean N-terminal (**p15**, **p18** y **p27**) o C-terminal (**p3**, **p6**, **p8**, **p12** y **p16**).

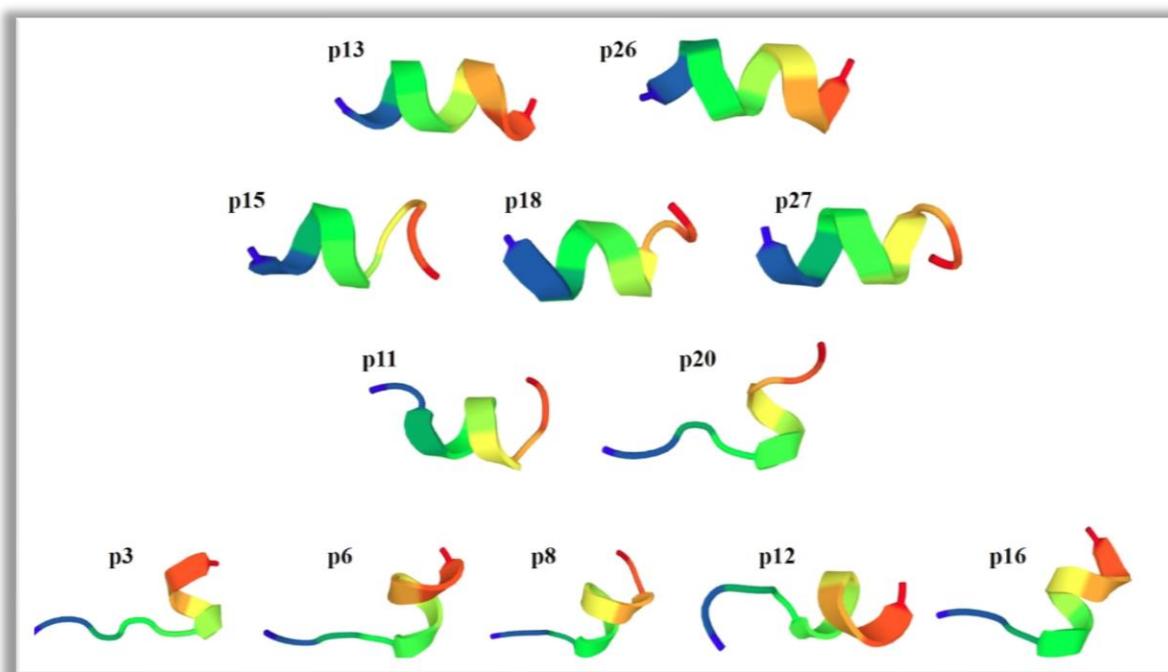


Figura 3.4. Péptidos con estructuras *alfa-hélice*. Se representa el modelado estructural para los péptidos 11-mer que exhiben estructuras compatibles con hélices α , ya sea en la totalidad de su secuencia, como al centro o en alguno de sus extremos.

Por su parte, únicamente el péptido **p7** (derivado del dominio D5 del receptor CD163) exhibió estructuras de hoja β , en particular, con plegamiento antiparalelo (**Figura 3.5.**). Pese a esta gran diferencia estructural con *pbs1* (**p20**), **p7** mostró niveles de homología intermedios con dicho péptido, tanto en términos de identidad (54,5%) como de “distancia p” (45,5%). Este hecho sugiere que pequeñas modificaciones en la secuencia de péptidos 11-mer afectarían drásticamente su estructura tridimensional.

Por último, en la **Figura 3.6.** se observa que 14 de los 27 péptidos 11-mer en estudio presentaron estructuras desordenadas de tipo *random coil*. Entre ellos cabe destacar a **p21** y **p22** (ambos derivados del receptor SALSA), ya que fueron los péptidos con mayor homología de secuencia en relación a *pbs1* (**p20**); tanto en términos de identidad (90,9%) como de “distancia p” (9,1%). Estos resultados refuerzan la sugerencia mencionada previamente, respecto a que modificaciones tan pequeñas como 1 residuo aminoacídico pueden afectar significativamente la estructura tridimensional adoptada por péptidos 11-mer.

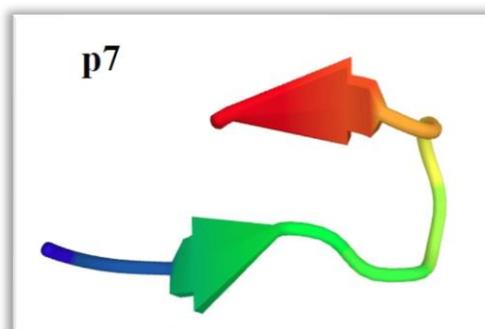


Figura 3.5. *Péptido con estructuras hoja-beta. Se representa el modelado estructural para el único péptido 11-mer que exhibe estructura compatible con hoja β .*

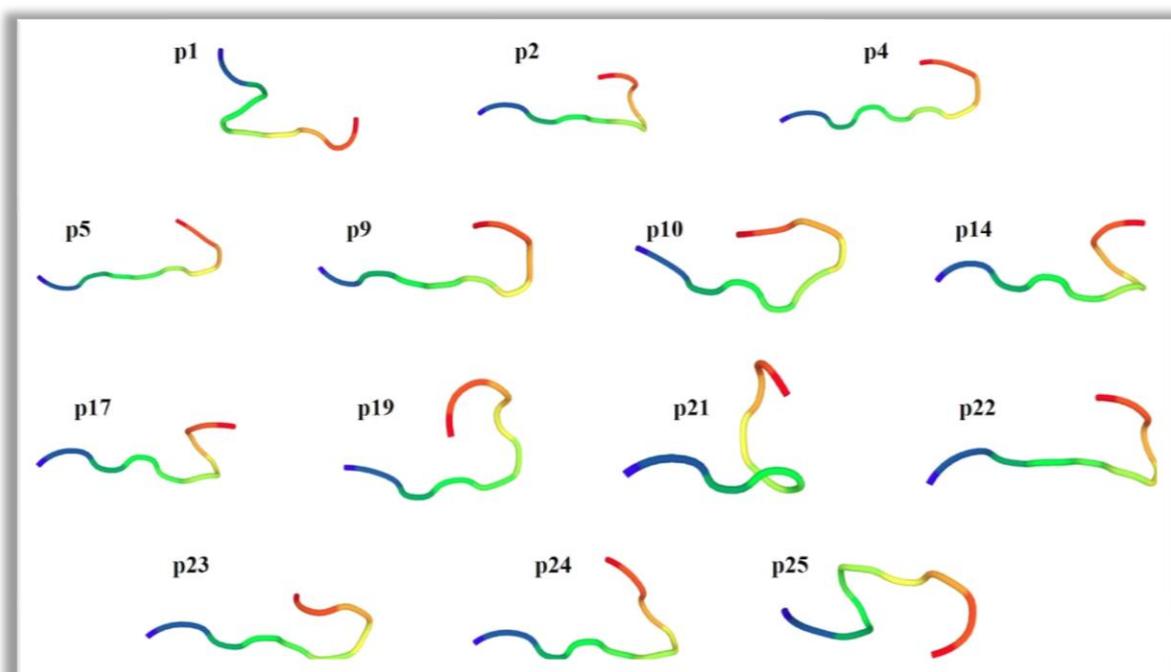


Figura 3.6. *Péptidos con estructuras desordenadas tipo random-coil. Se representa el modelado estructural para los péptidos 11-mer que exhiben estructuras desordenadas compatibles con random coil.*

3.3. Caracterización fisicoquímica de los péptidos 11-mer identificados.

Las características fisicoquímicas de los péptidos identificados se analizaron en términos de masa molecular (MW) y punto isoeléctrico (pI) teóricos, y de composición porcentual de aminoácidos dentro de sus secuencias: polares cargados (D, E, K, R y H),

polares neutros (S, C, P, T, N y Q) e hidrofóbicos (G, A, V, L, M, I, F, Y y W). Dichas características se resumen en la **Tabla 3.3**.

Tabla 3.3. Características fisicoquímicas de los péptidos. Resumen de las características de los péptidos identificados en términos de masa molecular teórica, punto isoeléctrico y composición porcentual de aminoácidos polares cargados, polares neutros e hidrofóbicos.

Código	MW (g/mol)	pI	AA Polares Cargados (%)	AA Polares Neutros (%)	AA Hidrofóbicos (%)
p1	1.288,4	6,4	18,2%	18,2%	63,6%
p2	1.281,0	7,5	27,3%	18,2%	54,5%
p3	1.358,5	4,5	45,5%	9,1%	45,5%
p4	1.389,6	11,5	36,4%	9,1%	54,5%
p5	1.376,5	6,5	36,4%	9,1%	54,5%
p6	1.256,5	4,3	27,3%	18,2%	54,5%
p7	1.283,4	7,5	45,5%	9,1%	45,5%
p8	1.229,4	9,7	27,3%	9,1%	63,6%
p9	1.332,5	5,5	36,4%	9,1%	54,5%
p10	1.283,4	7,5	27,3%	9,1%	63,6%
p11	1.315,5	6,5	36,4%	18,2%	45,5%
p12	1.380,5	9,7	36,4%	27,3%	36,4%
p13	1.294,0	9,7	36,4%	0,0%	63,6%
p14	1.307,5	4,2	27,3%	9,1%	63,6%
p15	1.114,2	3,8	9,1%	18,2%	72,7%
p16	1.230,4	6,4	18,2%	27,3%	54,5%
p17	1.246,4	4,3	27,3%	18,2%	54,5%
p18	1.342,5	4,5	45,5%	0,0%	54,5%
p19	1.414,5	7,5	27,3%	9,1%	63,6%
p20	1.321,5	9,3	27,3%	9,1%	63,6%
p21	1.335,5	9,3	27,3%	9,1%	63,6%
p22	1.293,5	6,4	18,2%	18,2%	63,6%
p23	1.274,4	7,5	27,3%	9,1%	63,6%
p24	1.472,6	9,3	54,5%	0,0%	45,5%
p25	1.352,5	10,4	36,4%	0,0%	63,6%
p26	1.481,7	7,5	45,5%	9,1%	45,5%
p27	1.366,6	10,4	36,4%	0,0%	63,6%

Respecto a la masa molecular teórica (MW) para los péptidos identificados, se observó que las mismas oscilaron en el rango desde 1.114,2 g/mol (**p15**) hasta 1.481,7 g/mol (**p26**), encontrándose la mayoría de los péptidos (22/27) entre 1.200-1.400 g/mol (**Tabla 3.3**). Este comportamiento era esperable, considerando que se trata de

secuencias de exactamente el mismo largo, que, además, presentan posiciones altamente conservadas. Con relación al valor teórico de pI, la mayoría de los péptidos (15/27) se clasificaron como básicos, mientras que los restantes fueron ácidos. Cabe mencionar que el valor calculado de pI más bajo fue de 3,8 (**p15**), mientras que el más alto fue de 11,5 (**p4**).

Por último, el rango de valores de composición porcentual para ciertos residuos aminoacídicos mostró ser altamente variable entre los distintos péptidos: aminoácidos polares cargados (de 9,1% hasta 54,4%), aminoácidos polares neutros (de 0,0% hasta 27,3%) y aminoácidos hidrofóbicos (de 36,4% hasta 72,7%); observándose en varios de los casos exactamente el mismo patrón de distribución (**Tabla 3.3.**). Nuevamente, se destaca **p15**, para el cual su distribución porcentual de aminoácidos mostró datos extremos, ya que presentó el menor valor para aminoácidos polares cargados (9,1%) y el mayor valor para aminoácidos hidrofóbicos (72,7%). Es interesante destacar que, además de las particularidades fisicoquímicas mencionadas, el péptido **p15** resultó ser el de menor similitud con la secuencia *pbs1* (**Tabla 3.2.**).

3.4. Síntesis comercial de los péptidos 11-mer y optimización de su solubilización.

Los 27 péptidos 11-mer en estudio se sintetizaron de manera comercial y se obtuvieron en formato liofilizado con alta pureza ($\geq 90\%$). Una vez recibidos, los péptidos se solubilizaron y se almacenaron en condiciones estables. Para ello, y con el fin de optimizar el protocolo de solubilización, los péptidos se clasificaron según sus características fisicoquímicas (carga neta a pH neutro y carácter ácido-base) para luego ensayar distintos solventes (agua, NH_4HCO_3 y/o DMSO); estableciendo así, de manera empírica, una estrategia adecuada para su solubilización. En la **Tabla 3.4.** se resumen los valores de pureza, MW empírica, carga neta calculada a pH neutro, carácter ácido-base asignado y solventes utilizados para la solubilización de cada uno de los 27 péptidos 11-mer sintetizados.

El porcentaje de pureza con el que se sintetizaron los péptidos osciló entre 86,1% (primera síntesis de **p17**) y 99,8% (primera síntesis de **p18**); siendo superior al 95% en la mayoría de los casos (22/27). En relación con la MW determinada experimentalmente por el fabricante, los valores reportados fueron muy similares a los valores teóricos esperados (**Tabla 3.3.**).

Tabla 3.4. Perfil de solubilización de los péptidos sintetizados. *Resumen de las características de los péptidos sintetizados en términos de carga eléctrica calculada y solvente(s) usado(s) para su solubilización. Los casos en que se reporta más de un valor refieren a péptidos sintetizados en más de una oportunidad.*

Péptido	Pureza (%)	MW empírica (g/mol)	Carga neta	Carácter	Concentración stock (mg/mL)	Solubilizado en (H₂O:Y)
p1	97,3	1.288,4	0	neutro	2,00	DMSO (14,2% v/v)
	95,7	1.291,3			2,00	DMSO (12,0% v/v)
p2	97,9	1.283,0	1	básico	2,00	-
p3	96,4	1.359,6	-1	ácido	2,00	-
p4	98,3	1.390,7	2	básico	2,00	-
p5	90,1	1.377,1	0	neutro	2,00	DMSO (18,6% v/v)
p6	97,9	1.258,0	3	básico	2,00	-
p7	98,9	1.285,1	1	básico	2,00	-
p8	96,1	1.231,0	1	básico	2,00	-
p9	98,9	1.334,1	0	neutro	2,00	DMSO (5,0% v/v)
p10	98,9	1.283,5	1	básico	2,00	-
p11	98,6	1.316,7	0	neutro	2,00	DMSO (6,2% v/v)
p12	97,5	1.382,4	2	básico	2,00	-
p13	97,2	1.295,1	2	básico	2,00	-
p14	92,1	1.307,6	-1	ácido	1,43	NH ₄ HCO ₃ (14 mM) + DMSO (14,2% v/v)
p15	94,6	1.114,7	-1	ácido	1,66	NH ₄ HCO ₃ (17 mM)
p16	99,6	1.232,0	0	neutro	2,00	DMSO (17,6% v/v)
p17	86,1	1.246,5	-1	ácido	1,65	NH ₄ HCO ₃ (17 mM)
	90,6	1.248,0			2,00	-
p18	99,8	1.343,5	-1	ácido	2,00	-
	95,4	1.345,2			2,00	
p19	93,9	1.314,7	1	básico	2,00	-
	95,1	1.316,4			2,00	
p20	98,6	1.322,3	1	básico	2,00	-
p21	98,4	1.337,5	1	básico	2,00	-
p22	97,9	1.294,9	0	neutro	2,00	DMSO (4,4% v/v)
p23	95,4	1.275,8	1	básico	2,00	-
	97,2	1.277,4			2,00	
p24	99,5	1.473,0	2	básico	2,00	-
p25	99,7	1.353,3	2	básico	2,00	-
p26	99,2	1.482,3	1	básico	2,00	-
	97,2	1.355,4			2,00	
p27	98,5	1.367,9	2	básico	2,00	-

Para proceder con la solubilización de los péptidos sintetizados, a cada uno se le asignaron cargas -1 y +1 por cada residuo aminoacídico ácido (contando al extremo C-terminal libre como un aminoácido) y básico (contando al extremo N-terminal libre como un aminoácido), respectivamente. Luego, por un lado, los péptidos ácidos (carga neta < 0) se solubilizaron siguiendo la secuencia “agua → NH₄HCO₃ → DMSO” (solo el péptido **p14** requirió del agregado de los tres solventes para lograr la solubilización completa). Por otro lado, los péptidos básicos (carga neta > 0) se solubilizaron siguiendo la secuencia “agua → DMSO” (ningún péptido requirió del agregado de ambos solventes para lograr la solubilización completa). Finalmente, los péptidos neutros (carga neta = 0), se solubilizaron directamente en DMSO, y luego se llevaron a volumen final con agua. Así, y dado que todos los péptidos se almacenaron a 1,4-2,0 mg/mL, la concentración de NH₄HCO₃ y de DMSO presente en las soluciones *stock* correspondientes osciló entre 14,4-17,8 mM para el NH₄HCO₃ y entre 14,3-17,6% (v/v) para el DMSO (**Tabla 3.4.**).

Finalmente, de los 27 péptidos 11-mer sintetizados, 5 fueron ácidos (carga neta = -1), 6 fueron neutros, y 16 fueron básicos (carga neta desde +1 hasta +3). La gran mayoría de los péptidos ácidos/básicos se solubilizaron fácilmente en agua como primer solvente (**Tabla 3.4.**); a excepción de los péptidos **p14** y **p15**, ambos de carácter ácido y derivados del receptor CD5 (**Tabla 3.2.**). Las soluciones *stock* de los péptidos solubilizados se filtraron por 0,22 μm y se almacenaron en alícuotas estériles a -80°C hasta su uso.

3.5. Evaluación de la biocompatibilidad de los péptidos 11-mer con sistemas mamíferos.

El objetivo general de la presente tesis consistió en diseñar y seleccionar péptidos sintéticos útiles como intervención profiláctica frente a la EQ secundaria. Por ello, fue indispensable identificar aquellos péptidos potencialmente tóxicos para el hospedero, de manera que se los pueda descartar del flujo de trabajo. Para ello, se evaluó el perfil de biocompatibilidad sobre sistemas mamíferos por parte de los 27 péptidos 11-mer sintetizados, analizando su actividad hemolítica y su citotoxicidad. En ambos casos, se trabajó con células de origen murino, ya que, en última instancia, el

potencial profiláctico de los péptidos sintéticos de interés sería ensayado en el modelo murino de EQ secundaria [González-Porcile et al., 2024].

3.5.1. Actividad hemolítica de los péptidos 11-mer.

En primer lugar, la potencial toxicidad de los péptidos sintéticos se evaluó determinando su actividad hemolítica (AH); en particular, su AH₅₀ (concentración de péptido capaz de inducir la lisis del 50% de los eritrocitos presentes en una suspensión fresca). Para ello, se generó una suspensión de eritrocitos murinos frescos y, con la misma, se incubaron los 27 péptidos sintéticos a distintas concentraciones en el rango 1,6 µg/mL a 100 µg/mL. La lisis de los eritrocitos se evaluó de forma indirecta determinando, post-incubación, la presencia de hemoglobina libre en solución mediante la lectura de la absorbancia a 560 nm. La AH de cada péptido, a cada concentración, se calculó siguiendo protocolos de referencia [Cibulski et al., 2016].

En la **Figura 3.7.** se muestran los resultados obtenidos, agrupando los péptidos sintéticos según su receptor de origen. Los resultados de AH para los 27 péptidos sintéticos mostraron que, para todos ellos, la misma fue despreciable en el rango de concentraciones ensayadas. Así, los 27 péptidos 11-mer exhibieron una AH₅₀ >100 µg/mL. Por lo tanto, se concluyó que ninguno de los péptidos sintéticos en estudio presenta toxicidad significativa, en términos de AH, a valores de concentración compatibles con posibles usos *in vivo*.

3.5.2. Actividad citotóxica de los péptidos 11-mer.

En segundo lugar, la potencial toxicidad de los péptidos sintéticos se evaluó determinando su actividad citotóxica (AC); en particular, su AC₅₀ (concentración de péptido capaz de reducir en un 50% la viabilidad de un cultivo celular mamífero). En la presente tesis se trabajó con células RAW264.7, una línea derivada de macrófagos peritoneales de ratones pertenecientes a la cepa Balb/c (www.atcc.org). Dicha línea se eligió por representar un tipo celular de alta relevancia para la EQ secundaria, ya que, en el modelo murino de infección, el parásito se desarrolla en la cavidad peritoneal de ratones, comúnmente, de la cepa Balb/c [González-Porcile et al., 2024].

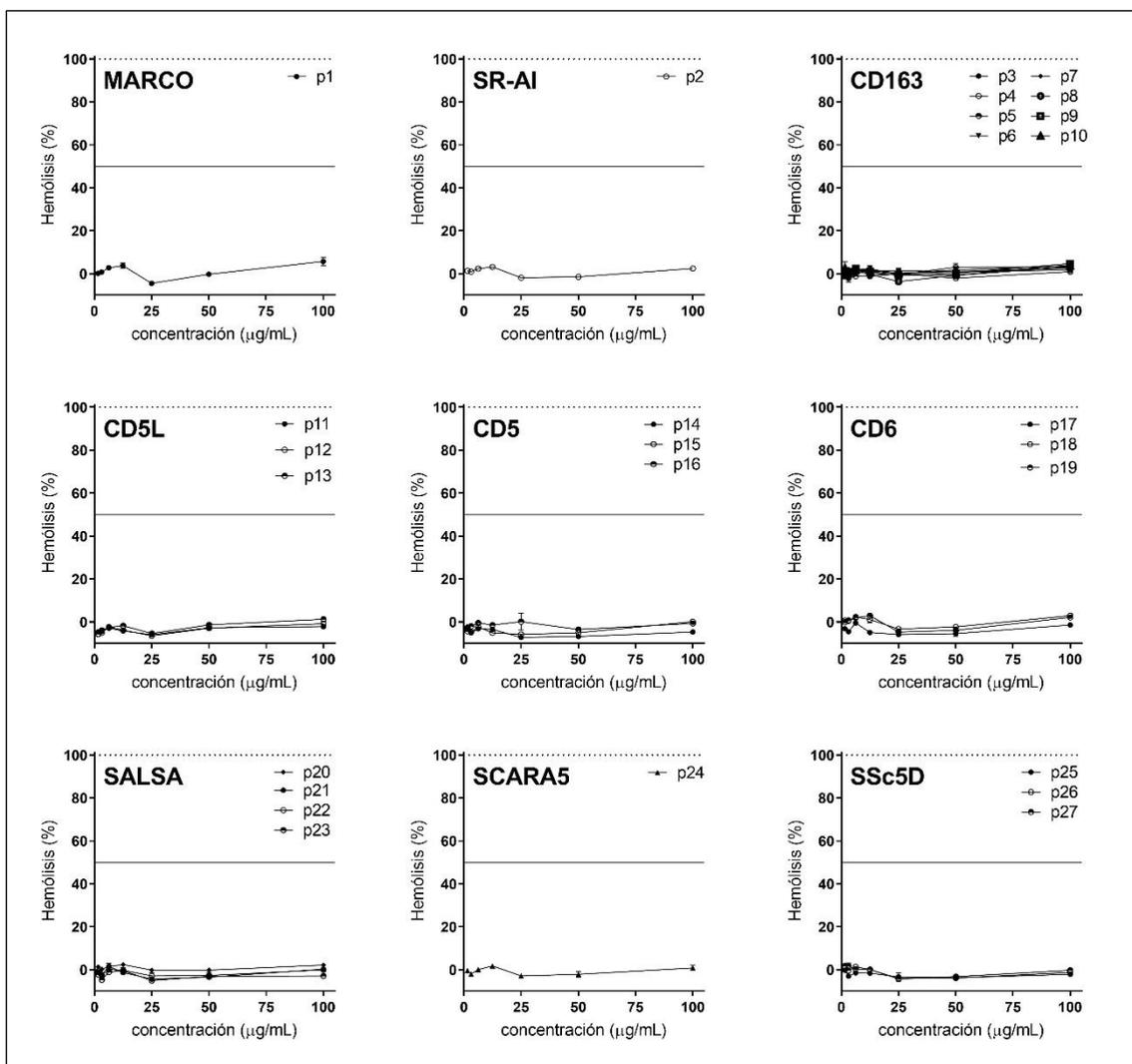


Figura 3.7. Actividad hemolítica de los péptidos sintéticos 11-mer. La AH se determinó incubando una suspensión de eritrocitos murinos frescos en presencia de concentraciones crecientes de los péptidos sintéticos (rango: 1,6 µg/mL a 100 µg/mL). Se representa la AH para los péptidos en estudio agrupando los resultados según el receptor de origen. Las líneas horizontales punteadas y completas representan valores de AH del 100% y 50%, respectivamente.

Para determinar la AC de los péptidos sintéticos se realizaron cultivos de células RAW264.7, los cuales se incubaron durante 72h en presencia de distintas concentraciones de péptidos sintéticos en el rango 6,3 µg/mL a 100 µg/mL. Finalmente, la viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de reducción del MTT [Ghasemi et al., 2021], normalizando los valores respecto al control negativo (células sin péptidos). En la **Figura 3.8.** se muestran los resultados obtenidos, agrupando nuevamente los péptidos sintéticos según su receptor de origen.

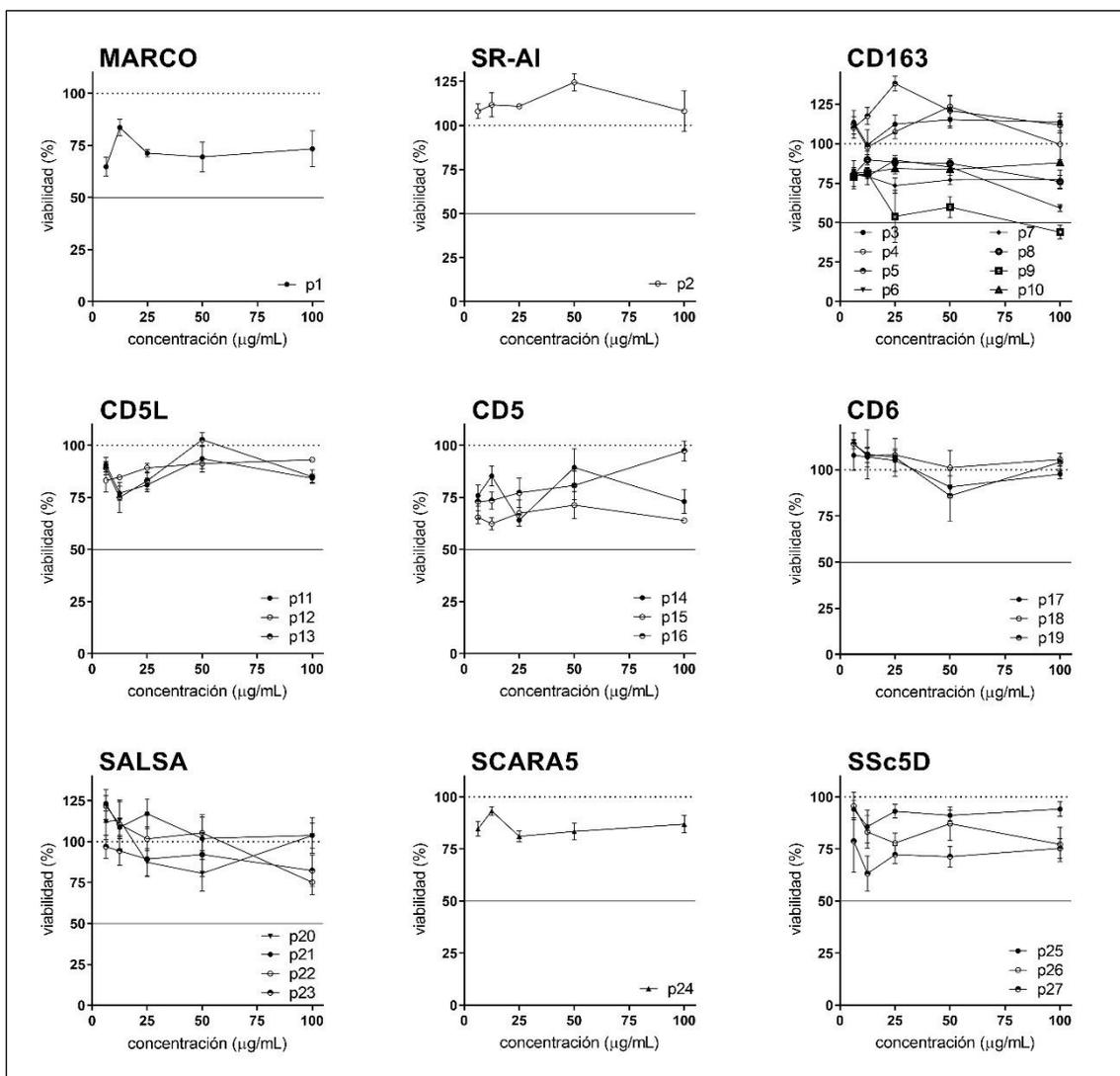


Figura 3.8. Actividad citotóxica de los péptidos sintéticos 11-mer. La AC se determinó incubando cultivos de células RAW264.7 en presencia de concentraciones crecientes de los péptidos sintéticos (rango: 6,3 µg/mL a 100 µg/mL). Se representa la viabilidad celular en respuesta a los péptidos en estudio, agrupando los resultados según el receptor de origen. Las líneas horizontales punteadas y completas se ubican en los valores correspondientes al 100% y 50% de viabilidad celular respecto del control, respectivamente.

El ensayo de MTT realizado permitió determinar de forma indirecta la viabilidad celular mediante la evaluación de su actividad metabólica. En este sentido, si bien los resultados obtenidos mostraron importantes niveles de dispersión experimental, los mismos no evidenciaron niveles significativos de AC en el rango de concentraciones evaluadas; por lo que la mayoría de los péptidos sintéticos exhibió una $AC_{50} > 100$ µg/mL (**Figura 3.8**). El único péptido que exhibió un valor menor fue **p9** ($AC_{50} = 72$ µg/mL).

En suma, mediante la ejecución del Objetivo Específico #1 y del Objetivo Específico #2 de la presente tesis, se identificaron 26 péptidos 11-mer con secuencias homólogas a *pbs1*, presentes en la estructura primaria de nueve RS pertenecientes a la SF-SRCR, seleccionados por ser capaces de interactuar con ligandos microbianos (MARCO, SR-AI, CD163, CD5L, CD5, CD6, SALSA, SCARA5 y SSc5D). A pesar de su pequeño tamaño, los péptidos identificados mostraron una importante diversidad de secuencias y de posibles estructuras tridimensionales; así como diferencias en sus propiedades fisicoquímicas relacionadas con sus propiedades de solubilización. Los 26 péptidos 11-mer identificados, junto al péptido de referencia *pbs1*, se sintetizaron comercialmente con alta pureza y se solubilizaron exitosamente. Por último, todos ellos mostraron muy buenos perfiles de biocompatibilidad con sistemas mamíferos; tanto en ensayos de AH como de AC; apoyando su potencial uso futuro en ensayos *in vivo*.

Capítulo 4.

Evaluación de la actividad antiparasitaria de los péptidos sintéticos 11-mer.

Resultados y discusión.

En el presente capítulo se abordan los principales resultados obtenidos en relación al Objetivo Específico #3 de la presente tesis. Para ello, por un lado, se evaluó la potencial actividad antiparasitaria intrínseca de los péptidos sintéticos 11-mer sobre PSC de *E. granulosus* s.l., utilizando para ello dos sistemas diferentes de cultivo axénico. Por otro lado, se analizó también la actividad protoscolicida de los péptidos 11-mer utilizando co-cultivos de PSC de *E. granulosus* s.l. y células efectoras (línea celular RAW264.7). Así, se describen aquí los distintos sistemas de trabajo y sus respectivas condiciones; y se analizan y discuten los resultados obtenidos.

Objetivo Específico #3: *Evaluar in vitro la actividad antiparasitaria de los péptidos sintéticos 11-mer utilizando protoscoleces de Echinococcus granulosus s.l.*

4.1. Actividad protoscolicida intrínseca de los péptidos 11-mer: Cultivos axénicos metabólicamente estresantes.

Para analizar la potencial actividad protoscolicida intrínseca de los péptidos sintéticos 11-mer, se realizaron cultivos axénicos de PSC de *E. granulosus* s.l. en presencia de concentraciones crecientes de los péptidos en estudio, siguiendo protocolos reportados recientemente por nuestro grupo de trabajo [Miles et al., 2023; García-Luna et al., 2024]. Brevemente, en placas de 96 pocillos de fondo plano se incubaron 100 PSC con viabilidad $\geq 98\%$ en 100 μL de “medio” estéril, en presencia de concentraciones crecientes de los péptidos sintéticos 11-mer (rango: desde 0,3125 μM hasta 5,0 μM). Dichos cultivos se realizaron tanto en condiciones metabólicamente estresantes (ítem 4.1.) como en condiciones metabólicamente óptimas (ítem 4.2.); utilizando PBS y RPMI como “medios de cultivo”, respectivamente. Así, se analizaron los efectos de los péptidos sintéticos 11-mer tanto en ausencia como en presencia de nutrientes. Los cultivos metabólicamente estresantes (ausencia de nutrientes, PBS) se incubaron durante 48h a 37°C en presencia de CO₂ al 5%, mientras que los cultivos metabólicamente óptimos (presencia de nutrientes, RPMI) se incubaron en las mismas condiciones, pero durante 5 días [Miles et al., 2023]. La viabilidad de los PSC post-incubación se determinó mediante tinción con eosina siguiendo protocolos habituales [Dematteis et al., 1999].

Debido al gran número de péptidos a analizar, estos ensayos se realizaron en distintas etapas, ya que en una placa de cultivo solo fue posible ensayar 4 péptidos distintos en simultáneo, dado que cada concentración se ensayó por cuadruplicado. Por ello, los parásitos utilizados provinieron de diferentes lotes; en todos los casos con una viabilidad inicial $\geq 98\%$. En este aspecto, vale destacar que el material parasitario para obtener los PSC provino del abastecimiento de vísceras bovinas decomisadas a nivel de frigorífico, las cuales se procesaron en menos de 24h una vez recibidas en el laboratorio. Sin embargo, no se conocieron las condiciones y el tiempo de almacenamiento previo; lo cual podría, al menos parcialmente, condicionar el estado metabólico inicial de los parásitos. Además, la técnica utilizada para determinar la viabilidad de los PSC (tinción con eosina) evalúa la integridad de sus membranas, sin aportar información adicional acerca de su estado metabólico. Por lo tanto, y aunque el porcentaje de viabilidad inicial de los parásitos utilizados fue siempre cercano a 100%, no es correcto asumir que sean

homogéneos en términos de vitalidad. Por otra parte, y debido al gran volumen de muestras parasitarias requeridas, no se pudo determinar el genotipo de las mismas; lo cual podría agregar complejidad a la hora de analizar comparativamente los resultados obtenidos. Por todo lo anteriormente expuesto, existió una gran variabilidad entre los distintos lotes de parásitos utilizados, lo que generó diferencias no deseadas en la viabilidad basal post-incubación en los diferentes ensayos. Por ello, la viabilidad post-incubación de los PSC se normalizó en cada placa respecto de su control basal correspondiente (parásitos incubados, en PBS o RPMI según correspondiese, en ausencia de péptidos).

En primer lugar, se evaluó la actividad antiparasitaria intrínseca de los péptidos sintéticos 11-mer en condiciones metabólicamente estresantes para el parásito (medio: PBS). En estos ensayos, y habiendo justificado previamente la existencia de variabilidad entre los distintos lotes de parásitos, el rango de muerte observado para la condición basal varió desde 10% hasta 40%. Por ello, cabe destacar que, al mostrar los resultados normalizados respecto a la condición basal, el incremento máximo alcanzable para péptidos con excelente actividad protoscolicida (100% de muerte), oscilaría entre 2,5 y 10,0 veces según las condiciones particulares del ensayo. En la **Figura 4.1.** y en la **Figura 4.2.** se muestran los resultados obtenidos.

Por un lado, en la **Figura 4.1.** se reportan los RS para los cuales al menos uno de sus péptidos 11-mer presentó actividad antiparasitaria intrínseca significativa en el rango de concentraciones ensayadas. En ese sentido, aproximadamente la mitad de los péptidos 11-mer (13/27) exhibieron actividad antiparasitaria intrínseca; observándose además un efecto dosis-dependiente en la mayoría de los casos. Cabe destacar que, salvo CD163 y SSc5D, todos los receptores presentaron al menos un péptido 11-mer con actividad protoscolicida intrínseca en cultivos axénicos metabólicamente estresantes. Por otro lado, en la **Figura 4.2.** se muestran los resultados obtenidos para los únicos RS cuyos péptidos 11-mer derivados no presentaron actividad antiparasitaria intrínseca significativa en el rango de concentraciones ensayadas: CD163 y SSc5D.

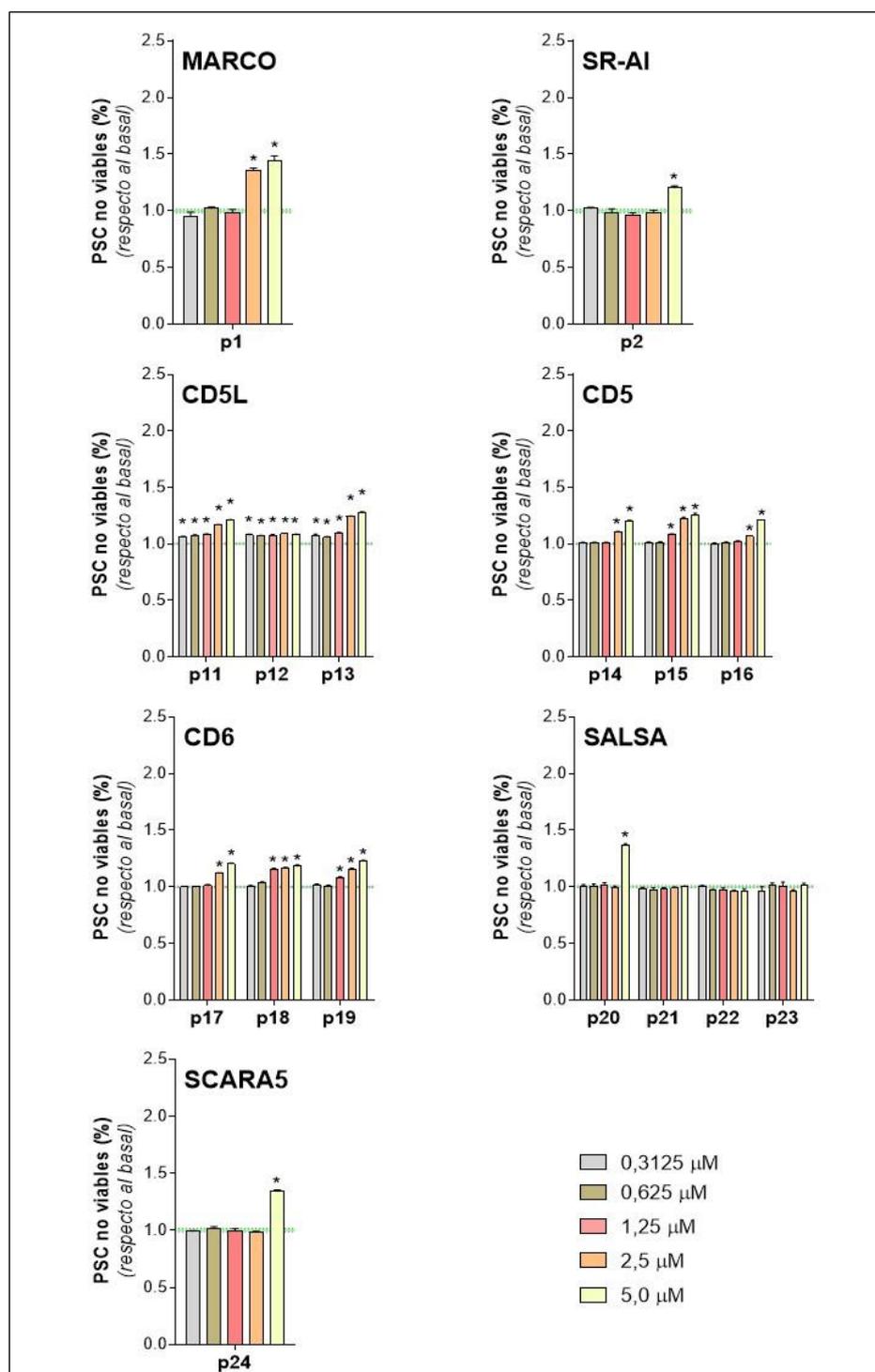


Figura 4.1. Actividad protoscolicida intrínseca de los péptidos sintéticos 11-mer en condiciones metabólicamente estresantes. Se realizaron cultivos axénicos de PSC de *E. granulosus* s.l. en presencia de concentraciones crecientes de los péptidos sintéticos y se determinó el porcentaje de muerte con respecto a la condición de referencia (sin péptido). Se representan los resultados para aquellos receptores que al menos uno de sus péptidos haya presentado actividad protoscolicida, normalizados respecto a la condición de referencia (cuyos valores se muestran como banda color verde). Para todos los casos se representa media (\pm SEM). (*) $p < 0,05$ (ANOVA, con corrección de Tukey) respecto al control de referencia.

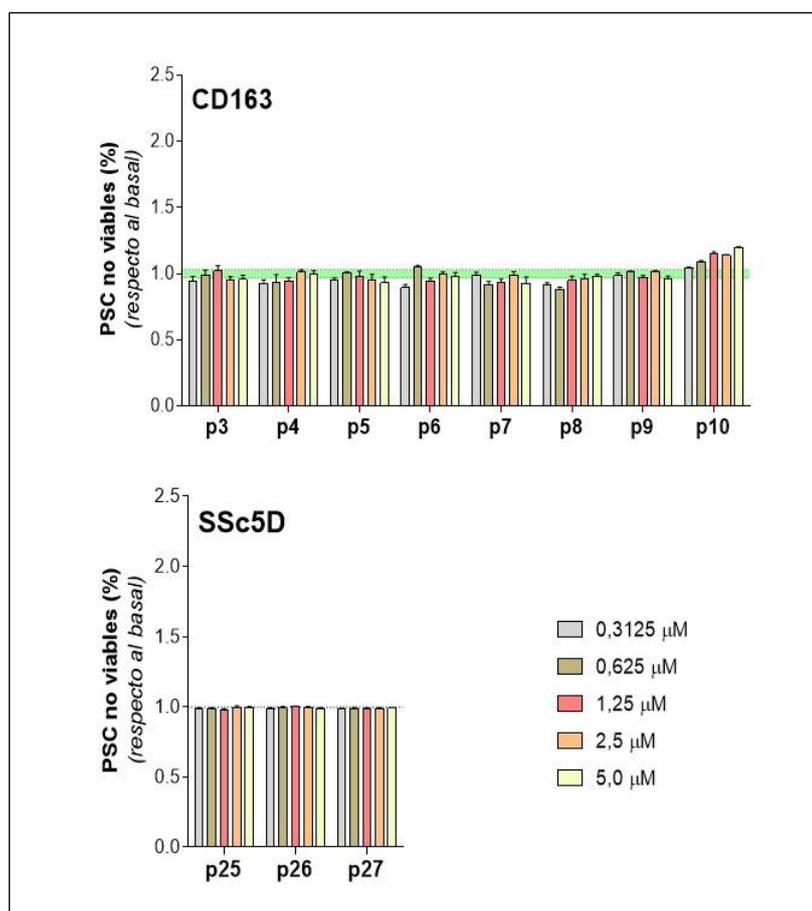


Figura 4.2. Actividad protoscolicida intrínseca de los péptidos sintéticos 11-mer en condiciones metabólicamente estresantes. Se realizaron cultivos axénicos de PSC de *E. granulosus* s.l. en presencia de concentraciones crecientes de los péptidos sintéticos y se determinó el porcentaje de muerte con respecto a la condición de referencia (sin péptido). Se representan los resultados de los péptidos que no presentaron actividad protoscolicida, agrupados por receptor, normalizados respecto a la condición de referencia (cuyos valores se muestran como banda color verde). Para todos los casos se representa media (\pm SEM). (*) $p < 0,05$ (ANOVA, con corrección de Tukey) respecto al control de referencia.

A continuación, se comparó la magnitud de la actividad protoscolicida intrínseca exhibida por los péptidos sintéticos 11-mer en cultivos axénicos metabólicamente estresantes. Para ello, y para eliminar posibles efectos no deseados debidos a la variabilidad entre los diferentes lotes de parásitos utilizados, se realizó un nuevo ensayo utilizando los 27 péptidos sintéticos 11-mer en condiciones metabólicamente estresantes (PBS, 48 horas) a una concentración única (5 μ M) frente a un mismo lote de parásitos. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 4.3.**, observándose comportamientos similares a los obtenidos previamente. Así, los péptidos que habían presentado actividad

antiparasitaria intrínseca a 5 μ M (**Figura 4.1.**), volvieron a hacerlo; con la excepción de **p24** (el único péptido sintético 11-mer derivado del receptor SCARA5). Por su parte, los péptidos **p1**, **p14**, **p15** y **p16** se destacaron por inducir incrementos superiores a 1,5 veces respecto del control basal. En este ensayo, el valor de dicho control fue de 15%, por lo que la actividad protoscolicida intrínseca de los cuatro péptidos destacados resultó, aproximadamente, en un 25% de muerte parasitaria a concentración 5 μ M.

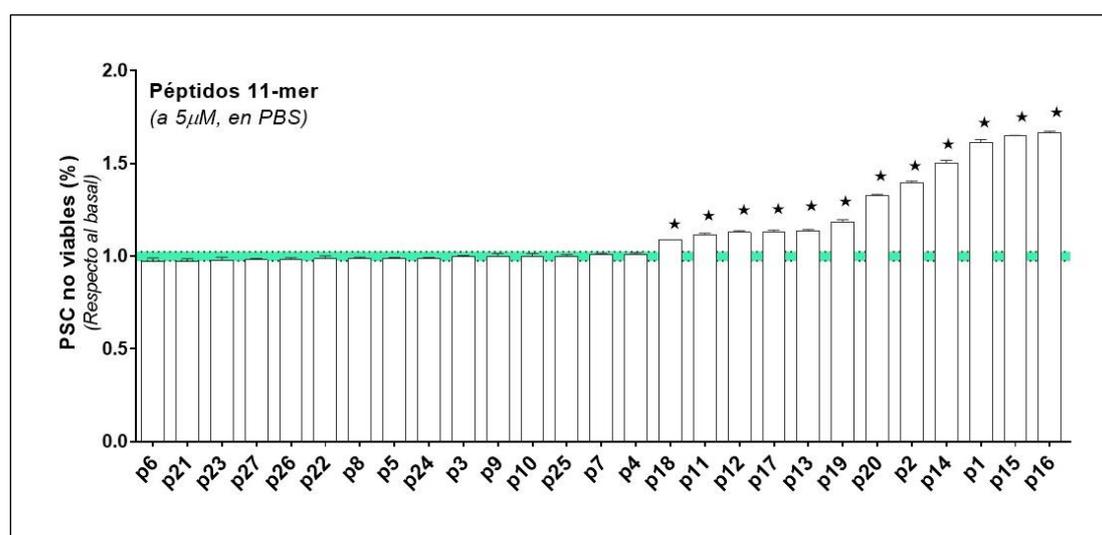


Figura 4.3. Actividad protoscolicida intrínseca de los péptidos sintéticos 11-mer a 5 μ M en PBS. Se realizó un cultivo axénico de PSC de *E. granulosus* s.l. en presencia de los péptidos sintéticos en estudio a concentración única y se determinó el porcentaje de muerte con respecto a la condición de referencia (sin péptido). Se representan los resultados para cada péptido, normalizados respecto a la condición de referencia (cuyos valores se muestran como banda color verde). Para todos los casos se representa media (\pm SEM). (*) $p < 0,05$ (ANOVA, con corrección de Tukey) respecto al control de referencia.

Estos resultados permitieron destacar dos hallazgos interesantes adicionales. Por un lado, tres de los cuatro péptidos con mejor actividad protoscolicida (**p14**, **p15** y **p16**) correspondieron a las secuencias menos similares a *pbs1* (**Tabla 3.2.**). Sin embargo, dichas diferencias parecerían no ser demasiado relevantes, ya que **p20** también mostró niveles significativos de actividad antiparasitaria intrínseca (**Figura 4.3.**). Por otro lado, tres de los cuatro péptidos con mejor actividad protoscolicida (**p14**, **p15** y **p16**) derivaron de un mismo receptor (CD5). Este resultado sugeriría que los péptidos homólogos a *pbs1* derivados de dicho receptor, retendrían la actividad protoscolicida

intrínseca de su ectodominio completo; ya que nuestro grupo reportó recientemente que la muerte de parásitos provocada por rshCD5, a su máxima concentración ensayada, aumentaba casi al doble respecto de la condición basal en cultivos axénicos metabólicamente estresantes [García-Luna et al., 2024]. Estos resultados podrían deberse a que los ligandos parasitarios capaces de interactuar con los péptidos sintéticos 11-mer derivados del receptor CD5, serían en gran medida los mismos que aquellos reconocidos por el ectodominio completo de dicho receptor. De hecho, en un trabajo publicado anteriormente por nuestro grupo, se reportó que muchos de los interactores parasitarios identificados para los ectodominios completos de los receptores CD5 y CD6, también se encontraron dentro de los interactomas parasitarios de los péptidos sintéticos 11-mer homólogos a *pbs1* derivados de sus secuencias [Miles et al., 2020]. A su vez, la mayoría de dichos interactores compartidos se correspondieron con proteínas clave tanto en el metabolismo y motilidad parasitaria, como en los mecanismos de defensa y vías de detoxificación del parásito. Por lo tanto, la fuerte actividad antiparasitaria intrínseca observada aquí para los péptidos sintéticos 11-mer derivados del receptor CD5 (**p14**, **p15** y **p16**), podría estar estrechamente relacionada con su potencial capacidad bloqueante de ligandos parasitarios relevantes.

Por último, y con la finalidad de hallar algún patrón presente en los péptidos sintéticos 11-mer potencialmente relacionado con la actividad antiparasitaria intrínseca de los mismos, se realizó la comparación de sus secuencias según correspondiesen a péptidos con o sin dicha actividad. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 4.4.**, donde se observa que, si bien existen varias posiciones aminoacídicas altamente conservadas, las mismas no parecerían influir en la actividad antiparasitaria intrínseca de los péptidos sintéticos 11-mer.

Sin embargo, al realizar el mismo tipo de análisis, pero diferenciando entre las secuencias de los péptidos sintéticos 11-mer que exhibieron alta y baja actividad antiparasitaria intrínseca, tomando la inducción de muerte parasitaria de 1,2 veces respecto del basal (20% de incremento) como punto de corte, sí se observaron posibles patrones relevantes (**Figura 4.5.**). Para dicho análisis, los péptidos **p1**, **p2**, **p14**, **p15**, **p16** y **p20** se categorizaron como de alta actividad protoscolicida intrínseca, mientras que los péptidos **p11**, **p12**, **p13**, **p17**, **p18** y **p19** se consideraron de baja actividad protoscolicida intrínseca (**Figura 4.3.**). Así, la alta actividad antiparasitaria intrínseca de

los péptidos sintéticos 11-mer, en cultivos axénicos metabólicamente estresantes, estaría afectada en presencia de residuos R (Arginina) y G (Glicina) en las posiciones 2 y 9, respectivamente (**Figura 4.5.**). Esta información podría ser de utilidad a futuro para diseñar nuevos péptidos candidatos con actividad antiparasitaria intrínseca potenciada.

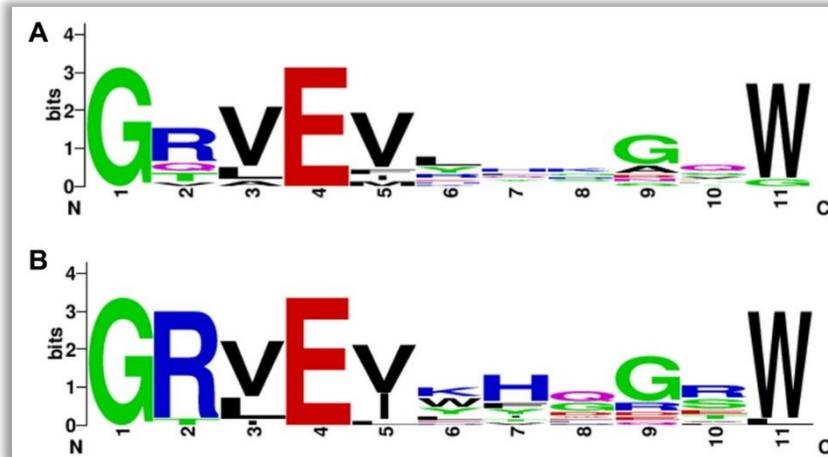


Figura 4.4. Análisis de frecuencias aminoacídicas. Se clasificaron las secuencias de los péptidos en estudio de acuerdo al efecto generado por los mismos y se compararon agrupándolas según presentaran (A) o no (B) actividad protoscolicida intrínseca.

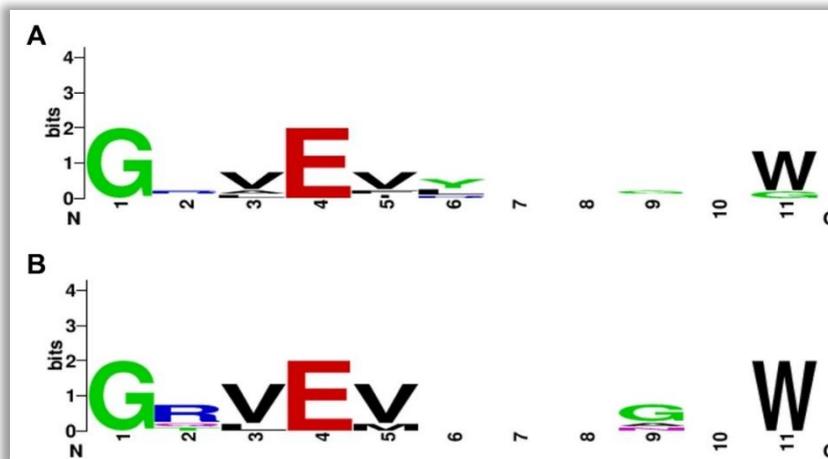


Figura 4.5. Análisis de frecuencias aminoacídicas. Se clasificaron las secuencias de los péptidos en estudio de acuerdo al efecto generado por los mismos y se compararon agrupándolas según presentaran un incremento mayor (A) o menor al 20% (B), respecto a su actividad protoscolicida intrínseca.

4.2. Actividad protoscolicida intrínseca de los péptidos 11-mer: Cultivos axénicos metabólicamente óptimos.

Luego de evaluar la actividad protoscolicida intrínseca de los péptidos sintéticos 11-mer en condiciones metabólicamente estresantes para el parásito, se evaluó dicha actividad en una condición de cultivo axénico que fuese metabólicamente “óptima”. Para ello, y como se describió previamente, los péptidos sintéticos 11-mer se ensayaron en cultivos de parásitos incubados en medio RPMI durante 5 días. Nuevamente, estos ensayos no fueron ajenos a la variabilidad existente entre diferentes lotes de parásitos, ya que, con esta estrategia, el rango de muerte parasitaria basal osciló desde 1,4% hasta 4,3%. Así, en el caso de los cultivos axénicos metabólicamente “óptimos”, el incremento máximo alcanzable para péptidos con excelente actividad protoscolicida (100% de muerte), variaría entre 20 y 70 veces según las condiciones particulares del ensayo.

Los resultados mostrados en la **Figura 4.6.** corresponden a los RS para los cuales al menos uno de sus péptidos sintéticos 11-mer mostró actividad antiparasitaria intrínseca bajo las condiciones metabólicamente “óptimas”. En este caso, dado que las condiciones del ensayo favorecieron la viabilidad parasitaria, solo 3 de los 27 péptidos exhibieron actividad protoscolicida intrínseca. Estos péptidos (**p2**, **p19** y **p20**) derivaron cada uno de un RS distinto (**SR-AI**, **CD6** y **SALSA**), respectivamente, y solo mostraron actividad protoscolicida significativa a la máxima concentración ensayada; a excepción de **p20** que evidenció tasas significativas de muerte parasitaria en forma dosis-dependiente (**Figura 4.6.**). Así, en condiciones metabólicamente “óptimas”, **p20** mostró ser el péptido con mejor actividad protoscolicida intrínseca; incrementando la muerte parasitaria hasta un 10% aproximadamente, mientras que la misma fue de 4,2% en condiciones basales.

Por último, cabe destacar que si bien **p2**, **p19** y **p20** mostraron actividad antiparasitaria intrínseca en condiciones metabólicamente estresantes, los mismos no exhibieron los mejores resultados obtenidos en condiciones metabólicamente “óptimas” (**Figura 4.3.**). Sin embargo, fueron los únicos péptidos sintéticos 11-mer capaces de inducir la muerte parasitaria en ambas condiciones; sugiriendo, por lo tanto, que lo harían a través de mecanismos particulares que les son propios.

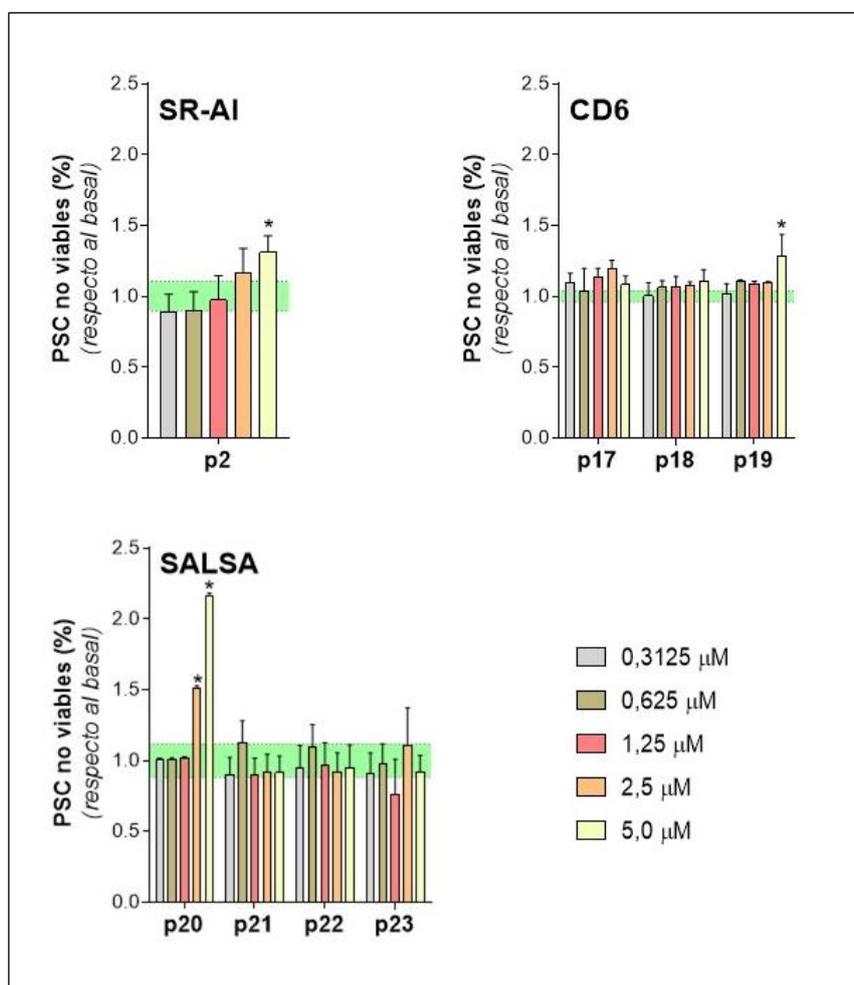


Figura 4.6. Actividad protoscolicida intrínseca de los péptidos sintéticos 11-mer en condiciones metabólicamente óptimas. Se realizaron cultivos axénicos de PSC de *E. granulosus* s.l. en presencia de concentraciones crecientes de los péptidos sintéticos y se determinó el porcentaje de muerte con respecto a la condición de referencia (sin péptido). Se representan los resultados para aquellos receptores que al menos uno de sus péptidos haya presentado actividad protoscolicida, normalizados respecto a la condición de referencia (cuyos valores se muestran como banda color verde). Para todos los casos se representa media (\pm SEM). (*) $p < 0,05$ (ANOVA, con corrección de Tukey) respecto al control de referencia.

Por su parte, en la **Figura 4.7.** se muestran los resultados obtenidos para los RS que no presentaron ningún péptido sintético 11-mer derivado de su secuencia con actividad antiparasitaria intrínseca en condiciones metabólicamente “óptimas”; al menos en el rango de concentraciones ensayadas. Cabe destacar que, en estas condiciones, los péptidos derivados de CD5 no retuvieron la actividad antiparasitaria intrínseca exitosamente observada para rshCD5 [García-Luna et al., 2024].

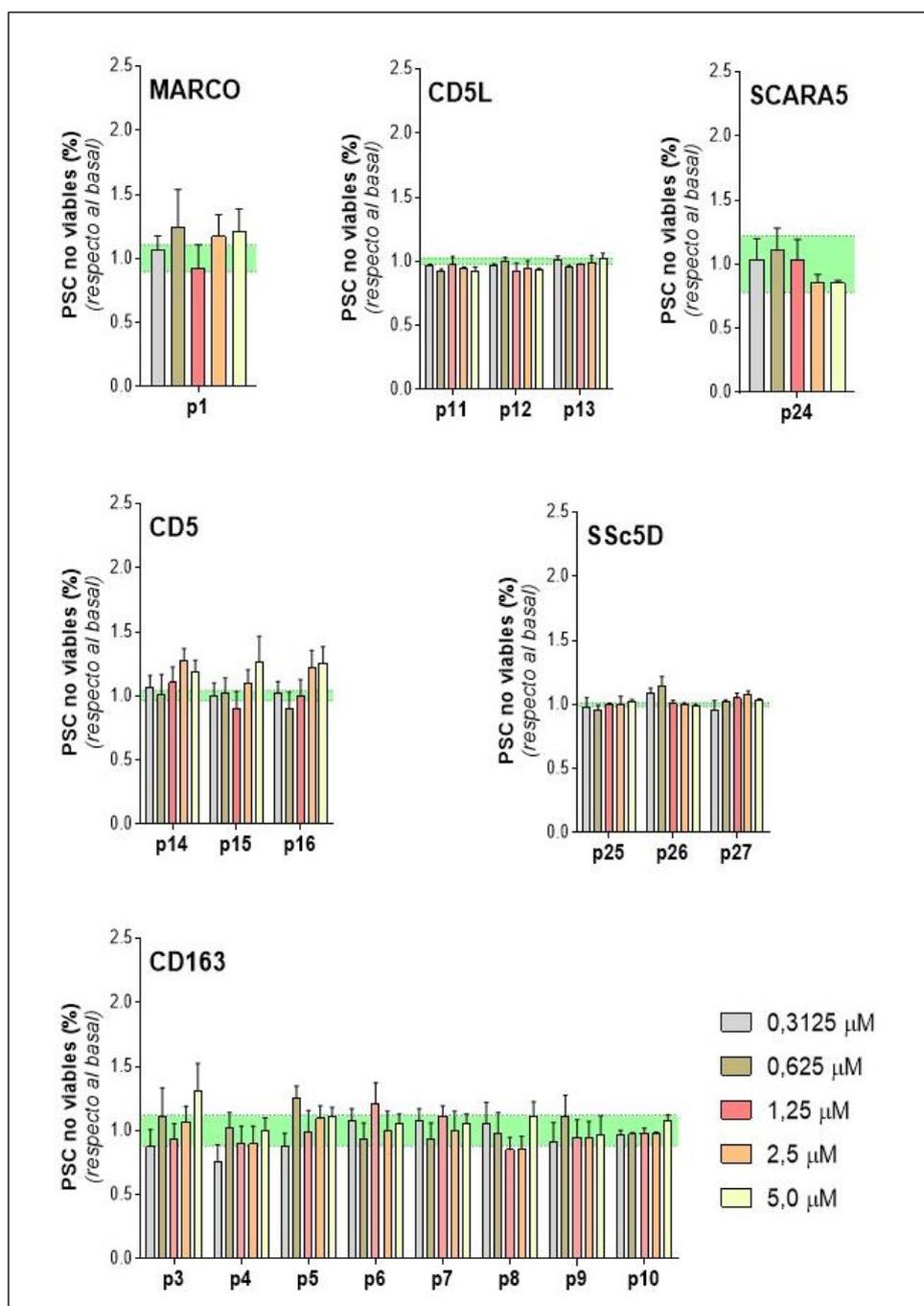


Figura 4.7. Actividad protoscolicida intrínseca de los péptidos sintéticos 11-mer en condiciones metabólicamente óptimas. Se realizaron cultivos axénicos de PSC de *E. granulosus* s.l. en presencia de concentraciones crecientes de los péptidos sintéticos y se determinó el porcentaje de muerte con respecto a la condición de referencia (sin péptido). Se representan los resultados de los péptidos que no presentaron actividad protoscolicida, agrupados por receptor, normalizados respecto a la condición de referencia (cuyos valores se muestran como banda color verde). Para todos los casos se representa media (\pm SEM). (*) $p < 0,05$ (ANOVA, con corrección de Tukey) respecto al control de referencia.

Finalmente, y debido a limitaciones logísticas de abastecimiento de material hidático y de disponibilidad de reactivos, se decidió no repetir este ensayo a concentración única de péptidos (5 μM) utilizando un único lote de parásitos; de manera análoga a lo mostrado en la **Figura 4.3.** para los cultivos metabólicamente estresantes. En este sentido, consideramos que la realización futura de dicho ensayo sería de gran utilidad para poder extraer conclusiones adicionales, ya que la dispersión en viabilidad parasitaria observada en los cultivos metabólicamente “óptimos” fue significativamente mayor que la experimentada en los cultivos metabólicamente estresantes.

4.3. Actividad protoscolicida de los péptidos 11-mer en presencia de células efectoras.

Con el objetivo de evaluar la potencial actividad antiparasitaria de los péptidos sintéticos 11-mer en sistemas más complejos, se realizaron co-cultivos de PSC de *E. granulosus* s.l. con células de la línea RAW264.7 en presencia de una concentración fija de péptidos. Para ello, en placas de 96 pocillos de fondo plano se sembraron, por pocillo, 2×10^5 células RAW264.7 junto con 50 PSC con una viabilidad inicial del 100%, en presencia de 20 $\mu\text{g/mL}$ de cada péptido sintético 11-mer. Las incubaciones se realizaron en medio de cultivo DMEM alto en glucosa durante 72h a 37°C en atmósfera controlada de CO_2 . Como controles se utilizaron: (i) células RAW264.7 solas en medio de cultivo, (ii) PSC solos en medio de cultivo, (iii) células RAW264.7 incubadas con PSC en medio de cultivo (condición de referencia), (iv) células RAW264.7 en presencia de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS junto con PSC en medio de cultivo (control positivo), y (v) PSC en medio de cultivo en presencia de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS. Luego, se tomaron fotografías de cada pocillo (aumento x10) utilizando un microscopio digital con cámara acoplada. Finalmente, los PSC se clasificaron de acuerdo con procedimientos previamente desarrollados por nuestro grupo, siguiendo criterios morfológicos de integridad física [Mourglia-Ettlin et al., 2016b], y los resultados obtenidos se normalizaron respecto de la condición de referencia; es decir, células RAW264.7 co-incubadas con PSC en ausencia de péptidos (control iii). Cabe destacar que, para poder utilizar un mismo lote de parásitos, así como células RAW264.7 con el mismo número de pasajes, en este ensayo se utilizó una única concentración de péptidos. Por lo tanto, los valores de muerte

parasitaria en la condición de referencia y en el control positivo fueron únicos, correspondiendo aproximadamente a $2,6 \pm 0,7\%$ y $6,0 \pm 0,6\%$, respectivamente.

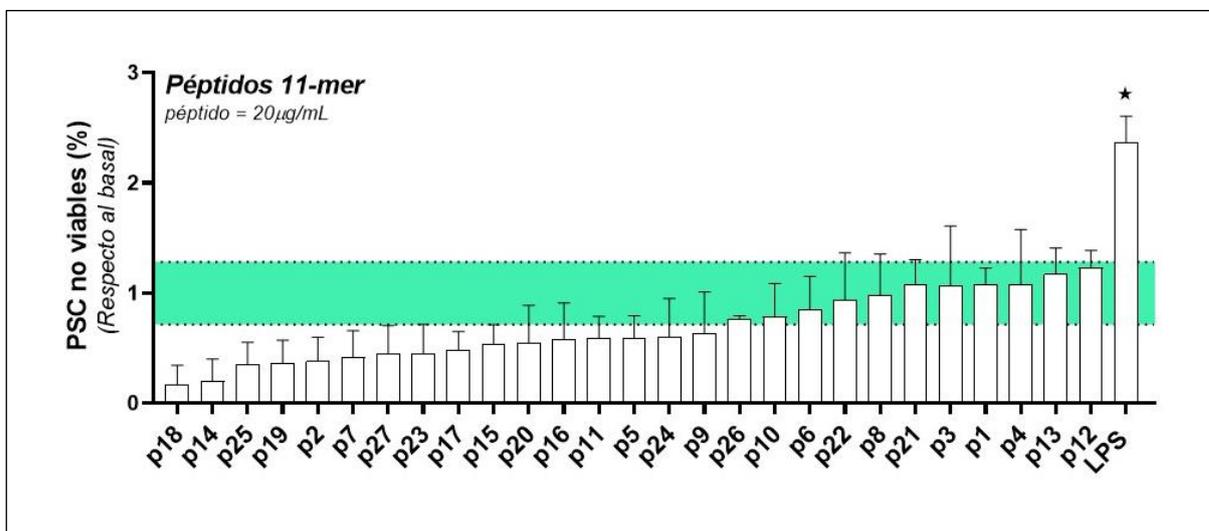


Figura 4.8. Co-cultivo de células RAW264.7 con PSC de *E. granulosus* s. l. Se realizaron co-cultivos de células RAW264.7 con PSC de *E. granulosus* s.l. ensayados en presencia de 20 µg/mL de péptidos, y luego se determinó el porcentaje de muerte parasitaria. Como control basal se ensayaron co-cultivos en ausencia de péptidos, mientras que como control positivo se realizaron co-cultivos en presencia de LPS. Los resultados se muestran normalizados respecto del control basal (cuyos valores se muestran como banda color verde). Para todos los casos se representa media (\pm SEM). (*) $p < 0,05$ (ANOVA, con corrección de Tukey) respecto del control basal.

El motivo por el cual, en los sistemas de co-cultivo, no se retuvo la actividad antiparasitaria intrínseca de los péptidos observada en cultivos axénicos, se desconoce; si bien se presume que las células RAW264.7 podrían interferir y/o dificultar la interacción entre los péptidos y los parásitos. Además, la presencia de suero fetal bovino, además de las células RAW264.7, podría contribuir a la degradación acelerada de los péptidos sintéticos 11-mer. Así, el abanico de posibilidades para estos resultados negativos sería demasiado amplio como para ser analizado detalladamente en la presente tesis, si bien consideramos que, a futuro, sería por demás relevante explorar este hallazgo inesperado. En este sentido, se debería evaluar otro número de parásitos y/o de células RAW264.7, modificar el tiempo de incubación y/o activar las células con LPS previo a la incubación con los parásitos y los péptidos. Esto último permitiría evaluar si los péptidos son capaces de modificar la actividad protoscolicida de macrófagos primarios (activados) previamente reportada [Dematteis et al., 2003] y

demostrada en la presente tesis mediante el uso de células RAW264.7 en presencia de LPS como control positivo (**Figura 4.8.**).

En suma, mediante la ejecución del Objetivo Específico #3 de la presente tesis, se evaluó la actividad antiparasitaria intrínseca de los péptidos sintéticos 11-mer en dos sistemas de cultivo axénico de PSC de *E. granulosus* s.l., así como en co-cultivos de parásitos con células efectoras (RAW264.7). Los resultados obtenidos mostraron que 12 de los 27 péptidos presentaron actividad antiparasitaria intrínseca en cultivos axénicos bajo condiciones metabólicamente estresantes; al menos en la máxima concentración ensayada. Por su parte, 3 de estos 12 péptidos retuvieron su actividad antiparasitaria intrínseca en cultivos axénicos bajo condiciones metabólicamente “óptimas”; mientras que ninguno presentó actividad antiparasitaria significativa en sistemas de co-cultivo. Estos resultados sugirieron que, al menos algunos de los 27 péptidos sintéticos 11-mer en estudio, podrían ser útiles para el desarrollo de intervenciones profilácticas frente a la EQ secundaria.

Capítulo 5.

Efectos inmunomoduladores inducidos por los péptidos sintéticos 11-mer sobre cultivos celulares estimulados con antígenos parasitarios.

Resultados y discusión.

En el presente capítulo, se abordan los principales resultados relacionados con la caracterización *in vitro* de los efectos inmunomoduladores inducidos por los péptidos sintéticos 11-mer sobre cultivos celulares estimulados con antígenos parasitarios (Objetivo específico #4). En este sentido, se describen los distintos sistemas de trabajo y sus respectivas condiciones; y se describen y analizan los resultados obtenidos. Globalmente, se realizaron estudios tanto con la línea celular de macrófagos murinos RAW264.7. como con cultivos primarios de PEC obtenidas de ratones Balb/c vírgenes. Por un lado, sobre los cultivos de PEC se evaluó el efecto de los péptidos sintéticos 11-mer sobre la producción de citoquinas y de anticuerpos (específicos y polireactivos) inducida por antígenos tegumentarios de PSC de *E. granulosus* s.l. Por otro lado, sobre los cultivos de células RAW264.7. se evaluó el efecto de los péptidos sintéticos 11-mer sobre su interacción física con antígenos tegumentarios de PSC de *E. granulosus* s.l.; así como el efecto sobre la producción de citoquinas y de óxido nítrico inducida por dichos antígenos.

Objetivo Específico #4: *Caracterizar in vitro los efectos inmunomoduladores de los péptidos sintéticos 11-mer sobre cultivos celulares estimulados con antígenos parasitarios.*

5.1. Efecto de los péptidos 11-mer sobre la secreción de citoquinas por parte de PEC murinas estimuladas con antígenos parasitarios.

Dado que los ensayos *in vivo* para evaluar el potencial uso profiláctico y/o terapéutico de los péptidos diseñados, se realizarían utilizando el modelo murino de EQ secundaria [González-Porcile et al., 2024], y que el sitio anatómico en el cual se desarrolla la infección en dicho modelo es la cavidad peritoneal, se procedió a trabajar con PEC totales obtenidas de ratones Balb/c vírgenes (cepa altamente susceptible a la infección [Mourgliia-Ettlin et al., 2016a]). Con las PEC se evaluó el efecto de los péptidos sintéticos 11-mer tanto sobre su respuesta de citoquinas como de anticuerpos tras el estímulo con antígenos parasitarios contenidos en un extracto soluble denominado PSEx; compuesto mayoritariamente por proteínas presentes en el tegumento de PSC de *E. granulosus* s.l. [Miles et al., 2019].

En primer lugar, se determinó la producción de las citoquinas IL-6, IL-10 y TNF- α en sobrenadantes de cultivo de PEC estimuladas con PSEx; en presencia o ausencia de los péptidos sintéticos 11-mer en estudio. Para ello, inicialmente se realizó un ensayo de optimización para definir la concentración de PSEx a utilizar. Así, se incubaron 3×10^5 PEC por pocillo, durante 72h, en presencia de concentraciones crecientes de PSEx (10, 20 y 40 $\mu\text{g/mL}$), y luego, mediante el uso de *kits* comerciales para ELISA de captura, se determinó la concentración de cada citoquina en los sobrenadantes de cultivo. Finalmente, y buscando una relación óptima entre respuesta y uso racionalizado de PSEx, se seleccionó 15 $\mu\text{g/mL}$ de PSEx como concentración de estímulo para realizar los ensayos.

A continuación, se realizaron cultivos de PEC estimuladas con 15 $\mu\text{g/mL}$ de PSEx en presencia de una concentración fija (45 $\mu\text{g/mL}$) de cada uno de los péptidos sintéticos 11-mer. Como controles se ensayaron las siguientes condiciones: (i) control basal (PEC solas en medio de cultivo), (ii) control de referencia (PEC estimuladas únicamente con 15 $\mu\text{g/mL}$ de PSEx), y (iii) control positivo (PEC estimuladas únicamente con 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS). Los resultados obtenidos para el control de referencia del ensayo fueron (promedio \pm SEM): 1.212 \pm 99 pg/mL para IL-6 y 278 \pm 119 pg/mL para IL-10; sin detección significativa de TNF- α . En la **Figura 5.1.** se muestran los resultados obtenidos, normalizados respecto del control de referencia (salvo para TNF- α , para la cual se reportaron los valores de concentración detectados).

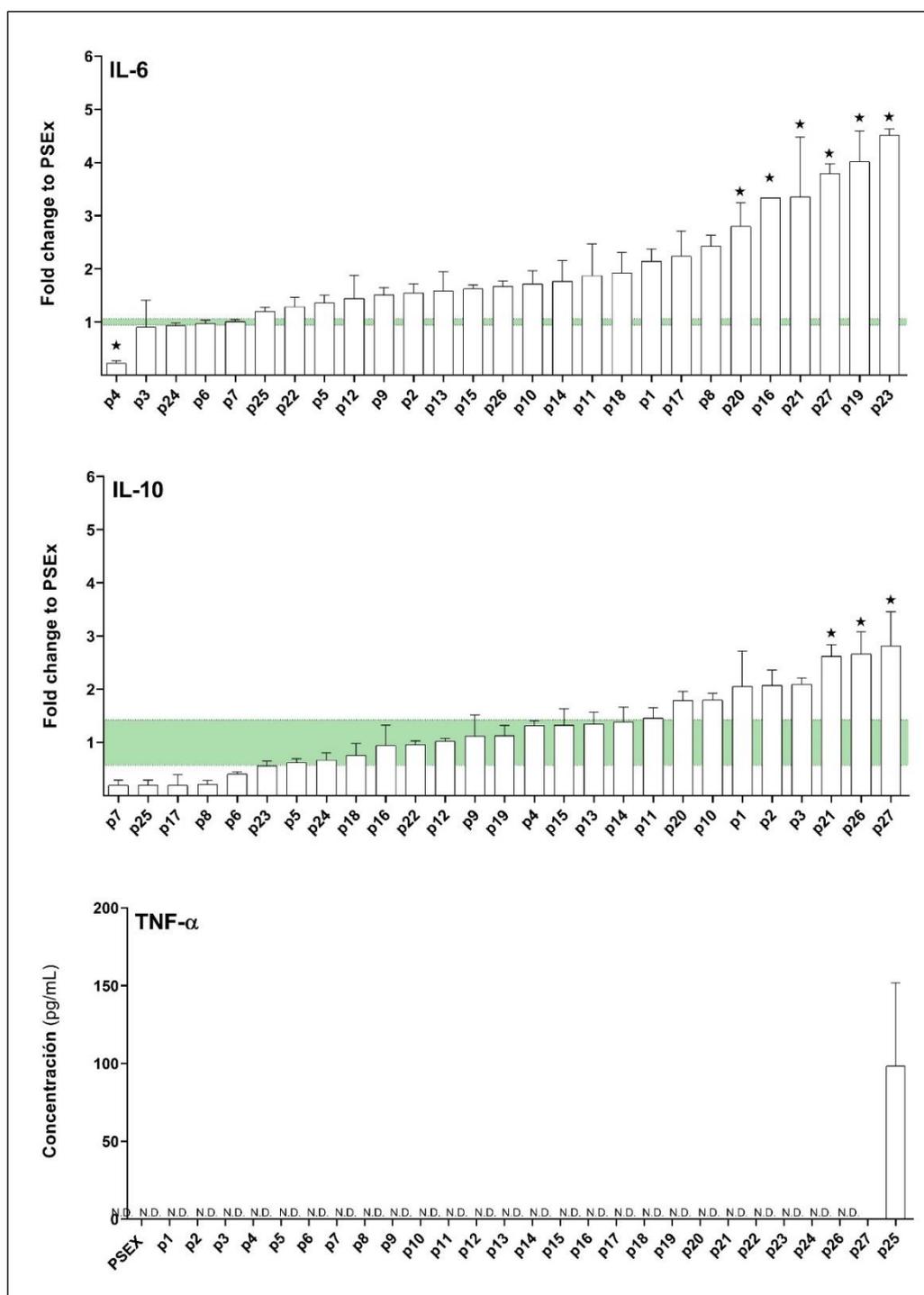


Figura 5.1. Determinación de IL-6, IL-10 y TNF- α en sobrenadantes de cultivo de PEC. Las PEC se estimularon con PSEx (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en presencia de los péptidos (45 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se determinó la concentración de las respectivas citoquinas mediante ensayo de ELISA. Como controles se utilizaron: (i) PEC solas en medio de cultivo, (ii) PEC estimuladas únicamente con PSEx (control de referencia), y (iii) PEC estimuladas con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, control positivo). Para IL-6 e IL-10, los resultados se muestran normalizados respecto al control de referencia (cuyos valores se muestran como banda color verde). Para TNF- α se representan sus valores de concentración. Para todos los casos se representa media (\pm SEM). (*) $p < 0,05$ (ANOVA, con corrección de Tukey) respecto al control de referencia.

En cuanto a la producción de IL-6, en la **Figura 5.1.** se observa que 6 de los 27 péptidos sintéticos 11-mer (**p16**, **p19**, **p20**, **p21**, **p23** y **p27**) potenciaron significativamente su producción en cultivos de PEC estimulados con PSEx; destacándose **p19**, **p23** y **p27** por ser los mayores potenciadores. Resulta interesante destacar que, de los 6 péptidos mencionados, la mitad derivaron del receptor SALSA (**p20**, **p21** y **p23**). Asimismo, y aunque **p20**, **p21** y **p22** conformaron un grupo de altísima homología entre sí (**Tabla 3.2.** y **Figura 3.3.**), **p22** fue el único de ellos que no potenció la producción de IL-6 en cultivos de PEC estimulados con PSEx. Por su parte, únicamente el péptido **p4** (uno de los 8 péptidos sintéticos 11-mer derivados del receptor CD163) redujo significativamente la producción de IL-6 (**Figura 5.1.**).

Por otro lado, en la **Figura 5.1.** también se observa que solo 3 de los 27 péptidos sintéticos 11-mer (**p21**, **p26** y **p27**) potenciaron significativamente la producción de IL-10 en cultivos de PEC estimulados con PSEx, mientras que ninguno la redujo. En este sentido, resulta interesante destacar que 2 de ellos también indujeron la producción de IL-6 en dichos cultivos (**p21** y **p27**). Asimismo, **p20** y **p22**, péptidos con altísima homología respecto a **p21** como se destacó previamente (**Tabla 3.2.** y **Figura 3.3.**), no modificaron la producción de IL-10 en cultivos de PEC estimulados con PSEx, lo cual podría sugerir que las pequeñas diferencias en secuencia existentes entre ellos estarían involucradas en dicho fenómeno.

Finalmente, **p25** fue el único péptido capaz de potenciar la producción de TNF- α en cultivos de PEC estimulados con PSEx; aunque la ausencia de niveles apreciables de TNF- α en la gran mayoría de los casos (incluido el control de referencia), restó fiabilidad a dicho resultado, dado que previamente nuestro grupo reportó que PEC (de ratones C57Bl/6 vírgenes) inducen la producción de TNF- α en respuesta al estímulo con PSEx [Mourglia-Ettlin et al., 2018]. A futuro, este ensayo debería repetirse para poder extraer conclusiones más confiables respecto de la producción de TNF- α por parte de PEC estimuladas con PSEx, así como del efecto que los péptidos sintéticos 11-mer pudiesen tener sobre la misma.

Por último, y como se procedió previamente, se compararon, nuevamente sin éxito, diversas características de los péptidos (propiedades fisicoquímicas, modelos estructurales, perfiles de homología, etc.) en búsqueda de un patrón que pudiese explicar las diferencias observadas sobre la producción de citoquinas. Además, y debido

a las limitaciones técnicas impuestas por el *software* de análisis, solo se pudo realizar la comparación de las frecuencias de residuos aminoacídicos presentes en las secuencias de los péptidos sintéticos 11-mer agrupados según potenciaran, o no, la producción de IL-6. Sin embargo, no se encontró un patrón claro de asociación al respecto (**Figura 5.2.**).

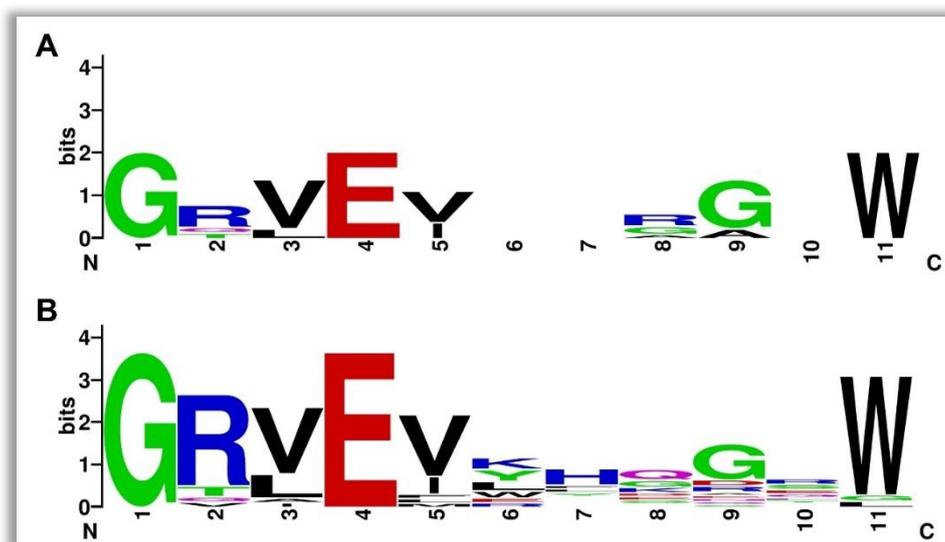


Figura 5.2. Análisis de frecuencias aminoacídicas. Se clasificaron las secuencias de los péptidos en estudio de acuerdo al efecto generado por los mismos y se compararon agrupándolas según modularan (A) o no (B) la producción de IL-6.

5.2. Efecto de los péptidos 11-mer sobre la secreción de anticuerpos por parte de PEC murinas estimuladas con antígenos parasitarios.

Luego de analizar el efecto de los péptidos sintéticos 11-mer sobre el perfil de citoquinas producido por PEC estimuladas con PSEx, y considerando que los linfocitos B, principalmente B1, son una población mayoritaria dentro de dichas células y son capaces de responder rápidamente produciendo anticuerpos [Mattos et al., 2024], se evaluó el efecto de los péptidos sobre la producción de anticuerpos específicos y polireactivos (sAc y pAc, respectivamente). En particular, los pAc constituyen un componente importante del repertorio de anticuerpos tanto naturales como tempranamente inducidos; los cuales han sido sugeridos por nuestro grupo como responsables, al menos parcialmente, de los fenómenos de resistencia del hospedero frente a la EQ, tanto en humanos como en el modelo murino [García-Luna et al., 2021]. Además, nuestro grupo reportó recientemente que la inoculación de ratones Balb/c con

PSEx pre-incubado con rshCD5 o rshCD6 potencia la inducción temprana de pAc potencialmente útiles en la respuesta antiparasitaria experimental [García-Luna et al., 2024].

En este sentido, el efecto de los péptidos sintéticos 11-mer sobre la producción de sAc y pAc se evaluó mediante ensayos de ELISA indirecto analizando los isotipos IgM, IgA e IgG en sobrenadantes de cultivo obtenidos de PEC estimuladas con PSEx en las mismas condiciones en que se realizó el estudio de la producción de citoquinas (es decir; 3×10^5 PEC por pocillo incubadas durante 72h en presencia de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PSEx y 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada uno de los péptidos). Como controles se utilizaron las siguientes condiciones: (i) control basal (solo PEC en medio de cultivo), (ii) control de referencia (PEC estimuladas únicamente con 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PSEx), y (iii) control positivo (PEC estimuladas únicamente con 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS).

Para la determinación de sAc se utilizaron placas de microtitulación sensibilizadas con antígenos somáticos de PSC de *E. granulosus* s.l. (fracción denominada SPE [Mourglia-Ettlin et al., 2016a]), mientras que para determinar pAc se utilizaron placas de microtitulación sensibilizadas con el hapteno 2,4-dinitrofenol (DNP) acoplado a BSA (DNP-BSA). El título de anticuerpos específicos para DNP-BSA ha sido utilizado frecuentemente como parámetro sustituto para medir respuestas de pAc [Gunti & Notkins, 2015]; inclusive en el contexto de la infección por *E. granulosus* s.l. [García-Luna et al., 2021; 2024]. Finalmente, el título de sAc y pAc se definió como el valor de absorbancia de las muestras ensayadas todas simultáneamente a una misma dilución no saturante; y se reportaron normalizadas respecto del control de referencia correspondiente. En la **Tabla 5.1.** se reportan los resultados obtenidos para los controles ensayados.

Tabla 5.1. Títulos de sAc y pAc para las condiciones control. Se reportan los valores de promedio \pm SEM de los respectivos controles ensayados por triplicado.

CONTROLES		Basal	Referencia	Positivo
sAc (UA/mL)	IgM	0,063 \pm 0,010	0,117 \pm 0,011	0,097 \pm 0,005
	IgA	0,122 \pm 0,002	0,174 \pm 0,002	0,128 \pm 0,008
	IgG	0,099 \pm 0,007	0,099 \pm 0,005	0,103 \pm 0,003
pAc (UA/mL)	IgM	0,100 \pm 0,007	0,183 \pm 0,031	0,161 \pm 0,012
	IgA	0,124 \pm 0,015	0,269 \pm 0,003	0,072 \pm 0,009
	IgG	0,061 \pm 0,004	0,062 \pm 0,003	0,062 \pm 0,005

En la **Figura 5.3.** se muestran los resultados obtenidos en relación al efecto de los péptidos sintéticos 11-mer sobre la producción de sAc por parte de PEC estimuladas con PSEx. Para sIgM se observó que, si bien ningún péptido redujo su producción, 4 de los 27 péptidos ensayados la potenciaron (**p17**, **p23**, **p24** y **p25**). Por su parte, los péptidos **p3** y **p11** redujeron significativamente la producción tanto de sIgA como de sIgG por parte de PEC estimuladas con PSEx. Por el contrario, el péptido **p25** fue el único en potenciar la producción de sIgA, y junto a **p26** y **p27**, indujeron además la secreción de sIgG. Así, resulta interesante destacar que **p25** (péptido derivado del receptor SSc5D) fue el único en potenciar la producción de los tres isotipos de sAc analizados; sugiriendo un papel importante para el mismos en la modulación de las respuestas humorales específicas desencadenadas por PSEx.

Para profundizar en los motivos que expliquen las diferencias observadas sobre la modulación diferencial ejercida por ciertos péptidos sintéticos 11-mer sobre la producción de sAc, se compararon, sin éxito, diversas características de los mismos (propiedades fisicoquímicas, modelos estructurales, perfiles de homología, etc.). Sin embargo, se pudieron extraer algunas conclusiones luego de comparar las frecuencias de residuos aminoacídicos presentes en las secuencias de los péptidos agrupándolos según potenciaron, o no, la producción de sIgM. Así, en la **Figura 5.4.** se observa que la presencia de un residuo R (Arginina) en posición 2, de un residuo V (Valina) en posición 3 o 5, y de un residuo G (Glicina) en posición 9, perjudicaría la modulación positiva de la secreción de sIgM. Sin embargo, la fiabilidad de estas conclusiones debe tomarse con cautela ya que derivan de un análisis comparativo en el cual uno de los grupos analizados (péptidos potenciadores de la respuesta sIgM) se compuso solo de

cuatro casos; encontrándose así en el límite inferior aceptable establecido por el *software* empleado. De hecho, por este motivo, no se pudieron realizar estudios análogos para la producción de sIgA y sIgG.

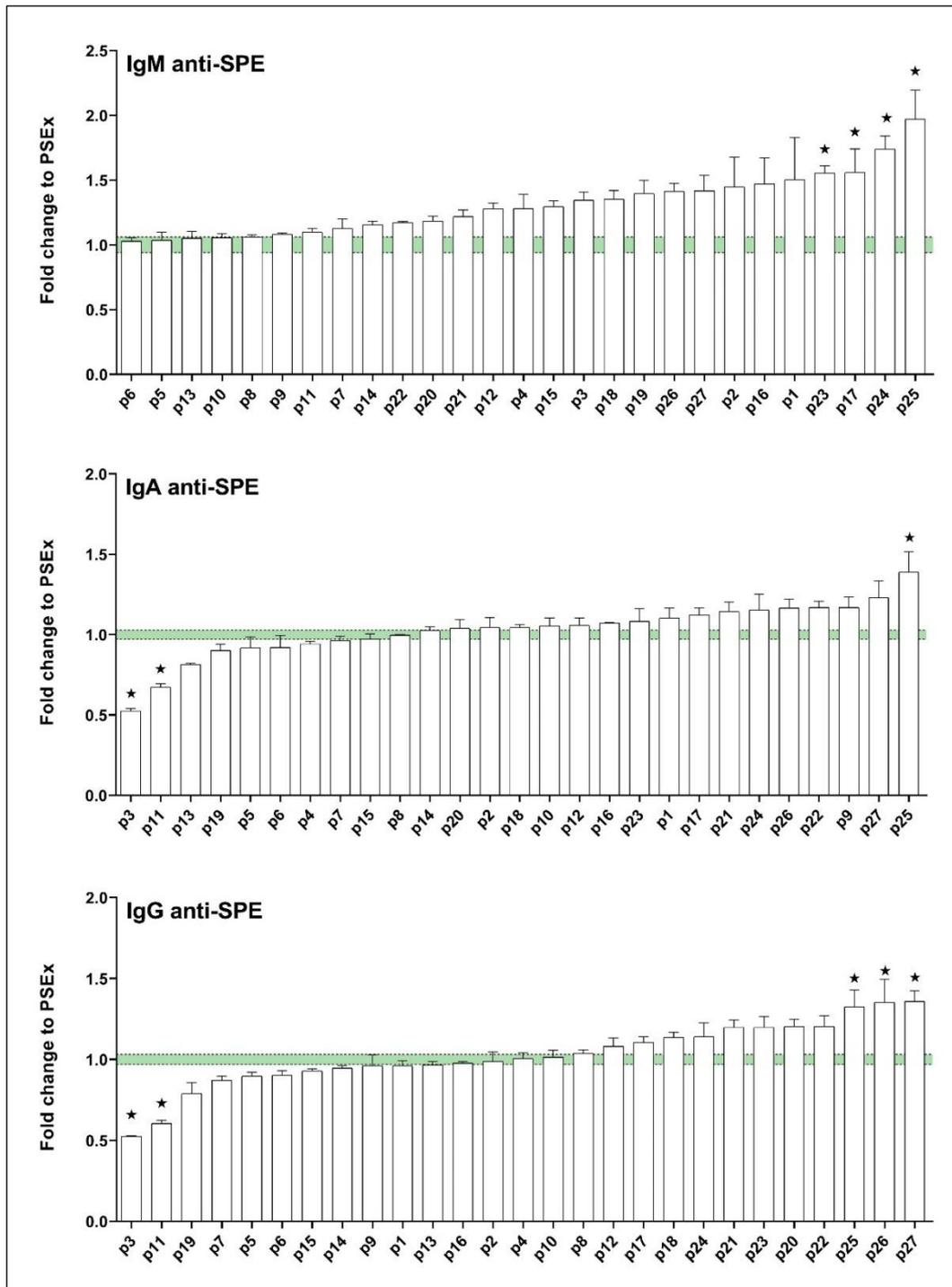


Figura 5.3. Determinación de anticuerpos específicos anti-SPE (IgM, IgA e IgG). Las PEC se estimularon con PSEx (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en presencia de los péptidos (45 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se determinó el título de los respectivos isotipos ensayo de ELISA. Como controles se utilizaron: (i) PEC solas en medio de cultivo, (ii) PEC estimuladas únicamente con PSEx (control de referencia), y (iii) PEC estimuladas con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, control positivo). Los resultados se muestran normalizados respecto a la condición de referencia (cuyos valores se muestran como banda color verde). Para todos los casos se representa media (\pm SEM). (*) $p < 0,05$ (ANOVA, con corrección de Tukey) respecto al control de referencia.

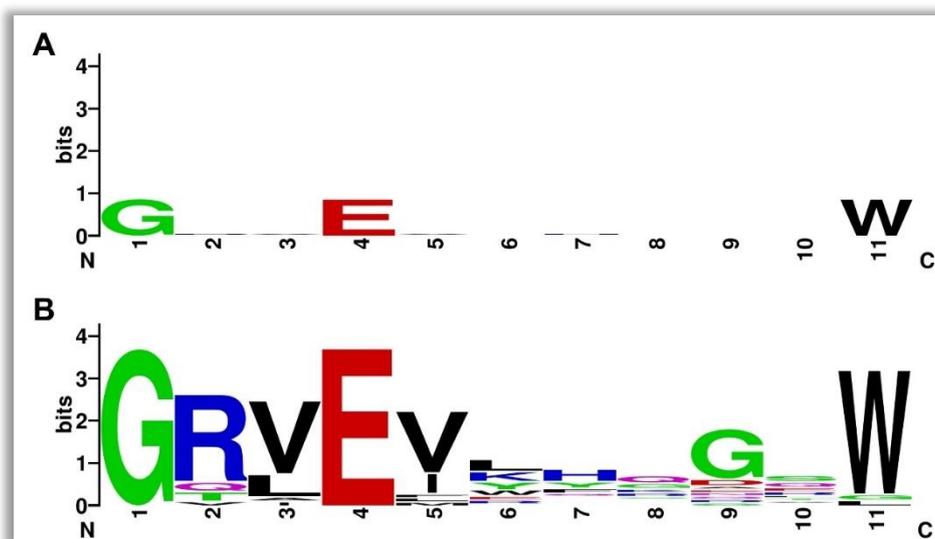


Figura 5.4. Análisis de frecuencias aminoacídicas. Se clasificaron las secuencias de los péptidos 11-mer en estudio de acuerdo al efecto generado, agrupándolos según modularon (A) o no (B) la producción de sIgM.

Por otro lado, en la **Figura 5.5.** se muestran los resultados de un análisis análogo de frecuencias de residuos aminoacídicos, presentes en las secuencias de los péptidos 11-mer en estudio, agrupándolos según potenciaron (**Figura 5.5.A**), o no (**Figura 5.5.B**), la producción de sAc; independientemente de los isotipos analizados. Así, se observó que la presencia de un residuo H (Histidina) en posición 7, la ausencia de un residuo G (Glicina) en posición 9 y la presencia de un residuo R (Arginina) en la posición 10, favorecerían la modulación positiva de la secreción de sAc. De hecho, analizando las secuencias de los únicos dos péptidos 11-mer que disminuyeron la producción de sAc (**p3** y **p11**), ninguno presentó un residuo H (Histidina) y R (Arginina) en la posición 9 y 10, respectivamente; reafirmando así que la presencia de dichos aminoácidos en las posiciones mencionadas favorecería la modulación positiva

de la secreción de sAc. Sin embargo, para el residuo G (Glicina) en la posición 9 el análisis no sería concluyente, ya que, a diferencia de **p11**, **p3** no lo presenta.

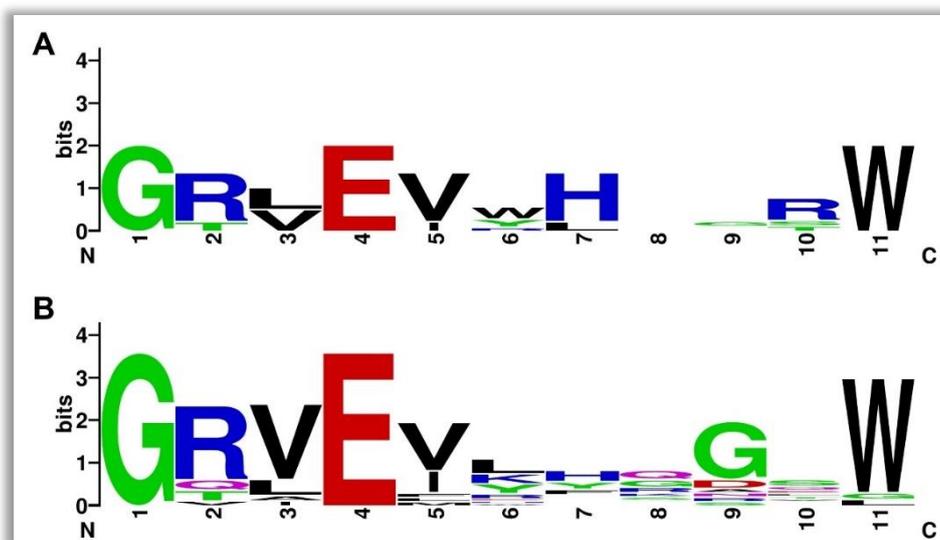


Figura 5.5. Análisis de frecuencias aminoacídicas. Se clasificaron las secuencias de los péptidos 11-mer en estudio de acuerdo al efecto generado, agrupándolos según modularon (A) o no (B) la producción de sAc (independientemente de los isotipos analizados).

A continuación, en la **Figura 5.6.** se resumen los resultados obtenidos para la evaluación del efecto de los péptidos sintéticos 11-mer sobre la producción de pAc por parte de cultivos de PEC estimulados con PSEx. Para pIgM se observó que **p10** fue el único péptido que aumentó significativamente su producción; mientras que **p9**, **p25** y **p27** exhibieron comportamientos similares, pero para la secreción de pIgA. Por el contrario, ninguno de los 27 péptidos en estudio moduló la producción de pIgG; a la vez que no se observaron casos de reducción significativa en la secreción de pAc independientemente del isotipo analizado. Así, se concluyó que los péptidos sintéticos 11-mer serían mejores moduladores de las respuestas de sAc que de las respuestas de pAc desencadenadas tras estímulo con PSEx; destacándose el péptido **p25** (derivado del receptor SSc5D) por ser el único que potenció todas las respuestas de sAc (**Figura 5.3.**) a la vez que también moduló positivamente la producción de pIgA (**Figura 5.6.**).

Por su parte, y en línea con los análisis previos, se compararon, nuevamente sin éxito, diversas características de los péptidos sintéticos 11-mer (propiedades fisicoquímicas, modelos estructurales, perfiles de homología, etc.) que pudiesen explicar las diferencias observadas sobre la modulación diferencial ejercida por ciertos

péptidos sobre la producción de pAc. Además, y como ya se ha comentado, debido a los requerimientos mínimos impuestos por el *software* de análisis, no se pudieron realizar los análisis de comparación de las frecuencias de residuos aminoacídicos para estos casos.

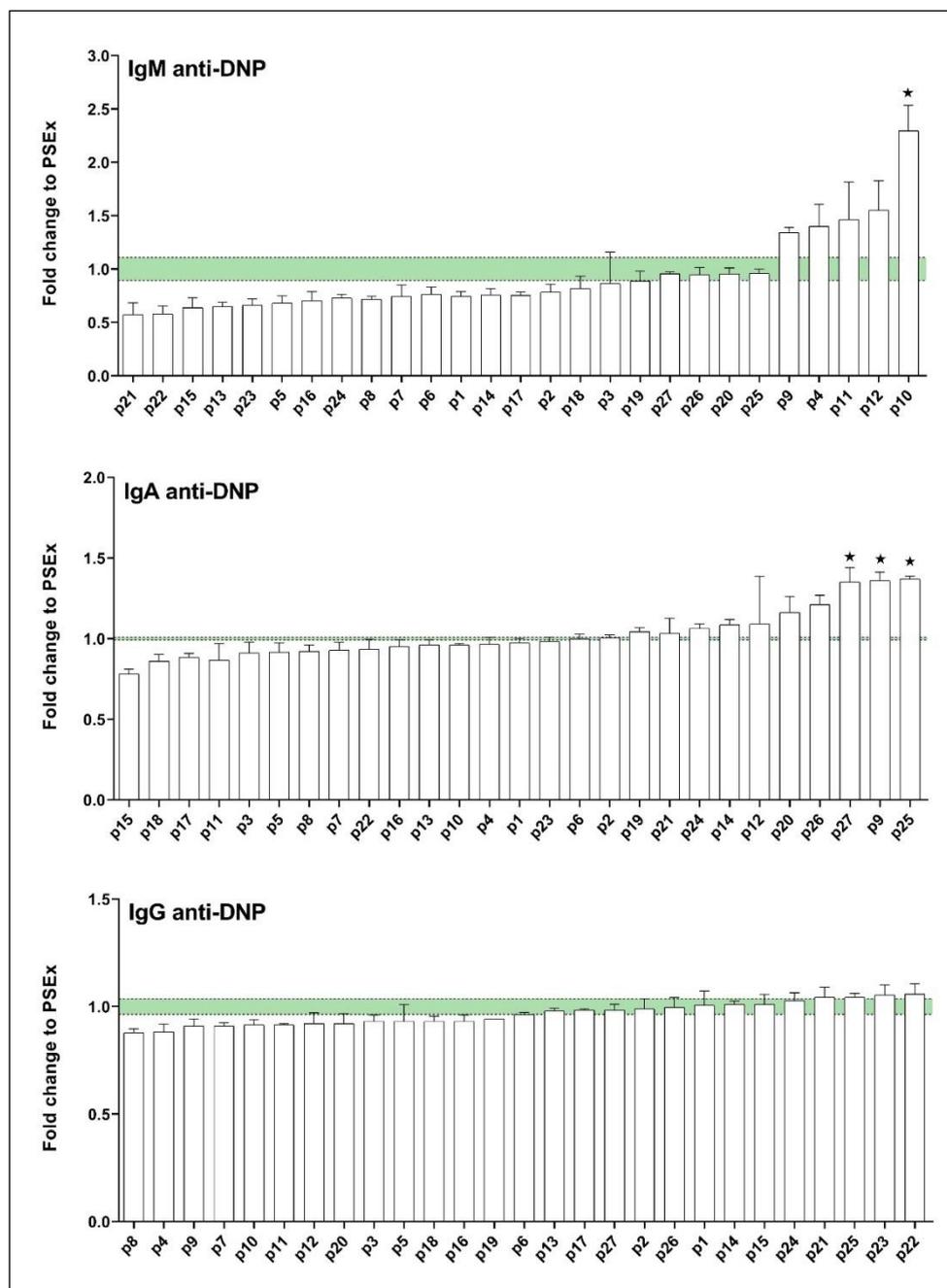


Figura 5.6. Determinación de anticuerpos polireactivos anti-DNP (IgM, IgA e IgG). Las PEC se estimularon con PSEx (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en presencia de los péptidos (45 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se determinó el título de los respectivos isotipos ensayo de ELISA. Como controles se utilizaron: (i) PEC solas en medio de cultivo, (ii) PEC estimuladas únicamente con PSEx (control de referencia), y (iii) PEC estimuladas con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, control positivo). Los resultados se muestran normalizados respecto a la condición de referencia (cuyos valores se muestran como banda color verde). Para todos los casos se representa media (\pm SEM). (*) $p < 0,05$ (ANOVA, con corrección de Tukey) respecto al control de referencia.

5.3. Efecto de los péptidos 11-mer sobre la interacción física entre células RAW264.7. y antígenos parasitarios.

Recientemente, nuestro grupo de trabajo demostró que los antígenos contenidos en PSEx interactúan físicamente, de forma específica y dosis-dependiente, con PEC murinas; destacándose los macrófagos por su gran capacidad de unión [García-Luna, 2022]. Además, en dicho trabajo también se demostró que rshCD6 es capaz de inhibir, al menos parcialmente, la interacción física entre componentes de PSEx y macrófagos peritoneales; sugiriendo así que al menos algunos de los ligandos parasitarios para rshCD6 estarían involucrados en dicha interacción. Por ello, y considerando que gran parte de los interactores parasitarios de rshCD5 y rshCD6 son compartidos con aquellos identificados para los péptidos homólogos a *pbs1* derivados de sus secuencias [Miles et al. 2020b], se evaluó el efecto de los 27 péptidos sintéticos 11-mer sobre la interacción física entre ligandos parasitarios y macrófagos.

En esta instancia, debido al gran número de péptidos a ensayar, se consideró oportuno, tanto logística como éticamente, utilizar un modelo de línea celular de macrófagos en lugar de células primarias. Para ello, se utilizó la línea RAW264.7. correspondiente a macrófagos peritoneales murinos provenientes de ratones Balb/c (cepa de alta susceptibilidad a la EQ secundaria [Mourglia-Ettlin et al., 2016a]). Por lo tanto, en primer lugar, se evaluó la utilidad de las células RAW264.7 para modelar la interacción reportada entre antígenos de PSEx y macrófagos peritoneales primarios. Para ello, se conjugó PSEx a una sonda fluorescente (isotiocianato de fluoresceína, FITC) y se realizaron ensayos de unión mediante citometría de flujo para evaluar la especificidad y dosis-dependencia de la interacción entre las células RAW264.7. y la sonda PSEx-FITC. La dosis-dependencia de la interacción se ensayó mediante la incubación de las células con diferentes masas de PSEx-FITC (0,1 μg , 1,0 μg y 10,0

µg), mientras que la especificidad se evaluó comparativamente contra un ensayo de interacción con la sonda BSA-FITC utilizada como control inespecífico de unión. En la **Figura 5.7.** se muestran los resultados obtenidos, confirmándose que las células RAW264.7. son útiles para modelar la interacción previamente reportada entre PSEx-FITC y macrófagos peritoneales murinos.

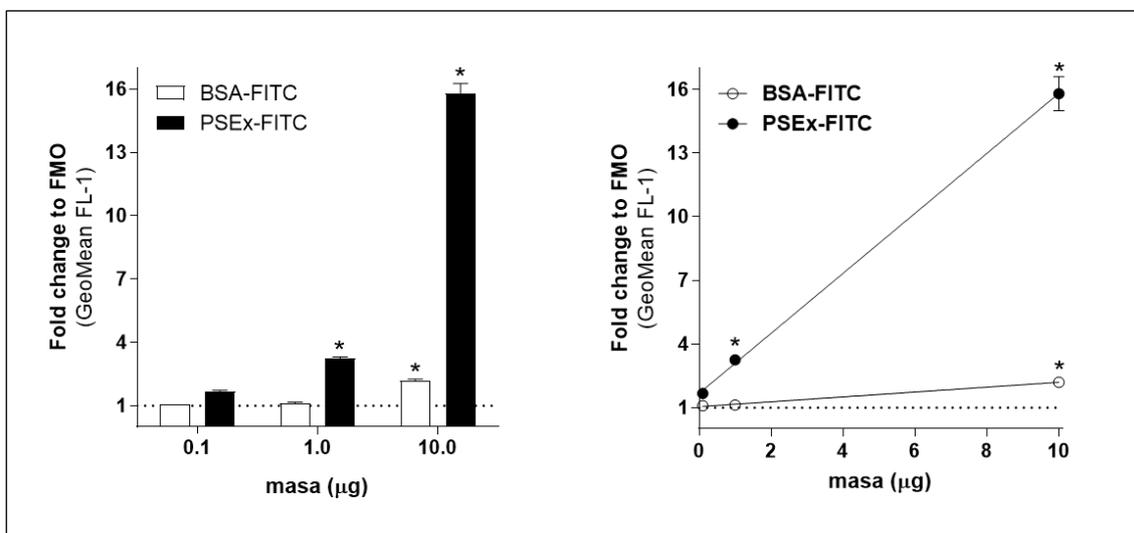


Figura 5.7. Ensayo de especificidad y dosis-dependencia de la interacción física entre PSEx-FITC y células RAW264.7. Las células se incubaron con PSEx-FITC y se determinó la media geométrica de la intensidad de fluorescencia en el canal FL-1. Como control de especificidad del ensayo se utilizaron células incubadas con BSA-FITC. Para todos los casos se representa media (\pm SEM). (*) $p < 0,05$ (ANOVA, con corrección de Tukey) respecto al control FMO (líneas punteadas).

Luego, para evaluar el efecto de los péptidos sintéticos 11-mer sobre la interacción física entre células RAW264.7 y la sonda PSEx-FITC, se seleccionó una masa de este último que permitiese trabajar con un amplio rango dinámico de señal sin alcanzar saturación. Asimismo, y debido a las dificultades experimentadas con el abastecimiento de material parasitario para poder obtener PSEx, se seleccionó una masa que permitiese minimizar los requerimientos de antígeno. Así, se trabajó con 2 µg de PSEx-FITC, los cuales se pre-incubaron en presencia de masas crecientes de los péptidos sintéticos 11-mer (5 µg, 20 µg y 50 µg) para luego incubarlos con las células. Como condición de referencia de la interacción se incubaron células RAW264.7 en presencia únicamente de PSEx-FITC. Las incubaciones se realizaron a 4°C para inhibir

metabólicamente posibles fenómenos de endocitosis/fagocitosis. Finalmente, las células se adquirieron utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur® y se determinó el valor de la media geométrica (GeoMean) de la intensidad de fluorescencia detectada en el canal FL-1, correspondiente a la fluorescencia de FITC.

Los resultados obtenidos sobre el efecto de los péptidos sintéticos 11-mer en la interacción física entre células RAW264.7 y PSEx-FITC se muestran en la **Figura 5.8.** y **Figura 5.9.**, normalizados respecto de la condición de referencia (células incubadas únicamente con PSEx-FITC), y agrupados según el RS de origen. Cabe destacar que los valores de intensidad de fluorescencia obtenidos para la condición de referencia (promedio±SEM) en los distintos ensayos oscilaron entre $3,38\pm 0,08$ y $7,5\pm 0,2$. Como se observa, 8 de los 27 péptidos en estudio, derivados de 6 RS diferentes, potenciaron significativamente la interacción entre células RAW264.7. y la sonda PSEx-FITC; al menos en una de las masas de péptido ensayadas (**Figura 5.8.**). Así, los incrementos observados variaron desde 1,3 hasta 17,7 veces respecto de la condición de referencia; siendo máximos para **p20** (*pbs1*) y **p21**, ambos derivados del receptor SALSA. Por otro lado, únicamente el péptido **p24** (derivado del receptor SCARA5) redujo significativamente la interacción física entre células RAW264.7 y la sonda PSEx-FITC (**Figura 5.9.**). Por su parte, 18 de los 27 péptidos no mostraron efecto alguno en el rango de masas ensayadas; destacándose todos los péptidos derivados de los receptores CD5L y SSc5D (**Figura 5.9.**).

Estos hallazgos resultaron, *a priori*, inesperados ya que, en base a los antecedentes previos de nuestro grupo obtenidos con rshCD6 [García-Luna, 2022], se esperaba que, al menos los péptidos derivados de su secuencia, ejercieran un efecto de bloqueo sobre la interacción de células RAW264.7 con la sonda PSEx-FITC. Sin embargo, y por el contrario, la mayoría de los péptidos o bien no afectaron dicha interacción, o bien la potenciaron (incluso los péptidos **p18** y **p19** derivados del receptor CD6); hallando solamente un péptido sintético 11-mer (**p24**) capaz de disminuirla de forma significativa (**Figura 5.9.**).

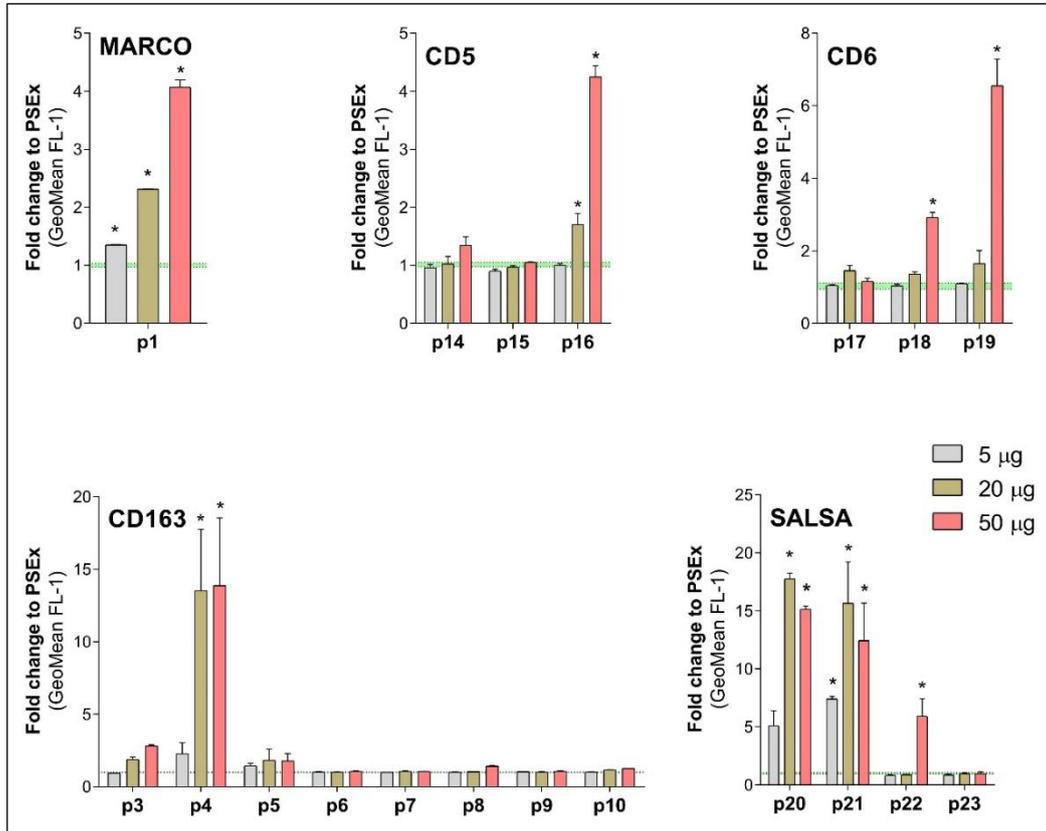


Figura 5.8. Ensayo de interacción física entre PSEx-FITC y células RAW264.7. Las células se incubaron con PSEx-FITC (2 µg) pre-incubado con masas crecientes de los péptidos sintéticos (5 µg, 20 µg y 50 µg) y se determinó la media geométrica de la intensidad de fluorescencia en el canal FL-1. Los resultados se muestran normalizados respecto al control de referencia (células incubadas únicamente con PSEx) para aquellos RS con péptidos que potenciaron la interacción. Para todos los casos se representa media (\pm SEM). (*) $p < 0,05$ (ANOVA, con corrección de Tukey) respecto al control de referencia, cuyos valores se representan como bandas color verde.

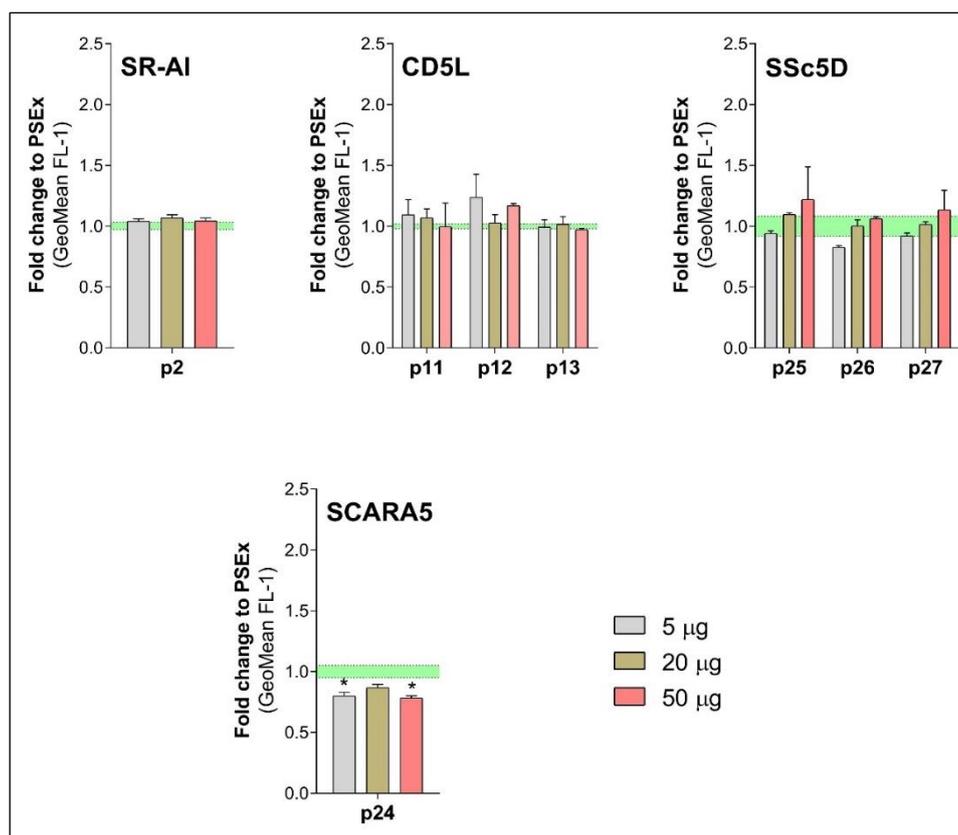


Figura 5.9. Ensayo de interacción física entre PSEx-FITC y células RAW264.7. Las células se incubaron con PSEx-FITC (2 µg) pre-incubado con masas crecientes de los péptidos sintéticos (5 µg, 20 µg y 50 µg) y se determinó la media geométrica de la intensidad de fluorescencia en el canal FL-1. Los resultados se muestran normalizados respecto al control de referencia (células incubadas únicamente con PSEx) para aquellos RS con péptidos que reprimieron, o no modificaron, la interacción. Para todos los casos se representa media (\pm SEM). (*) $p < 0,05$ (ANOVA, con corrección de Tukey) respecto al control de referencia, cuyos valores se representan como bandas color verde.

La potenciación observada, e inesperada *a priori*, de la interacción física entre células RAW264.7 y la sonda PSEx-FITC en presencia de ciertos péptidos sintéticos 11-mer podría deberse a varios motivos. Por un lado, se podrían haber generado estructuras de tipo “puente” entre las células y componentes presentes en la sonda PSEx-FITC. Por otro lado, también se podrían haber formado nuevas estructuras (cuaternarias) tridimensionales que pudiesen interactuar con receptores adicionales presentes en la superficie de las células RAW264.7. Además, no se debería descartar la posibilidad de que hubiesen ocurrido fenómenos de aglutinación entre componentes solubles presentes en la sonda PSEx-FITC y péptidos sintéticos 11-mer, los cuales podrían haber propiciado nuevas interacciones mediante la formación de estructuras

“supramoleculares”. Así, el universo de posibilidades sería realmente amplio, por lo que, a futuro, sería de interés profundizar en las causas de estos hallazgos.

La **Figura 5.10.** se construyó para facilitar la integración visual de los resultados obtenidos en relación al efecto de los péptidos sintéticos 11-mer sobre la interacción física entre células RAW264.7 y la sonda PSEx-FITC. En dicha figura, se resumen los valores hallados para la incubación en presencia de 50 μg de cada péptido, normalizados respecto de su condición de referencia correspondiente. Como se comentó anteriormente, la mayoría de los péptidos no ejercieron efecto alguno sobre la interacción física entre células RAW264.7 y la sonda PSEx-FITC, mientras que **p24** fue el único en reducirla significativamente, y **p20** (*pbs1*) y **p21** indujeron los mayores incrementos observados (**Figura 5.10.**). En la búsqueda de un patrón que pudiese explicar las diferencias en efectos inducidos, se compararon diversas características de los péptidos capaces de potenciar la interacción, resultando destacable el hecho que, de los 8 péptidos potenciadores de la misma, 3 de ellos (**p20**, **p21** y **p22**) presentaron altos niveles de homología entre sí. Dichos péptidos derivaron del receptor SALSA y presentaron solo un aminoácido de diferencia entre sus secuencias (**Tabla 3.3.**); sugiriéndose así que la potenciación de la interacción física entre células RAW264.7 y la sonda PSEx-FITC sería un fenómeno, al menos parcialmente, dependiente de la secuencia aminoacídica presente en los péptidos sintéticos 11-mer.

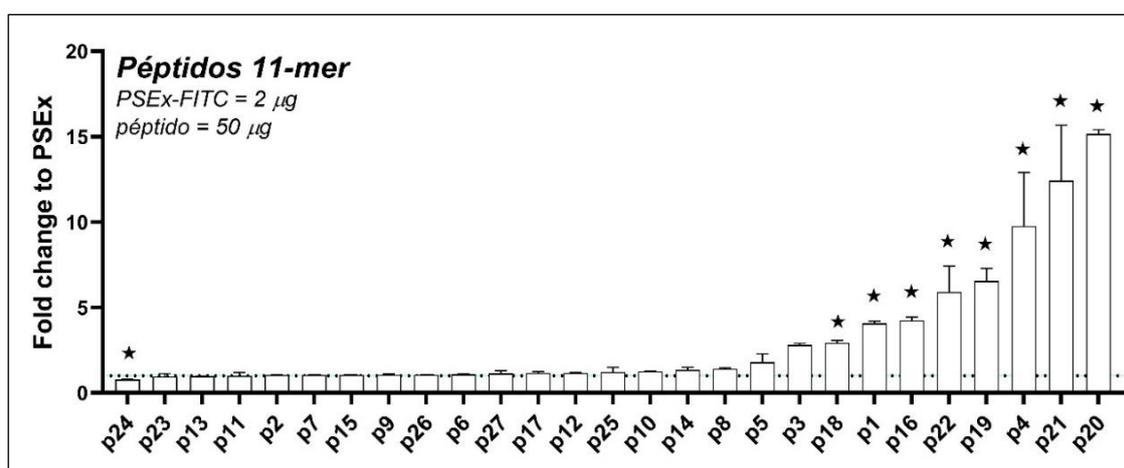


Figura 5.10. Ensayo de interacción física entre PSEx-FITC y células RAW264.7. Representación gráfica de los resultados obtenidos en los distintos ensayos realizados para la condición 50 μ g. Los resultados se muestran normalizados respecto al control de referencia (células estimuladas únicamente con PSEx), según el ensayo de origen correspondiente. Para todos los casos se representa media (\pm SEM). (*) $p < 0,05$ (ANOVA, con corrección de Tukey) respecto al control de referencia, cuyos valores se representan como bandas color verde.

Por último, se compararon las frecuencias de residuos aminoacídicos presentes, por un lado, en las secuencias de los péptidos sintéticos 11-mer que no ejercieron efecto alguno sobre la interacción física entre células RAW264.7 y la sonda PSEx-FITC, y, por otro lado, en las secuencias de aquellos péptidos que potenciaron dicha interacción. En este sentido, en la **Figura 5.11.** se observa que la presencia de un residuo L (Leucina) y de un residuo H (Histidina) en las posiciones 3 y 7, respectivamente, sería perjudicial para potenciar la interacción física entre células RAW264.7 y la sonda PSEx-FITC; reforzando la sugerencia previa relacionada con la influencia de la secuencia aminoacídica sobre el fenómeno de potenciación de la interacción.

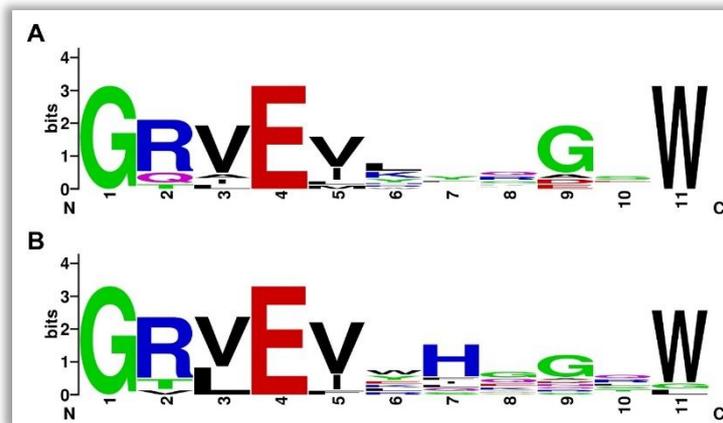


Figura 5.11. Análisis de frecuencias aminoacídicas. Se clasificaron las secuencias de los péptidos 11-mer en estudio de acuerdo al efecto generado, agrupándolos según potenciaron (A) o no (B) la interacción entre células RAW264.7 y PSEx-FITC.

5.4. Efecto de los péptidos 11-mer sobre la secreción de citoquinas por parte de células RAW264.7. estimuladas con antígenos parasitarios.

Luego de analizar el efecto ejercido por los péptidos sintéticos 11-mer sobre la interacción física entre células RAW264.7 y la sonda PSEx-FITC, y considerando que varios de ellos potenciaron dicha interacción, se evaluaron posibles efectos funcionales

(secreción de citoquinas y producción de óxido nítrico) ejercidos por los péptidos sobre cultivos de células RAW264.7. estimulados con PSEx. En primer lugar, se evaluó el efecto de los péptidos sintéticos 11-mer sobre la producción de IL-6, IL-10 y TNF- α . Dichas citoquinas se seleccionaron en base a reportes previos de nuestro grupo donde se demostró que la presencia de rshCD5 y/o rshCD6 moduló su producción en cultivos de PEC estimuladas con PSEx [Mourglia-Ettlin et al., 2018]. Las citoquinas se cuantificaron en los sobrenadantes de cultivo de células RAW264.7 tras estímulo con PSEx en presencia, o ausencia (control de referencia), de péptidos sintéticos 11-mer. La cuantificación se realizó mediante ELISA de captura utilizando *kits* comerciales específicos para cada citoquina, y su concentración se determinó a partir de la generación de curvas de calibración siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Para ello, se incubaron células RAW264.7 en presencia de 15 $\mu\text{g/mL}$ de PSEx y 45 $\mu\text{g/mL}$ de cada uno de los péptidos en estudio. Dichas concentraciones se seleccionaron a partir del ensayo realizado con PEC, y como controles se ensayaron las siguientes condiciones: (i) control basal (células RAW264.7 solas en medio de cultivo), (ii) control de referencia (células RAW264.7 estimuladas únicamente con 15 $\mu\text{g/mL}$ de PSEx), y (iii) control positivo (células RAW264.7 estimuladas únicamente con 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS).

En la **Figura 5.12.** se muestran los resultados obtenidos; destacándose que en el control de referencia no se detectó ninguna de las tres citoquinas analizadas. Sin embargo, se observó que 6, 13 y 24 de los 27 péptidos sintéticos 11-mer, indujeron la secreción de IL-6, IL-10 y TNF- α , respectivamente. En líneas generales, se observaron valores bajos de concentración para IL-6 (nunca superiores a 30 pg/mL), y altos para IL-10 y TNF- α (ambos con máximos cercanos a 400 pg/mL). En particular, mientras que **p4** indujo los mayores niveles de IL-6, **p6** y **p13** fueron los mejores inductores de IL-10, a la vez que **p4**, **p22**, **p25** y **p26** potenciaron en mayor magnitud la producción de TNF- α (**Figura 5.12.**). Así, se destaca que mientras **p4** potenció en mayor medida la secreción de ambas citoquinas proinflamatorias (IL-6 y TNF- α), **p27** fue el único péptido que indujo exclusivamente la producción de IL-10 (citoquina antiinflamatoria). Por su parte, **p8** y **p24** fueron los únicos péptidos que no estimularon la producción de ninguna de las tres citoquinas analizadas. En este sentido, resulta importante recordar que **p24** fue el único péptido que indujo un efecto bloqueante de la interacción física entre células RAW264.7 y la sonda PSEx-FITC (**Figura 5.9.**), sugiriéndose así un

posible vínculo entre ambos hallazgos. En sentido contrario, aunque los péptidos **p20** y **p21** se destacaron por inducir los mayores incrementos en la interacción física entre células RAW264.7 y la sonda PSEx-FITC (**Figura 5.8.**), ninguno de ellos indujo la producción de IL-6, a la vez que mostraron niveles intermedios en la potenciación de la secreción de IL-10 y TNF- α (**Figura 5.12.**). Por lo tanto, estos resultados sugerirían la ausencia de un nexo inequívoco entre la modulación positiva de la interacción física de células RAW264.7 y la sonda PSEx-FITC, inducida por los péptidos sintéticos 11-mer, y los efectos potenciadores de estos últimos sobre la secreción de citoquinas derivada de dicha interacción. Finalmente, se propone volver a realizar este ensayo próximamente, luego de una correcta optimización de las condiciones de cultivo para el trabajo con las células RAW264.7 como modelo; ya que el haber asumido las mismas condiciones que para PEC podría haber afectado la fiabilidad de los resultados obtenidos.

Luego, y pese a las limitaciones mencionadas, se compararon, nuevamente sin éxito, diversas características de los péptidos (propiedades fisicoquímicas, modelos estructurales, perfiles de homología, etc.) en búsqueda de un patrón que pudiese explicar las diferencias observadas sobre la producción de citoquinas en células RAW264.7 estimuladas con PSEx. En este sentido, solo se pudieron extraer algunas conclusiones luego de comparar las frecuencias de residuos aminoacídicos presentes en las secuencias de los péptidos sintéticos 11-mer agrupados según ejercieron, o no, algún efecto sobre la producción de citoquinas. Nuevamente, cabe aclarar que el mínimo de secuencias requerido por el *software* para realizar dichas comparaciones es de cuatro secuencias por grupo; por lo que solo fue posible realizar el análisis para IL-6 e IL-10. Así, en la **Figura 5.13.** se observa que la presencia de un residuo L (Leucina) y de un residuo V (Valina) en las posiciones 3 y 5, respectivamente, perjudica la modulación positiva de la secreción de IL-6. De hecho, entre los péptidos sintéticos 11-mer capaces de favorecer su producción se observó cierto patrón común en sus secuencias del tipo GRVExxxxGxW; pudiendo ser x, en principio, cualquier residuo aminoacídico. Por su parte, en la **Figura 5.14.** se muestra el estudio análogo realizado para la producción de IL-10; no observándose en este caso un patrón claro de asociación.

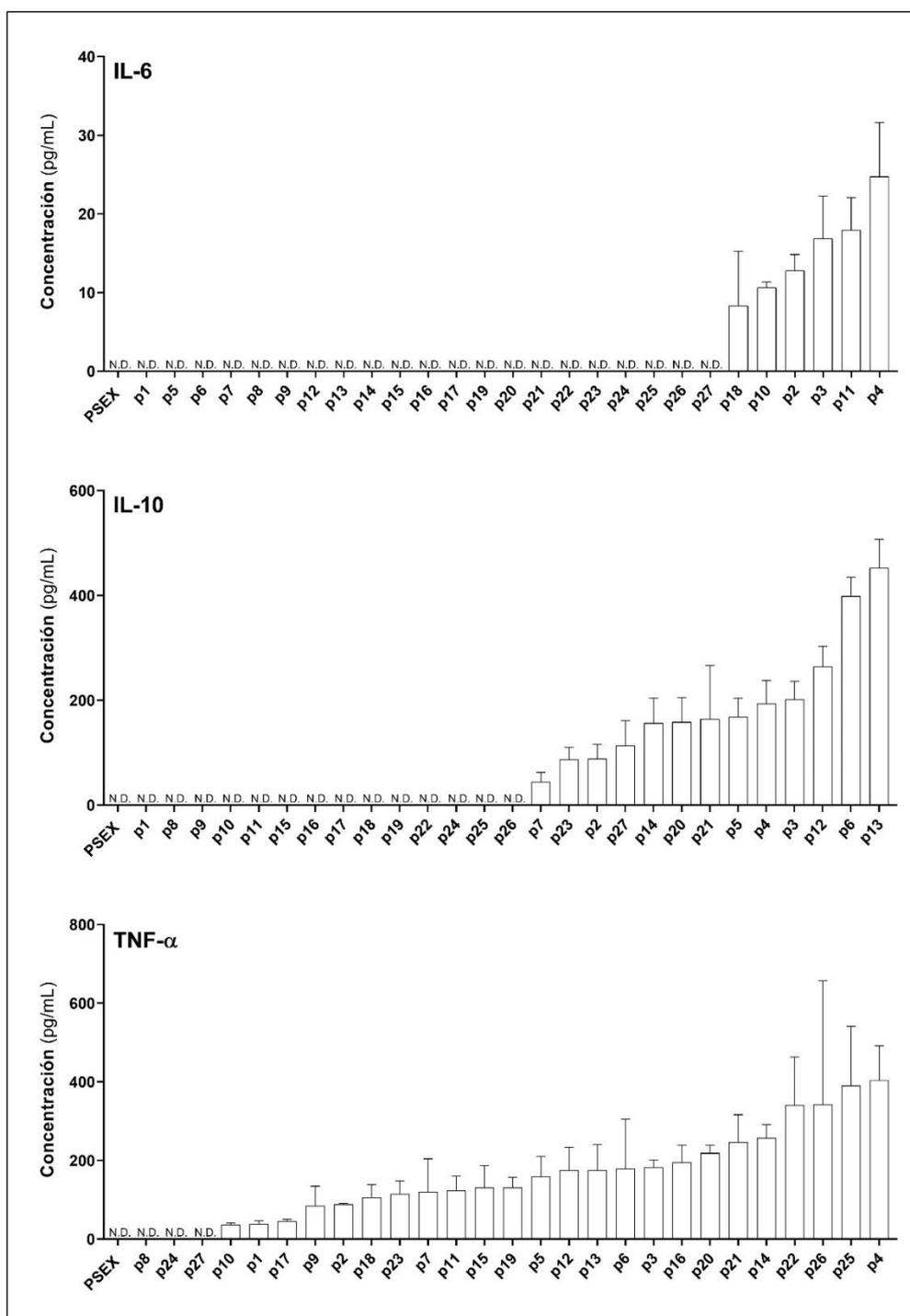


Figura 5.12. Determinación de citoquinas IL-6, IL-10 y TNF- α . Las células RAW264.7 se estimularon con PSEx (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en presencia de los péptidos (45 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se determinó la concentración de las respectivas citoquinas mediante ensayo de ELISA. Como controles se utilizaron: (i) células solas en medio de cultivo, (ii) células estimuladas únicamente con PSEx (control de referencia), y (iii) células estimuladas con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, control positivo). Para todos los casos se representa media (\pm SEM).

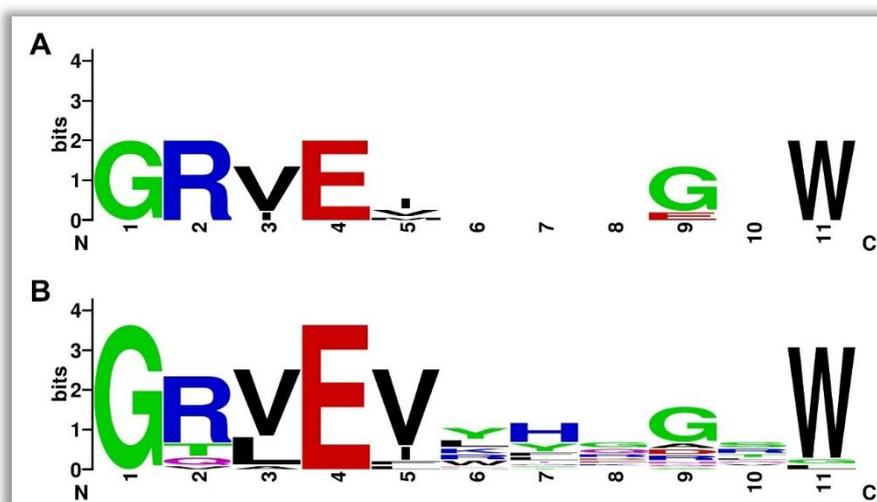


Figura 5.13. Análisis de frecuencias aminoacídicas. Se clasificaron las secuencias de los péptidos 11-mer en estudio de acuerdo al efecto generado, agrupándolos según modularon (A) o no (B) la producción de IL-6.

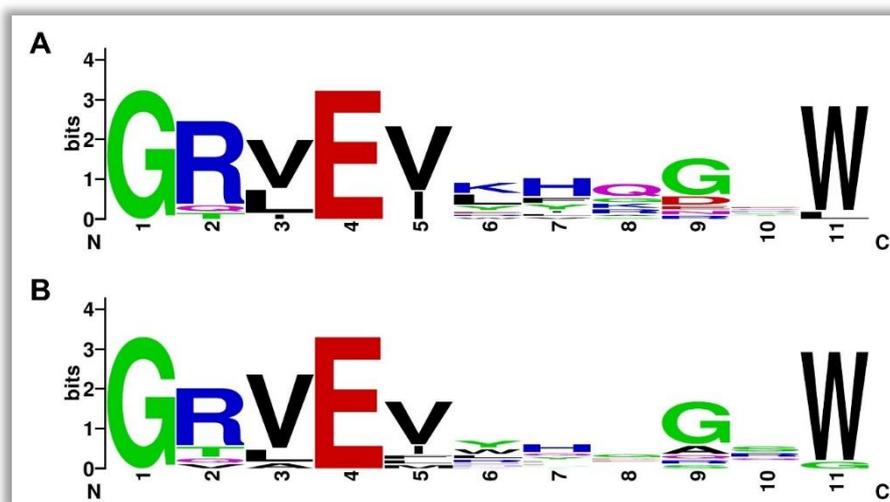


Figura 5.14. Análisis de frecuencias aminoacídicas. Se clasificaron las secuencias de los péptidos 11-mer en estudio de acuerdo al efecto generado, agrupándolos según modularon (A) o no (B) la producción de IL-10.

5.5. Efecto de los péptidos 11-mer sobre la producción de óxido nítrico por parte de células RAW264.7 estimuladas con antígenos parasitarios.

Los macrófagos son uno de los principales tipos celulares capaces de producir óxido nítrico (NO) en respuesta a estímulos con ciertos antígenos; y, en particular, la producción de NO por PEC estaría relacionada con la muerte de PSC de *E. granulosus* s.l., al menos *in vitro* [Dematteis et al., 2003; Mourglia-Ettlin et al., 2016b]. Este

B.C. María Clara González Porcile

fenómeno jugaría un papel relevante durante las etapas tempranas de establecimiento de la EQ secundaria experimental. Por ello, se evaluó a continuación el efecto de los péptidos sintéticos 11-mer sobre la producción de NO por parte de células RAW264.7 estimuladas con PSEx. La producción de NO se determinó mediante la reacción de Griess (cuantificación de NO_2^- como evidencia indirecta de la producción de NO) aplicada a sobrenadantes de cultivo de células RAW264.7 incubadas con PSEx en presencia de cada uno de los péptidos sintéticos 11-mer en estudio. Como controles se utilizaron: (i) células solas en medio de cultivo (control basal), (ii) células estimuladas únicamente con LPS (control positivo), y (iii) células estimuladas únicamente con PSEx (control de referencia).

Inicialmente se realizó un ensayo de optimización para establecer la concentración de PSEx y de LPS a utilizar. Para ello, se incubaron 1×10^5 células RAW264.7 por pocillo durante 24h en los siguientes formatos: control basal, control positivo (ensayando el LPS a 0,01, 0,1 y 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y control de referencia (ensayando el PSEx a 1, 5 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). En la **Figura 5.15**, se muestran los resultados obtenidos; observándose que las células RAW264.7 produjeron niveles significativos de NO en respuesta a ambos estímulos (LPS y PSEx) de manera dosis-dependiente. Por ello, finalmente se seleccionaron los valores 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS y 2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PSEx como concentraciones de trabajo; en este último caso aplicando el criterio de lograr un buen rango dinámico de señal sin saturación y minimizando los requerimientos de PSEx. Por su parte, cabe destacar que, en la presente tesis, se demostró por primera vez que los antígenos solubles del tegumento de PSC de *E. granulosus* (modelados con PSEx) serían capaces de inducir la producción de NO; abriendo a futuro una interesante línea de estudio. Sin embargo, previamente deberá confirmarse la ausencia completa de endotoxinas contaminantes en PSEx; que, aunque poco probable, podrían estar presentes dado que el proceso para su obtención no se realiza completamente bajo esterilidad.

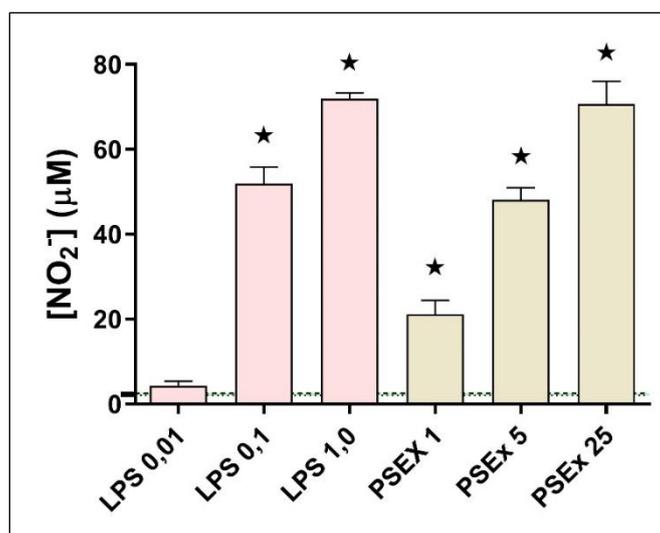


Figura 5.15. Ensayo de optimización de concentración de PSEx. Las células se estimularon con distintas concentraciones de PSEx (1, 5 y 25 µg/mL) y distintas concentraciones de LPS (0,01, 0,1 y 1,0 µg/mL) y se evaluó la producción de NO. La banda horizontal punteada representa la condición de basal (células solas). Para todos los casos se representa media (\pm SEM). (*): Diferencia significativa (ANOVA con corrección de Tukey; $p < 0,05$) respecto al control de basal.

Luego de optimizar las concentraciones de PSEx y LPS a utilizar, se realizó una prueba-de-concepto con intención de determinar si los péptidos serían potencialmente capaces de modular la producción de NO por parte de células RAW264.7 estimuladas. Para ello, se incubaron células RAW264.7 en presencia de 0,1 µg/mL de LPS y concentraciones crecientes (1, 10 y 100 µg/mL) de los distintos péptidos sintéticos 11-mer derivados del receptor CD6 (**p17**, **p18**, **p19**); ya que para dichos péptidos existe evidencia de su capacidad para unir y bloquear LPS [Martínez-Florensa et al., 2018]. Como control de referencia se incubaron células RAW264.7 estimuladas solamente con 0,1 µg/mL de LPS, y como condición basal se incubaron células RAW264.7 solo en medio de cultivo. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 5.16**, donde se observa que los péptidos **p17** y **p19** disminuyeron significativamente, a la máxima concentración ensayada, la producción de NO por parte de células RAW264.7 estimuladas con LPS.

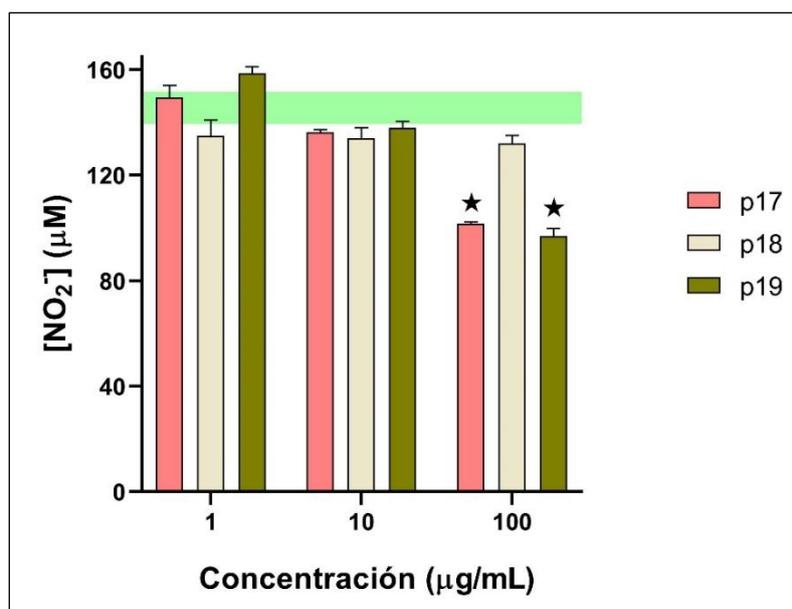


Figura 5.16. Modulación mediada por péptidos derivados de CD6 sobre la producción de NO en respuesta a LPS. Las células se estimularon con LPS (0,1 µg/mL) en presencia de concentraciones crecientes de los respectivos péptidos (1, 10 y 100 µg/mL) y se evaluó la producción de NO. La banda de color verde corresponde a la concentración de NO en el control de referencia (LPS solo). Para todos los casos se representa media (\pm SEM). (*): Diferencia significativa (ANOVA con corrección de Tukey; $p < 0,05$) respecto al control de referencia.

Luego de confirmar que los péptidos sintéticos 11-mer son potencialmente capaces de modular la producción de NO por parte de células RAW264.7 estimuladas con LPS, se procedió a analizar el comportamiento de los 27 péptidos sintéticos respecto al estímulo celular con PSEx. Así, se evaluó el efecto de los péptidos sintéticos 11-mer sobre la producción de NO inducida por PSEx en células RAW264.7 realizando ensayos análogos en presencia de cada uno de los 27 péptidos en estudio (20 µg/mL de péptidos). Como controles se ensayaron las siguientes condiciones: (i) control basal (células RAW264.7 solo en medio de cultivo), (ii) control de referencia (células RAW264.7 estimuladas únicamente con 2 µg/mL de PSEx), y (iii) control positivo (células RAW264.7 estimuladas únicamente con 1 µg/mL de LPS). Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 5.17.** normalizados con respecto al control de referencia. En estos casos, los valores de concentración de NO₂⁻ (promedio \pm SEM) para la condición de referencia y para el control positivo correspondieron, aproximadamente, a 135 \pm 9 µM y 163 \pm 19 µM, respectivamente; sin detección significativa para la condición basal.

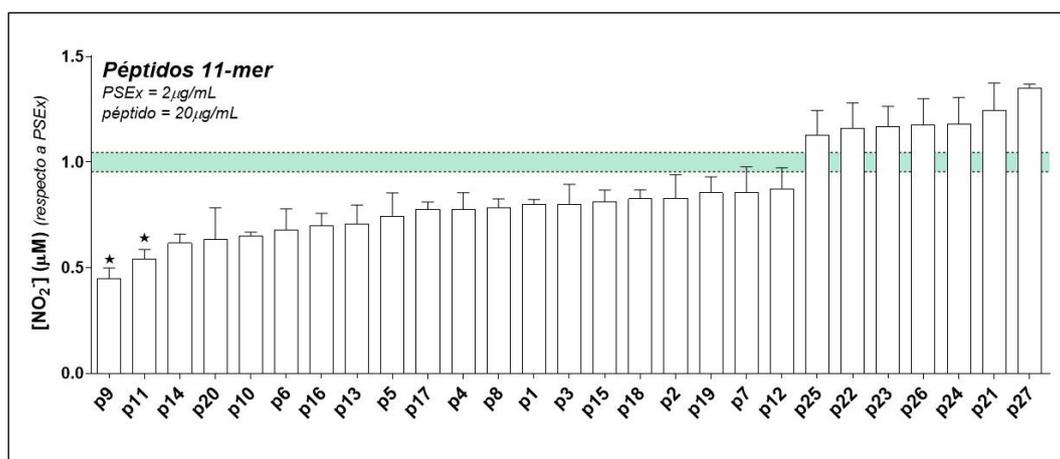


Figura 5.17. Producción de óxido nítrico. Las células se estimularon PSEx en presencia de los péptidos en estudio y se evaluó la producción de NO. Como controles se utilizaron: (i) células solas en medio de cultivo (control basal), (ii) células estimuladas únicamente con PSEx (2 μg/mL, control de referencia), y (iii) células estimuladas únicamente con LPS (1 μg/mL, control positivo). Los resultados se muestran normalizados respecto al control de referencia (cuyos valores se muestran como banda color verde). Para todos los casos se representa media (± SEM). (*) $p < 0,05$ (ANOVA, con corrección de Tukey) respecto al control de referencia.

En la **Figura 5.17.** se observa que ninguno de los 27 péptidos sintéticos 11-mer ensayados potenció la producción de NO por parte de las células RAW264.7 estimuladas con PSEx. A su vez, solo 2 péptidos (**p9** derivado de CD163 y **p11** derivado de CD5L) redujeron significativamente la producción de NO inducida por PSEx; al menos a la concentración de péptidos ensayada (20 μg/mL). En este sentido, resulta interesante destacar que ninguno de ambos péptidos mostró efecto alguno sobre la interacción física entre células RAW264.7 y la sonda PSEx-FITC (**Figura 5.8.** y **Figura 5.9.**). Este hallazgo podría deberse a que **p9** y **p11** actuaran como bloqueadores (parciales) de los compuestos parasitarios involucrados en la inducción de NO en células RAW264.7 sin interferir con aquellos que intervienen en la unión con la superficie de dichas células. Por otro lado, cabe recordar que, si bien **p9** presentó una AC₅₀ de 72 μg/mL, mostró valores significativos de citotoxicidad a concentraciones >12,5 μg/mL (**Figura 3.8.**). Por lo tanto, y dado que en el presente ensayo los péptidos se utilizaron a una concentración fija de 20 μg/mL, no podrían descartarse posibles efectos negativos sobre la viabilidad celular, ejercidos por **p9**, como causa probable de la reducción observada en la producción de NO. Sin embargo, en caso de ser correcta esta hipótesis, la misma no aplicaría a todas las funciones de las células RAW264.7, ya

que, en presencia de 45 µg/mL de **p9** dichas células produjeron niveles apreciables de TNF-α en respuesta al estímulo con PSEx (**Figura 5.12.**). Finalmente, y dado que solo 2 péptidos modificaron la secreción de NO por parte de células RAW264.7 estimuladas con PSEx, no se pudo extraer mayores conclusiones referidas a los patrones de asociación entre función y secuencia aminoacídica de los péptidos.

Por último, y nuevamente con el objetivo de facilitar la integración visual del gran volumen de datos recabados en el presente capítulo, se generó la **Tabla 5.2.** para resumir los mismos de manera cualitativa, comparativa y simultánea. En ella, los péptidos sintéticos 11-mer analizados se ordenaron de manera creciente de acuerdo al número de parámetros que fueron capaces de modificar. Así, se destacan los extremos de la tabla, donde, por un lado, el péptido **p8** (derivado del receptor CD163) mostró ser el único de los 27 péptidos en estudio que no presentó ninguna función inmunomoduladora, y, por otro lado, los péptidos **p25** y **p27** (ambos derivados del receptor SSc5D) que exhibieron el mayor número de actividades inmunomoduladoras. En este sentido, resulta interesante destacar que ninguno de los tres péptidos mencionados (**p8**, **p25** y **p27**) fue capaz de modificar significativamente la interacción física entre las células RAW264.7 y la sonda PSEx-FITC. Por el contrario, aunque **p24** fue el único péptido que disminuyó significativamente dicha interacción, el mismo solo fue capaz de modificar uno de los variados parámetros inmunológicos analizados (inducción de sIgM). Estas observaciones sugerirían que, *a priori*, los mecanismos involucrados en las funciones inmunomoduladoras ejercidas por los péptidos sintéticos 11-mer en estudio, no estarían necesariamente implicados en la interacción física entre células RAW264.7 y antígenos del tegumento parasitario (PSEx).

En suma, mediante la ejecución del Objetivo Específico #4 de la presente tesis, se evaluaron diversas funciones inmunomoduladoras potencialmente ejercidas por los péptidos sintéticos 11-mer diseñados. Así, se observó que los mismos fueron capaces de exhibir un amplio y variado abanico de actividades; algunas de ellas asociadas a patrones aminoacídicos presentes en sus secuencias. En este sentido, las funciones inmunomoduladoras ejercidas por ciertos péptidos, por ejemplo, potenciación de la respuesta de citoquinas proinflamatorias y/o inducción de sAc y pAc en respuesta a antígenos tegumentarios del parásito, podrían ser útiles de cara a plantear un posible uso profiláctico/terapéutico de los mismos en el contexto de la EQ secundaria.

Tabla 5.2. Resumen de resultados de ensayos funcionales para células RAW264.7 y PEC. (↑) Potencian, (↓) Reprimen, (=) Sin efecto. Verde: aumentan interacción entre células RAW264.7 y PSEx-FITC. Rojo: disminuyen dicha interacción. Blanco: no modulan la interacción entre células RAW264.7 y PSEx-FITC.

Péptidos 11-mer	Citoquinas (RAW264.7.)			NO	Citoquinas (PEC)			sAc			pAc		
	IL6	IL10	TNF α		IL6	IL10	TNF α	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG
p8	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
p1	=	=	↑	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
p15	=	=	↑	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
p22	=	=	↑	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
p24	=	=	=	=	=	=	=	↑	=	=	=	=	=
p9	=	=	↑	↓	=	=	=	=	=	=	=	↑	=
p11	↑	=	↑	↓	=	=	=	=	↓	↓	=	=	=
p5	=	↑	↑	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
p6	=	↑	↑	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
p7	=	↑	↑	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
p12	=	↑	↑	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
p13	=	↑	↑	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
p14	=	↑	↑	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
p16	=	=	↑	=	↑	=	=	=	=	=	=	=	=
p17	=	=	↑	=	=	=	=	↑	=	=	=	=	=
p18	↑	=	↑	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
p19	=	=	↑	=	↑	=	=	=	=	=	=	=	=
p4	↑	↑	↑	=	↓	=	=	=	=	=	=	=	=
p3	↑	↑	↑	=	=	=	=	=	↓	↓	=	=	=
p2	↑	↑	↑	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
p10	↑	=	↑	=	=	=	=	=	=	=	↑	=	=
p20	=	↑	↑	=	↑	=	=	=	=	=	=	=	=
p26	=	=	↑	=	=	↑	=	=	=	↑	=	=	=
p21	=	↑	↑	=	↑	↑	=	=	=	=	=	=	=
p23	=	↑	↑	=	↑	=	=	↑	=	=	=	=	=
p27	=	↑	=	=	↑	↑	=	=	=	↑	=	↑	=
p25	=	=	↑	=	=	=	↑	↑	↑	↑	=	↑	=

Capítulo 6.

Péptidos sintéticos 35-mer: Diseño, caracterización, biocompatibilidad, acciones antiparasitarias y efectos inmunomoduladores.

Resultados y discusión.

En el presente capítulo se abordan las estrategias y los resultados obtenidos de la ejecución del Objetivo específico #5 de la presente tesis. Así, se incluye el diseño y la caracterización fisicoquímica y estructural de diversos péptidos sintéticos 35-mer. Además, se abarcan también los análisis de sus perfiles de biocompatibilidad, así como la evaluación de su actividad antiparasitaria y de sus efectos inmunomoduladores frente a antígenos parasitarios. En este sentido, se describen los distintos sistemas de trabajo y sus respectivas condiciones; y se analizan los resultados obtenidos.

Objetivo Específico #5: *Diseñar péptidos de tipo tándem a partir de secuencias homólogas a pbs1 y evaluar in vitro su potencial antiparasitario y sus efectos inmunomoduladores.*

6.1. Diseño de péptidos 35-mer a partir de péptidos homólogos a *pbs1*.

Luego de diseñar, caracterizar y ensayar *in vitro* los 27 péptidos sintéticos 11-mer en estudio, todos ellos homólogos a la secuencia *pbs1* y derivados de los dominios *SRCR* presentes en nueve RS distintos (MARCO, SR-AI, CD163, CD5L, CD5, CD6, SALSA, SCARA5 y SSc5D), se diseñaron nuevas estructuras de tipo tándem lineal generando péptidos sintéticos 35-mer. Estos tándems se construyeron sobre la base de aumentar la potencial avidéz de la interacción entre los péptidos sintéticos 11-mer y los antígenos parasitarios en estudio. Para ello, según el número de secuencias 11-mer homólogas a *pbs1* identificadas en cada receptor, estos últimos se agruparon en tres categorías: (i) receptores con una única secuencia homóloga, (ii) receptores con tres secuencias homólogas distintas, y (iii) receptores con más de tres secuencias homólogas distintas. Asimismo, se optó por utilizar el aminoácido prolina (P) como espaciador entre las distintas secuencias 11-mer combinadas linealmente, dadas sus características estructurales, las cuales otorgarían rigidez a las posibles conformaciones tridimensionales que pudieran formarse en los tándems. La prolina es un iminoácido, ya que su cadena lateral es cíclica y está compuesta por tres unidades de metileno unidos, a la vez, al carbono α y al grupo amino; siendo este último una amina secundaria denominada grupo imino. Así, la presencia de P en una secuencia aminoacídica lineal genera “quebres estructurales” dada su rigidez, y, en la presente tesis, este hecho se consideró útil para que cada secuencia 11-mer dentro del tándem pudiese mantener una estructura tridimensional similar a la presente en su forma “libre”.

Los resultados mostrados en la **Tabla 6.1.** resumen el número y origen de los péptidos diseñados luego de aplicar los criterios mencionados. Así, al total de 27 péptidos 11-mer presentes en los dominios *SRCR* de los RS en estudio, se sumaron 12 péptidos sintéticos 35-mer adicionales. Tal y como se observa, para la mayoría de los receptores se diseñó una única estructura de tipo tándem lineal, mientras que para el receptor prototípico SALSA se diseñaron dos tándems diferentes y los péptidos 11-mer derivados del receptor CD163 dieron lugar a tres péptidos 35-mer distintos.

Tabla 6.1. Péptidos 35-mer diseñados. Resumen de los péptidos diseñados, indicando el RS de origen, la secuencia aminoacídica del péptido y el código utilizado a lo largo de la tesis para su identificación. En negritas se destaca la P (Prolina) que delimita las secuencias 11-mer.

Nombre	Código	Secuencia
MARCO-T	T1	GRAEVYYSGTW P GRAEVYYSGTW P GRAEVYYSGTW
SR-AI-T	T2	GRVEILHSGQW P GRVEILHSGQW P GRVEILHSGQW
CD163-T1	T3	GRVEVKVQEEW P GRIEIKFQGRW P GRLEVRFQGEW
CD163-T2	T4	GTVEVEIQRL P GRVEVKHGD T W P GRVELK T L G AW
CD163-T3	T5	GRVELK T L G AW P GRVEI Y HEGSW P GRVEI W HGGSW
CD5L-T	T6	GRVEVEQKGQW P GRVEVKHQNQW P GRLEVLHKG V W
CD5-T	T7	GQLEVYLKDGW P GVVEFYSGSL G P T VEVRQGAQW
CD6-T	T8	GTVEVRLEASW P GRVEMLEHGEW P GQVEVHFR G VW
SAG-T	T9	GRVEILYRGSW P GRVEVLYQGSW P GRVEI Y HGG T W
SCARA5-T	T10	GRVEVYHDRRW P GRVEVYHDRRW P GRVEVYHDRRW
SSc5D-T	T11	GRLEVWHGGRW P GRLEVWHDQRW P GRLEVWHAGRW
PBS-1.3	T12	GRVEVLYRGSW P GRVEVLYRGSW P GRVEVLYRGSW

En la **Figura 6.1.** se esquematiza cada uno de los tándems diseñados, los cuales se codificaron inicialmente siguiendo el mismo criterio que el establecido originalmente para los péptidos 11-mer; es decir, con el nombre de su receptor de origen y el número del dominio *SRCR* que contuvo a cada homólogo de *pbs1*. Sin embargo, a los efectos de simplificar tanto el trabajo con los mismos como la interpretación de los resultados y su discusión, se les asignó un código de identificación consecutivo desde **T1** a **T12**; correspondiendo **T12** al péptido 35-mer formado a partir de la secuencia consenso *pbs1* repetida consecutivamente tres veces. Por lo tanto, así serán reportados a lo largo de la presente tesis, destacando el receptor de origen (y localización dentro de este), cuando se considere pertinente.

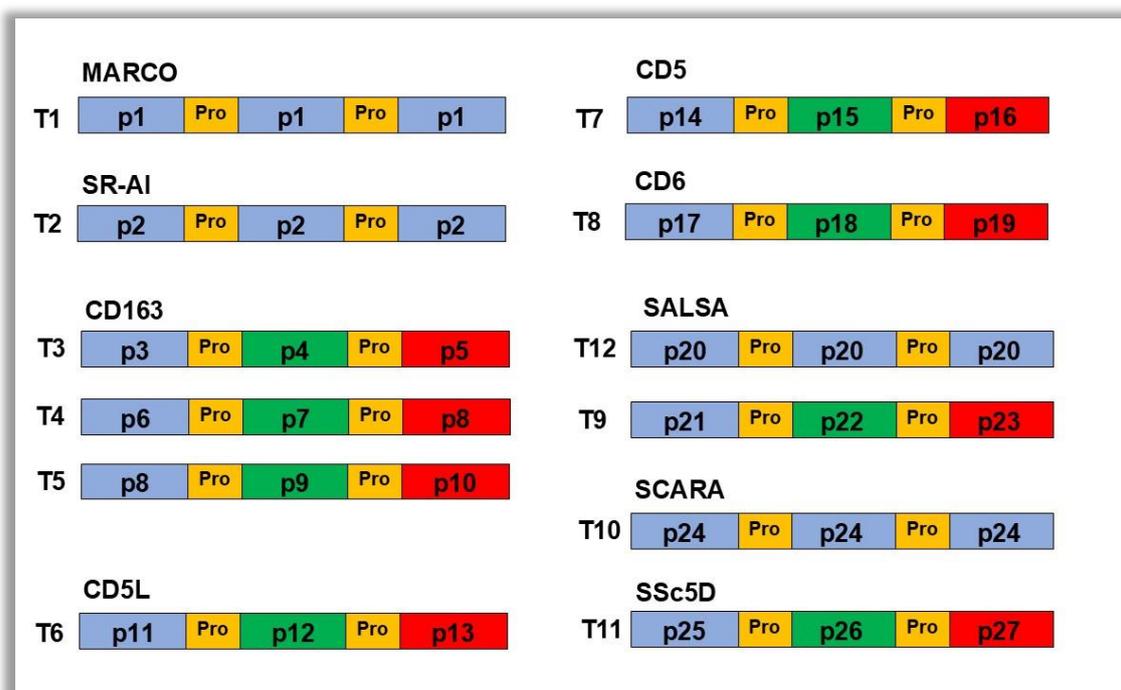


Figura 6.1. Representación esquemática de la estructura de los tándems 35-mer diseñados. Se representan los péptidos 11-mer diseñados, agrupados por receptor. Se detallan para cada caso las distintas combinaciones y los péptidos 11-mer que los conforman.

Los resultados resumidos en la **Figura 6.2.** muestran las secuencias de cada péptido diseñado; observándose que, de forma análoga a lo que sucede con los péptidos 11-mer, todos los péptidos 35-mer presentaron el aminoácido G (glicina) en posición 1. Sin embargo, a diferencia de lo observado para los péptidos 11-mer y debido a los criterios establecidos para su diseño, todos los tándems presentaron el aminoácido W (triptófano) en posición 35. Así, luego de analizar las frecuencias de aparición para los distintos residuos aminoacídicos presentes en cada posición de las secuencias 35-mer, se observó que 9 de los 35 aminoácidos (posiciones 1, 4, 12, 13, 16, 24, 25, 28 y 35) se mantuvieron constantes en los 12 tándems diseñados. Por un lado, las posiciones 1, 13 y 25 correspondieron a G (glicina), mientras que las posiciones 4, 16 y 28 fueron E (ácido glutámico), y la posición 35 resultó ser W (triptófano) en todos los tándems. Por su parte, las posiciones 12 y 24 fueron ocupadas por P (prolina), ya que correspondieron a los aminoácidos (iminoácidos) incluidos como espaciadores de las secuencias 11-mer constituyentes. En el extremo opuesto, se observó que las posiciones 8, 10 y 32 de las secuencias 35-mer presentaron los mayores niveles de variabilidad de secuencia entre los tándems diseñados (**Figura 6.2.**).

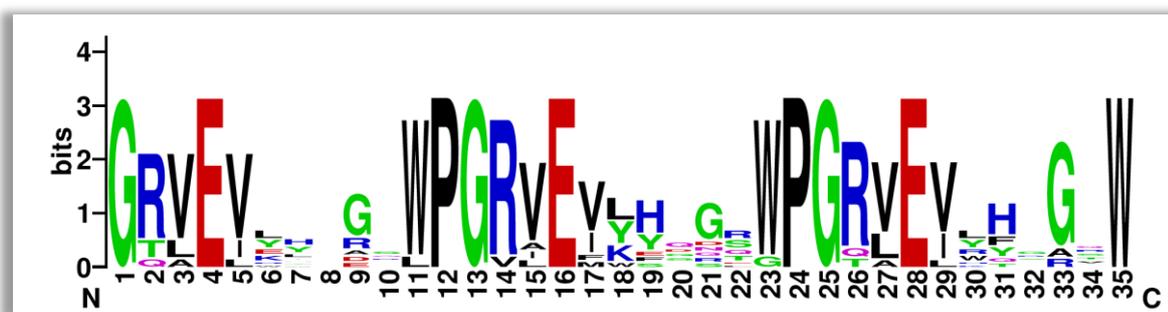


Figura 6.2. Análisis de frecuencias aminoacídicas. Se compararon entre sí todas las secuencias de los péptidos 35-mer en estudio, con interés de identificar patrones asociados a los distintos residuos aminoacídicos que ocupan las distintas posiciones.

Por otro lado, y nuevamente en colaboración con el Dr. Andrés Iriarte (Laboratorio de Biología Computacional, DDBT, Instituto de Higiene), se comparó la homología entre las distintas secuencias 35-mer y el tándem compuesto por la secuencia *pbs1* (**T12**); tanto en términos de “distancia p” como en términos de identidad y similitud de secuencia (**Tabla 6.2.**). Así, se observó que el rango de valores para “distancia p” osciló desde 20% para **T9** hasta 60% para **T7**; ambos resultados esperables *a priori* por corresponder a los tándems construidos con los péptidos 11-mer derivados del receptor SALSA y del receptor CD5, respectivamente. Por su parte, los valores de identidad con respecto a **T12** oscilaron desde 47,2% (**T7**) hasta 80,0% (**T9**), mientras que los de similitud variaron desde 63,6% (**T10**) hasta 94,3% (**T9**); en línea con los resultados de “distancia p” (**Tabla 6.2.**). En este sentido, resulta interesante recordar que mientras los péptidos **p21** y **p22** (ambos derivados de SALSA, al igual que *pbs1*) exhibieron los mayores valores de homología respecto a la secuencia *pbs1* (**p20**), los péptidos **p14** y **p15** (ambos derivados de CD5) mostraron los menores valores de homología (**Tabla 3.2.**). Por lo tanto, las combinaciones de dichos péptidos 11-mer dentro de las estructuras en tándem diseñadas, mantuvieron perfiles de homología similares respecto al tándem **T12**. Finalmente, para los tándems no se realizó un análisis de tipo evolutivo análogo al realizado para los péptidos 11-mer (**Figura 3.3.**), dado que el mismo carecería de sentido biológico al buscar relaciones entre secuencias de diseño arbitrario.

Tabla 6.2. Péptidos 35-mer diseñados vs. T12. Resumen de los péptidos diseñados, indicando el RS de origen, el código utilizado a lo largo de la tesis para su identificación y su comparación vs. T12 en términos de distancia p, identidad y similitud.

Nombre	Código	Secuencia vs. T12 (%)		
		Distancia p	Identidad	Similitud
MARCO-T	T1	34,4	65,7	82,9
SR-AI-T	T2	34,4	65,7	91,4
CD163-T1	T3	45,7	54,3	77,1
CD163-T2	T4	48,6	51,4	65,7
CD163-T3	T5	37,1	62,9	82,9
CD5L-T	T6	37,1	62,9	88,6
CD5-T	T7	60,0	47,2	66,7
CD6-T	T8	37,1	62,9	80,0
SAG-T	T9	20,0	80,0	94,3
SCARA5-T	T10	42,9	54,5	63,6
SSc5D-T	T11	45,7	54,3	71,4
PBS-1.3	T12	0,0	100	100

6.2. Modelado estructural de los péptidos 35-mer diseñados.

A la luz de los resultados obtenidos del modelado estructural de los péptidos sintéticos 11-mer homólogos a *pbs1*, donde se observó una gran diversidad de posibles estructuras (**Figura 3.4.**, **Figura 3.5.** y **Figura 3.6.**), y considerando además que la combinación de distintos péptidos 11-mer para conformar los tándems lineales 35-mer podría generar distintas interacciones que afectarían sus estructuras tridimensionales, se realizó el modelado estructural de los péptidos sintéticos 35-mer. Para ello, se procedió de manera análoga a lo realizado para los péptidos 11-mer utilizando el *software* *PEPfold3* y aplicando los parámetros incluidos por defecto; todo ello en colaboración con el Dr. Sebastián Miles (DDBT, Instituto de Higiene).

A continuación, se muestran los modelos tridimensionales obtenidos, agrupados según presentasen estructuras de hoja β (**Figura 6.3.**), estructuras de hélice α o estructuras desordenadas denominadas *random coil* (**Figura 6.4.**); destacándose en todos los casos la presencia de quiebres estructurales inducidos por la presencia de residuos P (prolina) como espaciadores entre los péptidos 11-mer que conformaron los tándems.

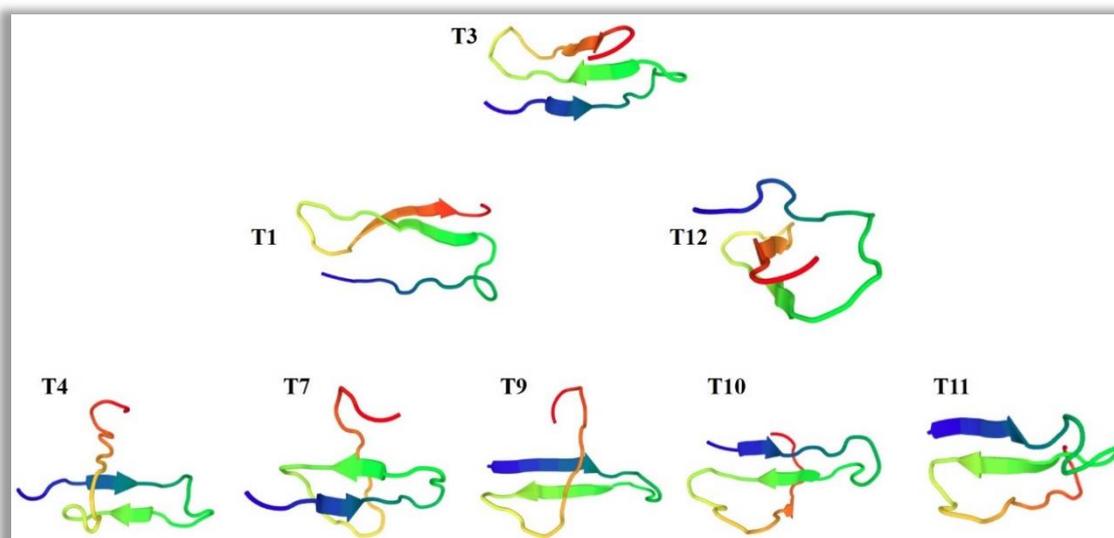


Figura 6.3. Péptidos con estructuras hoja-beta. Se representa el modelado estructural para los péptidos 35-mer que exhiben estructuras compatibles con hojas β , ya sea en el centro como en alguno de sus extremos.

Como se observa en la **Figura 6.3.**, 8 de los 12 péptidos 35-mer presentaron algún tipo de estructura compatible con hojas β . Entre ellos, uno las exhibió tanto en sus extremos como en el interior (**T3**, adquiriendo una conformación triple antiparalela), dos las exhibieron en su interior y en su extremo C-terminal (**T1** y **T12**, también adquiriendo conformaciones antiparalelas), y los cinco tándems restantes presentaron hojas β en su interior y en su extremo N-terminal (**T4**, **T7**, **T9**, **T10** y **T11**, adquiriendo conformaciones antiparalelas nuevamente). Ninguno de los tándems con hojas β exhibió una única hoja en su estructura. En este sentido, cabe destacar que **T1** (derivado del receptor MARCO) sería el tándem con mayor similitud estructural respecto a **T12**, si bien presentó valores de homología de secuencia intermedios respecto al mismo (**Tabla 6.3.**).

Por otro lado, en la **Figura 6.4.** se observa que solo dos tándems exhibieron estructuras de tipo hélices α : uno de ellos en su extremo C-terminal (**T6**) y otro en el medio de su secuencia (**T8**). Finalmente, los tándems **T2** y **T5** presentaron estructuras desordenadas del tipo *random coil* a lo largo de toda su secuencia aminoacídica (**Figura 6.4.**).

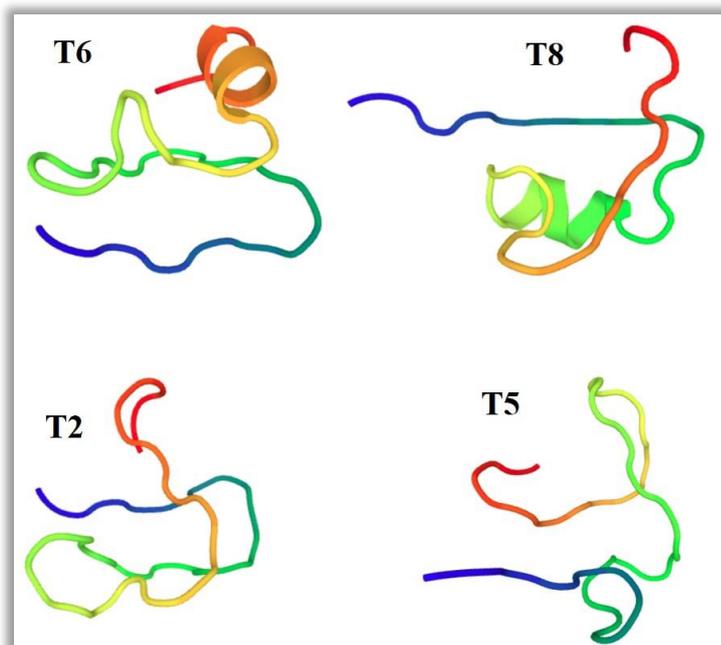


Figura 6.4. *Péptidos con estructuras alfa-hélice y péptidos con estructuras desordenadas tipo random coil. Se representa el modelado estructural para los péptidos 35-mer que exhiben estructuras compatibles con hélices α , ya sea en el centro como en alguno de sus extremos; así como también aquellos que presentan estructuras desordenadas tipo random coil.*

6.3. Caracterización fisicoquímica de los péptidos 35-mer diseñados.

Las características fisicoquímicas de los péptidos 35-mer diseñados se analizaron en términos de masa molecular (MW) y de punto isoelectrico (pI) teóricos, así como en cuanto a su composición porcentual de aminoácidos polares cargados (D, E, K, R y H), polares neutros (S, C, P, T, N y Q) e hidrofóbicos (G, A, V, L, M, I, F, Y y W). En la **Tabla 6.3.** se resumen dichas características.

Respecto a la masa molecular teórica (MW) para los péptidos 35-mer diseñados, se observó que estas oscilaron en el rango desde 3.810,3 g/mol (**T7**) hasta 4.576,1 g/mol (**T10**), encontrándose la mayoría de los tándems (8/12) entre 4.000-4.300 g/mol (**Tabla 6.3.**). Al igual que lo observado para los péptidos 11-mer (**Tabla 3.3.**) este comportamiento era esperable, considerando que se trata de secuencias de exactamente el mismo largo, que, además, presentan posiciones altamente conservadas. Además, y también de manera esperable, los péptidos 35-mer exhibieron una masa molecular teórica aproximadamente tres veces mayor que la observada para las secuencias 11-mer que los conformaron (**Tabla 3.3.**).

Por otro lado, y en relación al valor teórico de pI, la mayoría de los tándems (9/12) se clasificaron como básicos, mientras que los restantes fueron ácidos. Cabe mencionar que el valor calculado de pI más bajo fue de 4,1 (**T7**), siendo, también, dos de sus péptidos 11-mer constituyentes (**p14** y **p15**) los más ácidos en términos de valores de pI (**Tabla 3.3**). Por otro lado, el mayor valor de pI encontrado para los péptidos 35-mer fue de 11,8 (**T11**), ocupando dos de sus péptidos 11-mer constituyentes posiciones en el extremo superior de la **Tabla 3.3** para este parámetro.

Tabla 6.3. Características fisicoquímicas de los péptidos. Resumen de las características de los péptidos identificados en términos de masa molecular teórica, punto isoeléctrico y composición porcentual de aminoácidos polares cargados, polares neutros e hidrofóbicos.

Código	MW (g/mol)	pI	AA Polares Cargados (%)	AA Polares Neutros (%)	AA Hidrofóbicos (%)
T1	4.023,4	6,6	17,1%	22,9%	60,0%
T2	4.002,6	7,8	25,7%	22,9%	51,4%
T3	4.282,9	9,5	37,1%	14,3%	48,6%
T4	3.927,6	7,5	31,4%	17,1%	51,4%
T5	4.003,5	7,7	28,6%	14,3%	57,1%
T6	4.147,8	10,5	34,3%	20,0%	45,7%
T7	3.810,3	4,1	17,1%	22,9%	60,0%
T8	4.060,6	4,8	31,4%	14,3%	54,3%
T9	4.061,6	9,1	22,9%	17,1%	60,0%
T10	4.576,1	10,4	51,4%	5,7%	42,9%
T11	4.359,0	11,8	37,1%	8,6%	54,3%
T12	4.122,7	10,4	25,7%	14,3%	60,0%

6.4. Síntesis comercial y solubilización de los péptidos 35-mer.

Los 12 péptidos 35-mer diseñados se sintetizaron de manera comercial y se obtuvieron en formato liofilizado con alta pureza ($\geq 90\%$). Una vez recibidos, los péptidos se solubilizaron, se filtraron por 0,22 μm y se almacenaron en esterilidad a -80°C hasta su uso (las soluciones *stock* de los tándems correspondieron a 2,00 mg/mL, a excepción de **T7** que se almacenó a 1,57 mg/mL). En este sentido, y siguiendo el protocolo de solubilización previamente optimizado para los péptidos 11-mer, los tándems se clasificaron según sus características fisicoquímicas (carga neta y carácter ácido-base) para luego ensayar distintos solventes (agua, NH_4HCO_3 y DMSO). En la

Tabla 6.4. se resumen los valores de pureza, MW empírica, carga neta calculada a pH 7, carácter ácido-base asignado y solventes utilizados para la solubilización de cada uno de los tándems sintetizados.

El porcentaje de pureza con el que se sintetizaron los tándems osciló entre 90,3% (**T3**) y 98,6% (**T11**); siendo muy similar al rango de pureza con el cual se obtuvieron los péptidos 11-mer (**Tabla 3.4.**). En relación con la MW determinada experimentalmente por el fabricante, los valores reportados fueron muy similares a los valores teóricos esperados (**Tabla 6.4.**).

Tabla 6.4. Perfil de solubilización de los péptidos sintetizados. *Resumen de las características de los péptidos sintetizados en términos de carga eléctrica calculada y solvente(s) usado(s) para su solubilización. Los casos en que se reporta más de un valor refieren a péptidos sintetizados en más de una oportunidad.*

Péptido	Pureza (%)	MW empírica (g/mol)	Carga neta	Carácter	Solubilizado en (H ₂ O:Y)
T1	94,4	4.028,0	0	neutro	DMSO (14,7% v/v)
T2	94,7	4.009,2	1	básico	-
T3	90,3	4.290,3	1	básico	-
T4	93,3	3.933,6	0	neutro	DMSO (13,99% v/v)
T5	95,1	4.130,4	1	básico	-
T6	91,9	4.154,5	4	básico	-
T7	92,1	3.814,8	-2	ácido	NH ₄ HCO ₃ (1,2 mM) + DMSO (10,1% v/v)
T8	91,3	4.066,8	-1	ácido	-
T9	93,5	4.066,3	1	básico	-
T10	91,4	4.582,2	2	básico	-
T11	98,6	4.365,9	4	básico	-
T12	91,1	4.123,8	1	básico	-

La estrategia de solubilización implementada para los péptidos 35-mer fue la misma que se optimizó previamente para los 11-mer y se describe en detalle en la **Sección 3.4.** Muy brevemente, la misma consiste en calcular la carga neta, clasificar los péptidos según su carácter ácido-base y de acuerdo con esto ensayar distintos solventes. Finalmente, de los 12 péptidos 35-mer sintetizados, 2 fueron ácidos (carga neta -1 y -2), 2 fueron neutros, y 8 fueron básicos (carga neta desde +1 hasta +4). Afortunadamente, la gran mayoría de los péptidos ácidos/básicos se solubilizaron fácilmente en agua como primer solvente (**Tabla 6.4.**); a excepción de **T7**, quien presentó el mismo

comportamiento que dos de los péptidos 11-mer que lo conformaron (**p14** y **p15**); ambos de carácter ácido (**Tabla 3.4.**).

6.5. Biocompatibilidad de los péptidos 35-mer con sistemas mamíferos.

De forma análoga a lo realizado para los péptidos sintéticos 11-mer, y con el interés de seleccionar péptidos sintéticos potencialmente útiles en aplicaciones terapéuticas (en particular, como intervención profiláctica y/o terapéutica frente a la EQ secundaria), se estudió la toxicidad de los tándems 35-mer sobre células mamíferas. Para ello, se evaluó el perfil de biocompatibilidad de los 12 tándems sintetizados determinando su actividad hemolítica y citotoxicidad. En ambos casos, se trabajó con células de origen murino, ya que, en última instancia, el potencial profiláctico y/o terapéutico de los péptidos sintéticos sería ensayado en el modelo murino de EQ secundaria [González-Porcile et al., 2024].

6.5.1. Actividad hemolítica de los péptidos 35-mer.

En primer lugar, se evaluó la actividad hemolítica (AH) de los tándems, en particular su AH₅₀. Para ello, se obtuvo una suspensión de eritrocitos murinos frescos y, con la misma, se incubaron los tándems a distintas concentraciones (rango: 1,6-100 µg/mL). La lisis de los eritrocitos se evaluó de forma indirecta determinando la presencia de hemoglobina en solución mediante lectura de la absorbancia a 560 nm. La AH de cada péptido, y a cada concentración, se calculó siguiendo protocolos de referencia [Cibulski et al., 2016].

En la **Figura 6.5.** se muestran los resultados de AH obtenidos, agrupando los 12 péptidos 35-mer según su receptor de origen. Estos resultados mostraron que, para todos ellos, la AH fue prácticamente nula; al menos en el rango de concentraciones ensayadas. De esta forma, la AH₅₀ determinada para los 12 péptidos 35-mer fue >100 µg/mL. Así, concluimos que, al igual que los péptidos sintéticos 11-mer, ninguno de los tándems diseñados presentó toxicidad en términos de AH a valores de concentración compatibles con posibles usos *in vivo*.

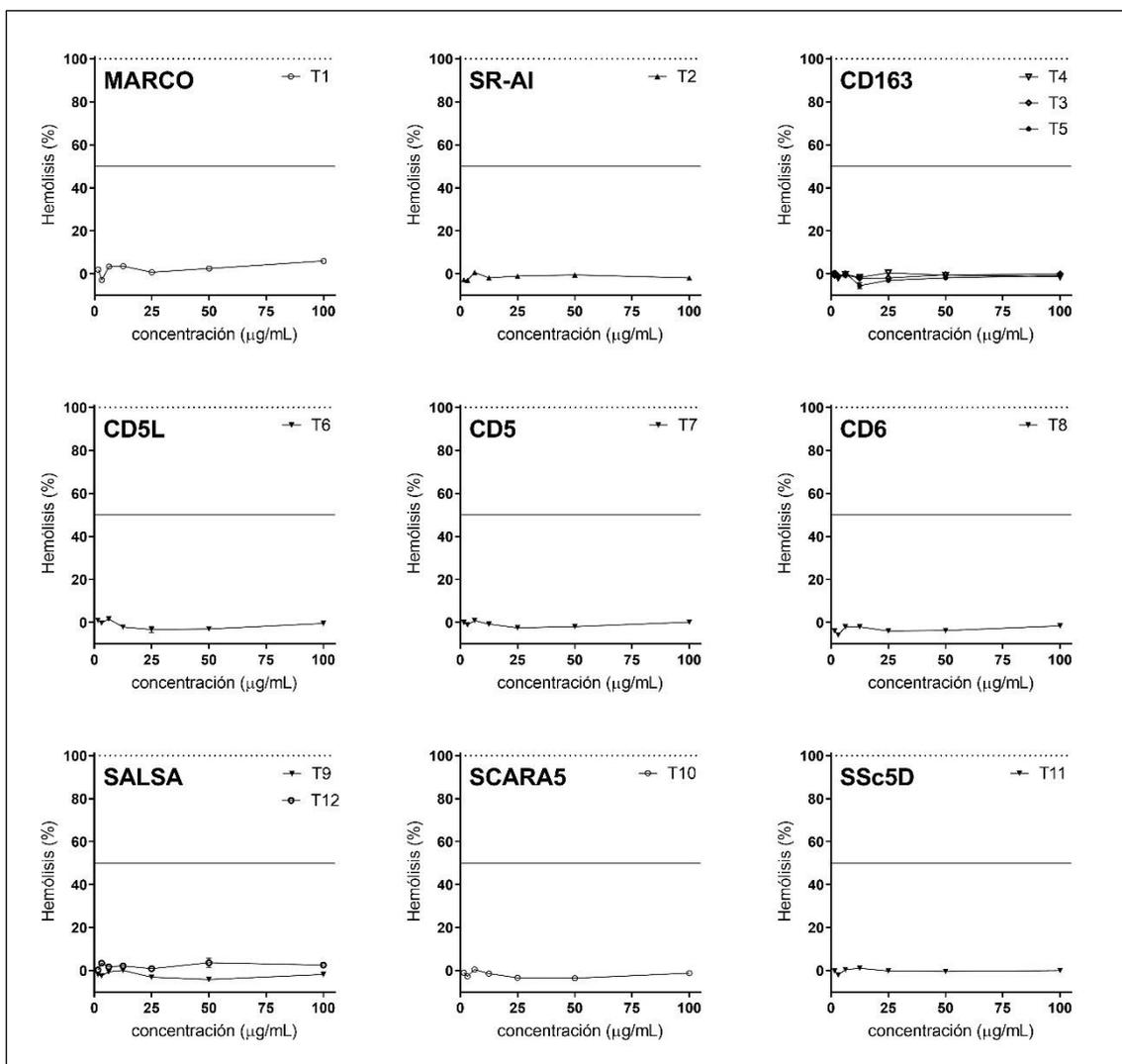


Figura 6.5. Actividad hemolítica de los péptidos sintéticos 35-mer. La AH se determinó incubando una suspensión de eritrocitos murinos frescos en presencia de concentraciones crecientes de los péptidos sintéticos (rango: 1,6 µg/mL a 100 µg/mL). Se representa la AH para los péptidos en estudio agrupando los resultados según el receptor de origen. Las líneas horizontales punteadas y completas representan valores de AH del 100% y 50%, respectivamente.

6.5.2. Actividad citotóxica de los péptidos 35-mer.

En segundo lugar, se evaluó la actividad citotóxica (AC) de los tándems, en particular su AC₅₀, sobre cultivos de la línea celular RAW264.7. (derivada de macrófagos murinos de cepa Balb/c). Muy brevemente, se incubaron durante 72h cultivos de células RAW264.7. en presencia de distintas concentraciones de los péptidos sintéticos 35-mer (rango: 6,3-100 µg/mL). Finalmente, la viabilidad celular se

determinó mediante el ensayo de reducción del MTT [Ghasemi et al., 2021], normalizando los resultados respecto al control negativo (ausencia de péptidos).

En la **Figura 6.6.** se muestran los resultados obtenidos, agrupando los tándems según su receptor de origen. Como se mencionó previamente, el ensayo de MTT permite determinar de forma indirecta la viabilidad celular mediante la evaluación de su actividad metabólica. En este sentido, si bien los resultados obtenidos mostraron importantes niveles de dispersión experimental, los mismos no evidenciaron valores de AC significativos para los tándems en estudio; al menos en el rango de concentraciones evaluadas. Por lo tanto, todos los péptidos sintéticos 35-mer exhibieron valores de $AC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$. Así, concluimos que ninguno de los tándems diseñados presentó niveles importantes de citotoxicidad a valores de concentración compatibles con posibles usos *in vivo*. Sin embargo, cabe destacar que **T7** mostró una reducción del 40% en la viabilidad celular a la máxima concentración ensayada, mientras que, por el contrario, a la misma concentración, **T10** incrementó la viabilidad celular en un 50% (**Figura 6.6.**). Este último hallazgo, será analizado en mayor detalle próximamente ya que, potencialmente, podría tratarse de un péptido sintéticos con posibles acciones procicatrizantes.

6.6. Actividad protoscolicida de los péptidos 35-mer.

De forma análoga a lo realizado para los péptidos sintéticos 11-mer, se analizó la potencial actividad protoscolicida de los péptidos sintéticos 35-mer, mediante cultivos de PSC de *E. granulosus* s.l. incubados en presencia de los péptidos en estudio. En particular, su actividad protoscolicida intrínseca se evaluó utilizando cultivos parasitarios axénicos, mientras que, la actividad protoscolicida mediada por células efectoras se valoró en sistemas de co-cultivo de PSC con células RAW264.7. en presencia de los tándems.

6.6.1. Actividad protoscolicida intrínseca de los péptidos 35-mer: Cultivos axénicos metabólicamente estresantes.

Para evaluar la actividad protoscolicida intrínseca de los tándems se utilizaron cultivos parasitarios axénicos. Muy brevemente, se incubaron PSC con alta viabilidad en “medio” estéril y en presencia de concentraciones crecientes de los tándems (rango: 0,3125-5,0 μM). Dichos cultivos se realizaron tanto en condiciones metabólicamente estresantes como en condiciones metabólicamente óptimas, utilizando PBS o RPMI, respectivamente. Los cultivos metabólicamente estresantes (ausencia de nutrientes, PBS) se incubaron durante 48h a 37°C en presencia de CO₂ al 5%, mientras que los cultivos metabólicamente estresantes (presencia de nutrientes, RPMI) se incubaron en las mismas condiciones, pero durante 5 días [Miles et al., 2023; García-Luna et al., 2024]. La viabilidad de los parásitos post-incubación se determinó mediante tinción con eosina siguiendo protocolos habituales [Dematteis et al., 1999].

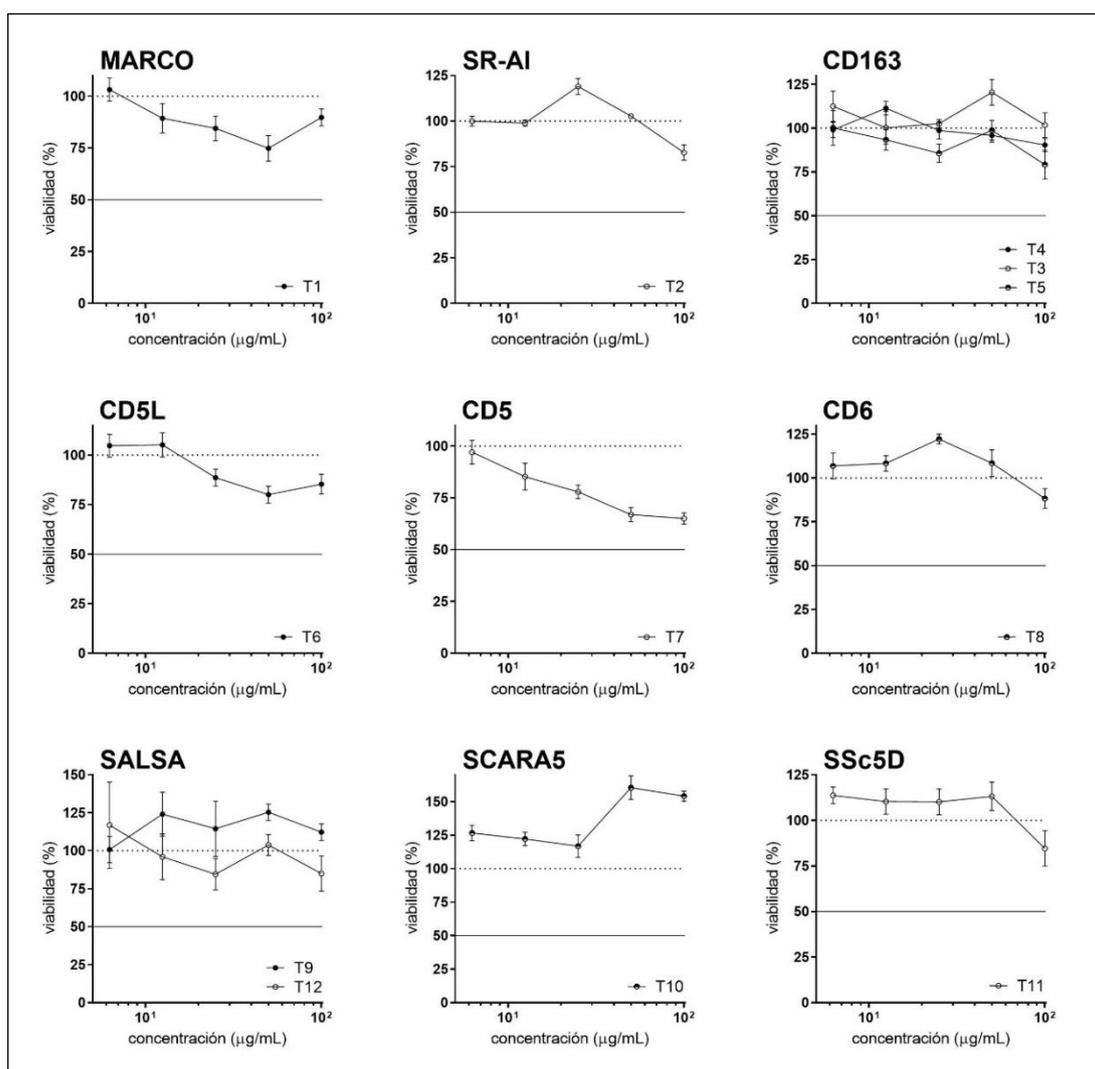


Figura 6.6. Actividad citotóxica de los péptidos sintéticos 35-mer. *La AC se determinó incubando cultivos de células RAW264.7 en presencia de concentraciones crecientes de los péptidos sintéticos (rango: 6,3 µg/mL a 100 µg/mL). Se representa la viabilidad celular en respuesta a los péptidos en estudio, agrupando los resultados según el receptor de origen. Las líneas horizontales punteadas y completas se ubican en los valores correspondientes al 100% y 50% de viabilidad celular respecto del control, respectivamente.*

Tal como y como se expuso previamente para los péptidos sintéticos 11-mer, fueron diversos los motivos que provocaron una gran variabilidad entre los lotes de parásitos utilizados, generando así, diferencias no deseadas en la viabilidad basal post-incubación en los diferentes ensayos. Por este motivo, la viabilidad de los PSC post-incubación se normalizó en cada caso respecto de su control basal correspondiente (parásitos incubados en PBS o RPMI según correspondiese, en ausencia de péptidos).

En primer lugar, se evaluó la actividad antiparasitaria intrínseca de los péptidos sintéticos 35-mer en condiciones metabólicamente estresantes para el parásito (medio: PBS). En estos ensayos, el rango de muerte parasitaria observado en la condición basal osciló en el rango 10-40%; motivo por el cual el incremento máximo alcanzable para péptidos con excelente actividad protoscolicida (100% de muerte), podría alcanzar valores normalizados de 2,5-10,0 veces respecto del basal. En la **Figura 6.7.** se reportan los RS para los cuales sus tándems presentaron actividad antiparasitaria intrínseca significativa, al menos en una de las concentraciones ensayadas. En ese sentido, más de la mitad de los péptidos sintéticos 35-mer (7/12) exhibieron actividad antiparasitaria intrínseca; observándose además un efecto dosis-dependiente en la mayoría de los casos.

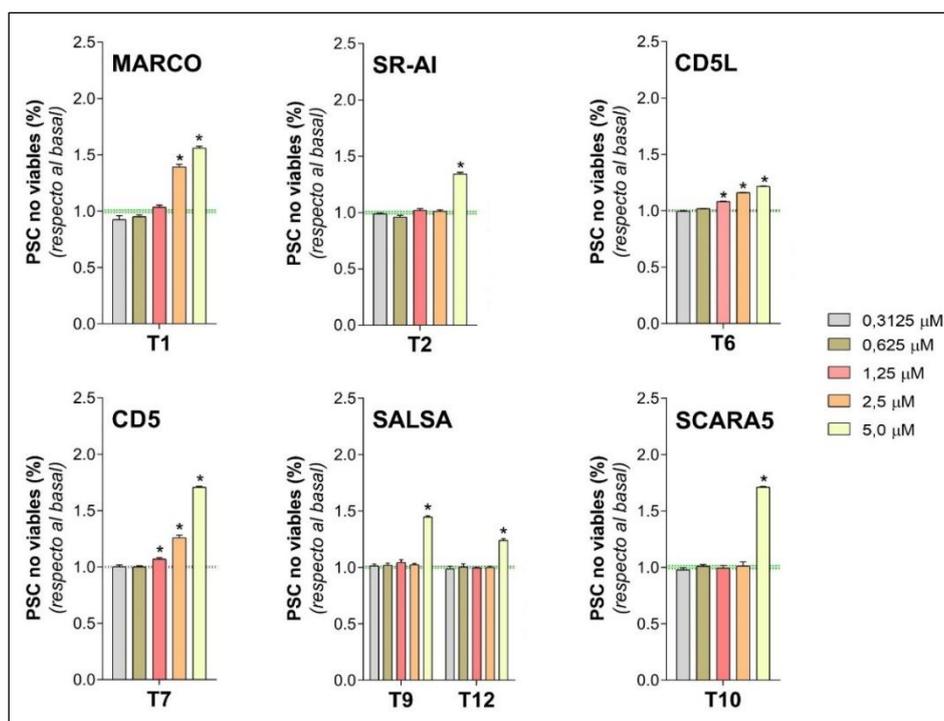


Figura 6.7. Actividad protoscolicida intrínseca de los péptidos sintéticos 35-mer en condiciones metabólicamente estresantes. Se realizaron cultivos axénicos de PSC de *E. granulosus* s.l. en presencia de concentraciones crecientes de los péptidos sintéticos y se determinó el porcentaje de muerte con respecto a la condición de referencia (sin péptido). Se representan los resultados para aquellos RS con péptidos que presentaron actividad protoscolicida, normalizados respecto a la condición de referencia (cuyos valores se muestran como banda color verde). Para todos los casos se representa media (\pm SEM). (*) $p < 0,05$ (ANOVA, con corrección de Tukey) respecto al control de referencia.

Por otro lado, en la **Figura 6.8.** se muestran los resultados obtenidos para los RS cuyos péptidos sintéticos 35-mer no presentaron actividad antiparasitaria intrínseca significativa bajo condiciones metabólicamente estresantes en el rango de concentraciones ensayadas: CD163, CD6 y SSc5D. Estos resultados se encuentran, al menos parcialmente, en línea con los obtenidos anteriormente para los péptidos sintéticos 11-mer, donde todos los receptores, a excepción de CD163 y SSc5D presentaron al menos un péptido sintético 11-mer con actividad protoscolicida intrínseca en cultivos axénicos metabólicamente estresantes (**Figura 4.1.**). En este punto se destaca CD6, ya que, a diferencia de su tándem (**T8**), los 3 péptidos sintéticos 11-mer derivados de su secuencia (**p17**, **p18** y **p19**) sí presentaron actividad protoscolicida intrínseca en cultivos axénicos metabólicamente estresantes (**Figura 4.1.**), sugiriendo

esto que posibles cambios estructurales debidos a su disposición en formato de tándem lineal podría afectar dicha actividad.

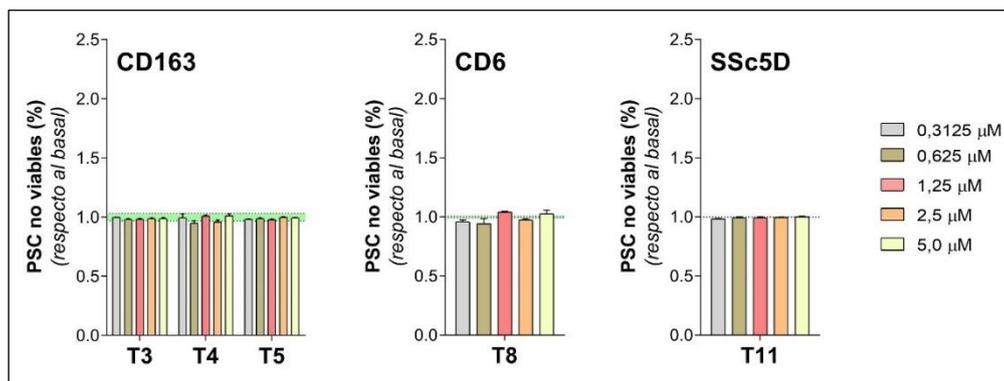


Figura 6.8. Actividad protoscolicida intrínseca de los péptidos sintéticos 35-mer en condiciones metabólicamente estresantes. Se realizaron cultivos axénicos de PSC de *E. granulosus* s.l. en presencia de concentraciones crecientes de los péptidos sintéticos y se determinó el porcentaje de muerte con respecto a la condición de referencia (sin péptido). Se representan los resultados para aquellos RS con péptidos que no presentaron actividad protoscolicida, normalizados respecto a la condición de referencia (cuyos valores se muestran como banda color verde). Para todos los casos se representa media (\pm SEM). (*) $p < 0,05$ (ANOVA, con corrección de Tukey) respecto al control de referencia.

Luego, se comparó la magnitud de la actividad protoscolicida intrínseca exhibida por los péptidos sintéticos 35-mer en cultivos axénicos metabólicamente estresantes. Para ello, y para minimizar posibles efectos debidos a la variabilidad entre lotes de parásitos, se realizó un nuevo ensayo utilizando los 12 péptidos sintéticos 35-mer en condiciones metabólicamente estresantes (PBS, 48 horas) a una concentración única (5 μ M) frente a un mismo lote de parásitos. En la **Figura 6.9.** se muestran los resultados obtenidos, observándose comportamientos similares a los obtenidos previamente (**Figura 6.7.** y **Figura 6.8.**). En ese sentido, podemos observar que 5 de los 12 péptidos 35-mer mantuvieron su capacidad antiparasitaria intrínseca respecto al ensayo previo, mientras que **T9** y **T10** la perdieron (**Figura 6.9.**). Por lo tanto, se pudo confirmar que la actividad antiparasitaria intrínseca de **T1**, **T2**, **T6**, **T7** y **T12** sería menos susceptible a posibles variaciones debidas al lote de parásitos utilizado. Además, los tándems **T1** y **T7** se destacaron por inducir incrementos superiores al 50% (1,5 veces) respecto del control basal; y, dado que en este ensayo este último valor fue de 15%, ambos tándems (a 5 μ M) indujeron aproximadamente un 25% de muerte parasitaria (**Figura 6.9.**). En este punto, resulta interesante destacar que el comportamiento observado para **T1** (derivado

del receptor MARCO) y **T7** (derivado del receptor CD5) fue similar al observado para los péptidos sintéticos 11-mer que los constituyeron; ya que **p1** (derivado de MARCO) y **p14**, **p15** y **p16** (derivados de CD5) mostraron incrementos de muerte parasitaria mayores al 50% respecto del control basal correspondiente (**Figura 4.3.**).

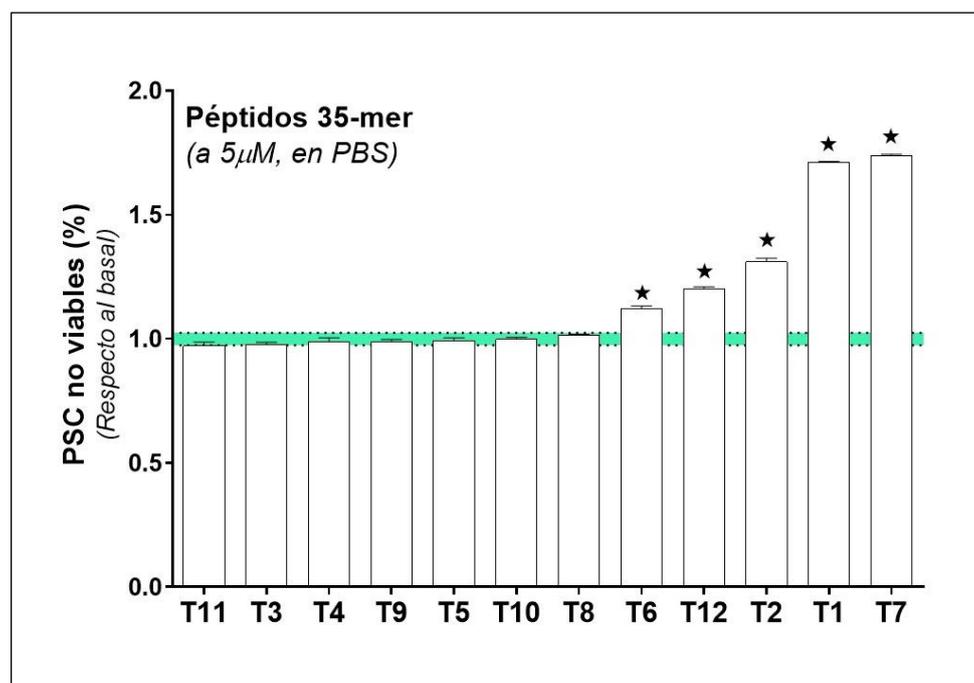


Figura 6.9. Actividad protoscolicida intrínseca de los péptidos sintéticos 35-mer a 5 μ M en PBS. Se realizó un cultivo axénico de PSC de *E. granulosus* s.l. en presencia de los péptidos sintéticos en estudio a concentración única (5 μ M) y se determinó el porcentaje de muerte con respecto a la condición de referencia (sin péptido). Se representan los resultados para cada péptido, normalizados respecto a la condición de referencia (cuyos valores se muestran como banda color verde). Para todos los casos se representa media (\pm SEM). (*) $p < 0,05$ (ANOVA, con corrección de Tukey) respecto al control de referencia.

6.6.2. Actividad protoscolicida intrínseca de los péptidos 35-mer: Cultivos axénicos metabólicamente óptimos.

Por otro lado, se evaluó la actividad protoscolicida intrínseca de los péptidos sintéticos 35-mer en cultivos parasitarios axénicos bajo condiciones metabólicamente óptimas (RPMI, 5 días). Nuevamente, estos ensayos no fueron ajenos a la variabilidad existente entre diferentes lotes de parásitos, ya que, con esta estrategia, el rango de muerte parasitaria basal osciló en el rango 1,4% hasta 4,3%; por lo tanto, en dichos

ensayos el incremento máximo alcanzable para péptidos con excelente actividad protoscolicida (100% de muerte), podría variar en el rango de 20-70 veces según las condiciones particulares del ensayo. Los resultados mostrados en la **Figura 6.10.** corresponden a los RS para los cuales al menos uno de sus tándems mostró actividad antiparasitaria intrínseca en condiciones metabólicamente óptimas, mientras que en la **Figura 6.11.** se agrupan aquellos RS cuyos tándems carecieron de dicha actividad en las concentraciones ensayadas.

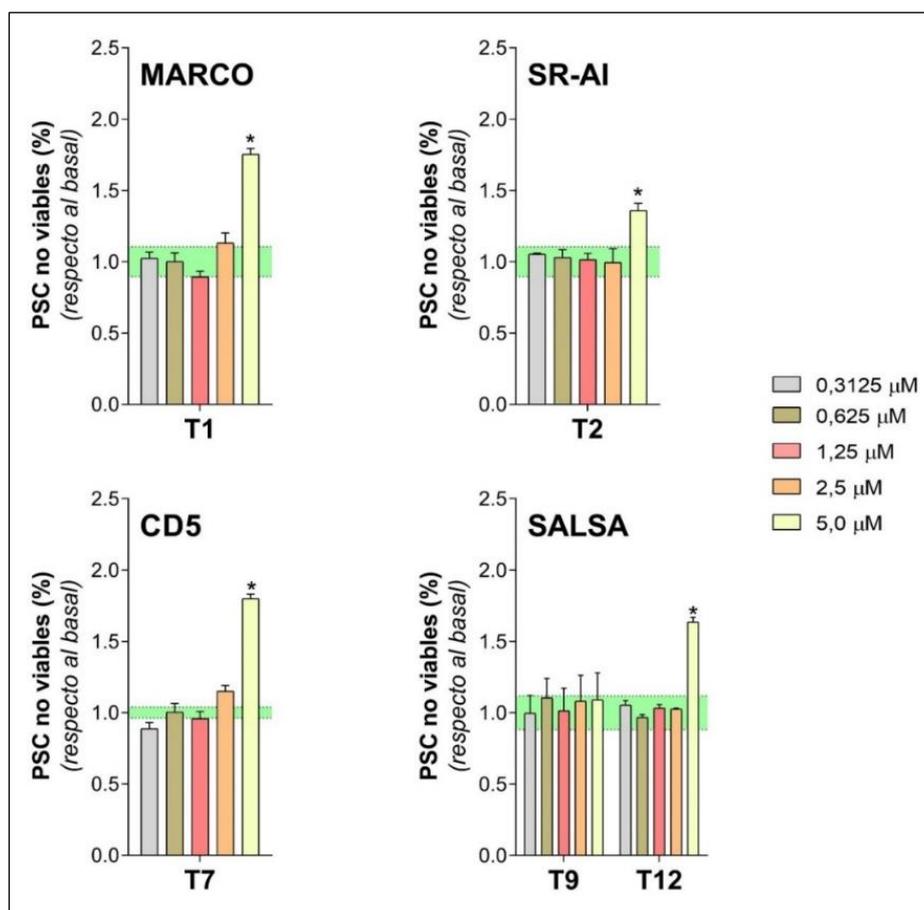


Figura 6.10. Actividad protoscolicida intrínseca de los péptidos sintéticos 35-mer en condiciones metabólicamente óptimas. Se realizaron cultivos axénicos de PSC de *E. granulosus* s.l. en presencia de concentraciones crecientes de los péptidos sintéticos y se determinó el porcentaje de muerte con respecto a la condición de referencia (sin péptido). Se representan los resultados para aquellos receptores que al menos uno de sus péptidos haya presentado actividad protoscolicida, normalizados respecto a la condición de referencia (cuyos valores se muestran como banda color verde). Para todos los casos se representa media (\pm SEM). (*) $p < 0,05$ (ANOVA, con corrección de Tukey) respecto al control de referencia.

De manera análoga a lo observado con los péptidos sintéticos 11-mer, las condiciones de este ensayo favorecieron la viabilidad parasitaria; y, por lo tanto, solo 4 de los 12 tándems exhibieron actividad protoscolicida intrínseca. Estos péptidos (**T1**, **T2**, **T7** y **T12**) derivaron cada uno de un RS distinto (**MARCO**, **SR-AI**, **CD5** y **SALSA**), respectivamente, mostrando actividad protoscolicida significativa solo a la máxima concentración ensayada. En este caso, los tándems **T1**, **T7** y **T12** mostraron los mejores resultados de actividad protoscolicida; incrementando la muerte parasitaria entre 1,5 y 2,0 veces respecto de la condición basal. Por último, cabe destacar que todos los tándems que exhibieron actividad antiparasitaria intrínseca lo hicieron tanto en condiciones metabólicamente estresantes como óptimas, a excepción de **T6**, quien solo presentó dicha actividad bajo condiciones metabólicamente estresantes (**Figura 6.6**).

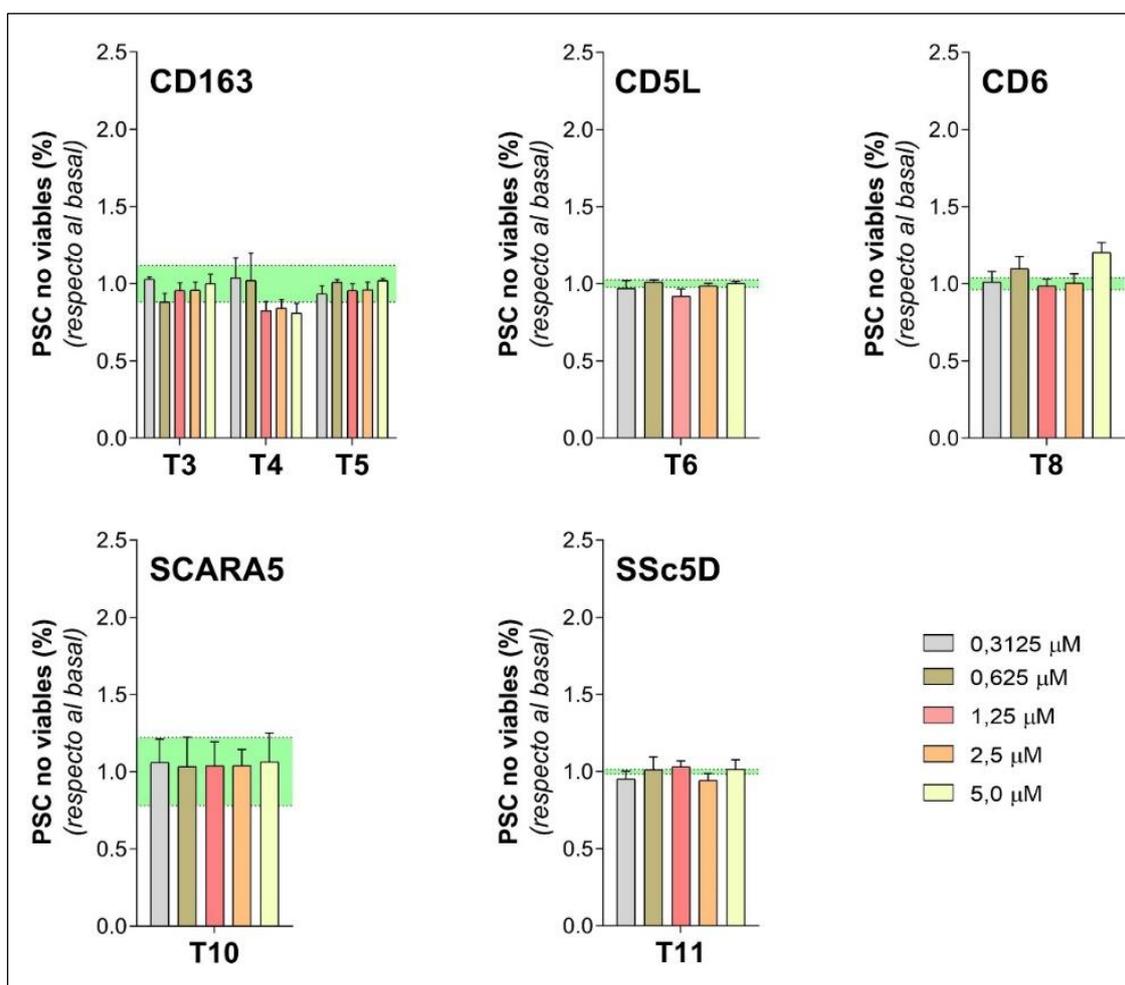


Figura 6.11. Actividad antiparasitaria intrínseca de los péptidos sintéticos 35-mer en condiciones metabólicamente óptimas. Se realizaron cultivos axénicos de PSC de *E. granulosus* s.l. en presencia de concentraciones crecientes de los péptidos sintéticos y se determinó el porcentaje de muerte con respecto a la condición de referencia (sin péptido). Se representan los resultados de los péptidos que no presentaron actividad protoscolicida, agrupados por receptor, normalizados respecto a la condición de referencia (cuyos valores se muestran como banda color verde). Para todos los casos se representa media (\pm SEM). (*) $p < 0,05$ (ANOVA, con corrección de Tukey) respecto al control de referencia.

De los resultados hasta aquí obtenidos, se destacan los correspondientes al tándem **T7** (derivado de CD5), recordando que: (i) la administración de rshCD5 indujo niveles significativos de actividad profiláctica en el modelo murino de EQ secundaria [Mourglia-Ettlin et al., 2018], (ii) rshCD5 mostró una fuerte actividad protoscolicida intrínseca en cultivos axénicos parasitarios tanto metabólicamente estresantes como óptimos [García-Luna et al., 2024], y (iii) varios de los posibles ligandos parasitarios identificados para rshCD5 fueron compartidos con los interactomas parasitarios de los péptidos sintéticos 11-mer derivados de su secuencia [Miles et al., 2020b]. Por lo tanto, la importante actividad protoscolicida intrínseca observada para **T7**, tanto bajo condiciones metabólicamente estresantes como óptimas, sugeriría que dicho tándem, muy probablemente, retenga la capacidad de interacción con ligandos parasitarios relevantes para la normal fisiología parasitaria; tal y como fue demostrado para rshCD5 y sus péptidos 11-mer derivados [Miles et al., 2020b]. De esta manera, **T7** podría ejercer funciones de tipo peptidomimético de rshCD5, destacando, así, como un candidato de interés para el diseño de intervenciones profilácticas frente a la EQ secundaria.

6.6.3. Actividad protoscolicida de los péptidos 35-mer en presencia de células efectoras.

En relación con la actividad protoscolicida de los tándems, se evaluó, por último, su actividad antiparasitaria en sistemas más complejos, realizando para ello co-cultivos de PSC de *E. granulosus* s.l. con células de la línea RAW264.7. en presencia de una concentración fija de péptidos. Muy brevemente, se sembraron células RAW264.7. junto con PSC de alta viabilidad en presencia de cada uno de los péptidos sintéticos 35-mer (20 μ g/mL). Las incubaciones se realizaron durante 72h, utilizando los siguientes controles: (i) células RAW264.7. solas, (ii) PSC solos, (iii) células RAW264.7.

incubadas con PSC (condición de referencia), y (iv) células RAW264.7 junto con PSC en presencia de 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS (control positivo). Luego, se tomaron fotografías de cada pocillo, y finalmente, los PSC se clasificaron siguiendo criterios morfológicos de integridad física según protocolos previamente desarrollados por nuestro grupo [Mourglia-Ettlin et al., 2016b; Arbildi et al. 2024]. Los resultados de muerte parasitaria obtenidos se normalizaron con respecto a la condición de referencia ($2,6\pm 0,7\%$), exhibiendo el control positivo valores de $6,0\pm 0,6\%$ (un incremento aproximado de 2,5 veces).

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 6.12.**, observándose que ninguno de los 12 tándems ensayados mostró diferencias significativas respecto de la condición de referencia. Así, y de manera análoga a lo observado previamente para los péptidos sintéticos 11-mer, resultó evidente que, al complejizar el sistema, se perdió la actividad antiparasitaria intrínseca previamente observada en los cultivos axénicos para algunos de los péptidos sintéticos. Este hecho cuestionaría, por lo tanto, la utilidad de los ensayos de co-cultivo realizados, al menos bajo las condiciones experimentales utilizadas.

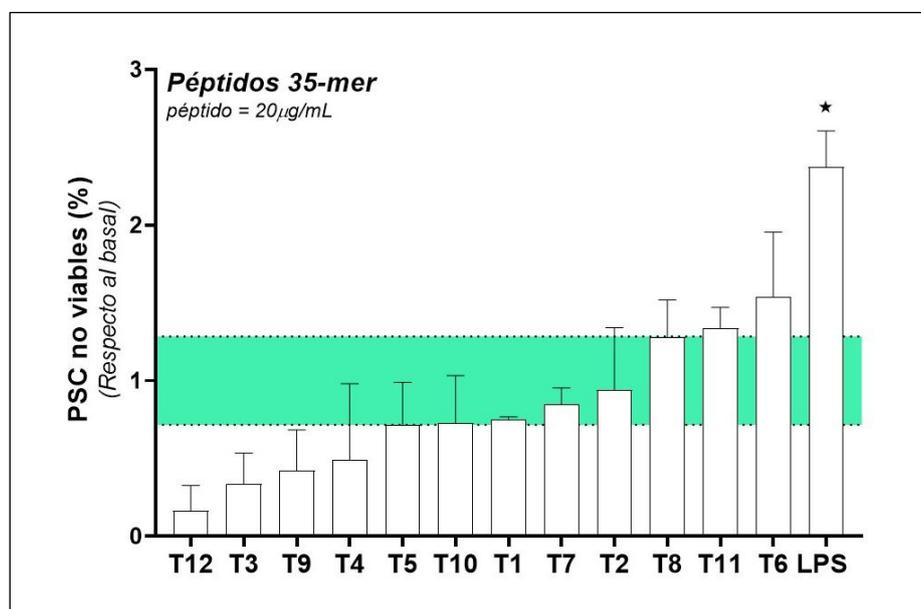


Figura 6.12. Co-cultivo de células RAW264.7 con PSC de *E. granulosus* s. l. Se realizaron co-cultivos de células RAW264.7 con PSC de *E. granulosus* s.l. ensayados en presencia de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de péptidos, y luego se determinó el porcentaje de muerte parasitaria. Como control basal se ensayaron co-cultivos en ausencia de péptidos, mientras que como control positivo se realizaron co-cultivos en presencia de LPS. Los resultados se muestran normalizados respecto del control basal (cuyos valores se

muestran como banda color verde). Para todos los casos se representa media (\pm SEM). (*) $p < 0,05$ (ANOVA, con corrección de Tukey) respecto del control basal.

6.7. Efectos inmunomoduladores de los péptidos 35-mer sobre PEC estimuladas con antígenos parasitarios.

De forma análoga a lo realizado con los péptidos sintéticos 11-mer, se evaluó el efecto de los tándems sobre la respuesta de citoquinas y de anticuerpos específicos (sAc) y polireactivos (pAc), inducidas en cultivos de PEC estimulados con PSEx (modelo de antígenos solubles presentes en el tegumento de PSC de *E. granulosus* s.l. [Miles et al., 2020a]).

6.7.1. Efecto de los péptidos 35-mer sobre la secreción de citoquinas en PEC estimuladas con antígenos parasitarios.

En primer lugar, se determinó la producción de las citoquinas IL-6, IL-10 y TNF- α en sobrenadantes de cultivo de PEC estimulados con PSEx; tanto en presencia como en ausencia de los tándems en estudio. Para ello se siguieron los protocolos previamente optimizados para el trabajo con los péptidos sintéticos 11-mer, utilizando como controles las siguientes condiciones: (i) control basal (PEC solas en medio de cultivo), (ii) control de referencia (PEC estimuladas únicamente con 15 μ g/mL de PSEx), y (iii) control positivo (PEC estimuladas únicamente con 1 μ g/mL de LPS). Los resultados obtenidos para el control de referencia fueron (promedio \pm SEM): 1.212 \pm 99 pg/mL para IL-6 y 278 \pm 119 pg/mL para IL-10, mientras que para TNF- α no se detectaron valores apreciables.

En la **Figura 6.13.** se muestran los resultados obtenidos, normalizados respecto al control de referencia (salvo para TNF- α , donde se muestran los valores de concentración). En cuanto a la producción de IL-6 se observó que 6 de los 12 tándems (**T1**, **T2**, **T4**, **T5**, **T7** y **T10**) potenciaron significativamente su producción en cultivos de PEC estimulados con PSEx; destacándose **T5** (derivado de CD163) y **T10** (derivado de SCARA5) por ser los mayores inductores. En este sentido, resulta interesante destacar que, de los péptidos sintéticos 11-mer que conformaron dichos tándems, solo **p16** potenció la producción de IL-6 (**Figura 5.1.**). Por el contrario, 5 de los 6 péptidos

sintéticos 11-mer que potenciaron la producción de dicha citoquina en cultivos de PEC estimulados con PSEx, perdieron dicho efecto al conformar las estructuras de tipo tándem. Por ejemplo, mientras que **p20**, **p21** y **p23** (péptidos sintéticos 11-mer derivados del receptor SALSA) potenciaron la producción de IL-6 (**Figura 5.1.**), **T9** y **T12** (tándems derivados del mismo receptor que contienen los péptidos 11-mer mencionados), no lo hicieron (**Figura 6.13.**). Por otra parte, ninguno de los péptidos sintéticos 35-mer redujo significativamente la producción de IL-6 inducida en cultivos de PEC estimulados con PSEx (**Figura 6.13.**).

Por otro lado, en cuanto a la producción de IL-10, los resultados reportados en la **Figura 6.13.** muestran que 5 de los 12 tándems (**T1**, **T2**, **T3**, **T8** y **T9**) potenciaron significativamente su producción en cultivos de PEC estimulados con PSEx; mientras que ninguno de los tándems la redujo. En este sentido, resulta interesante destacar que **T1** y **T2** potenciaron tanto la producción de IL-6 como de IL-10 (**Figura 6.13.**). Por su parte, se destaca que ninguno de los péptidos sintéticos 11-mer que dieron origen a los 5 tándems que potenciaron la producción de IL-10 modularon la producción de dicha citoquina en cultivos de PEC estimulados con PSEx (**Figura 5.1.**); sugiriendo que la interacción entre antígenos parasitarios y péptidos sintéticos 11-mer se alteraría cuando estos últimos se encuentran dentro de estructuras de tipo tándem lineal.

Por último, 6 de los 12 tándems (**T1**, **T2**, **T3**, **T8**, **T9** y **T10**) fueron capaces de potenciar la producción de TNF- α en cultivos de PEC estimulados con PSEx (**Figura 6.13.**). En este sentido, resulta interesante recordar que de los 27 péptidos sintéticos 11-mer ensayados, solo **p25** (derivado del receptor SSc5D) potenció la producción de TNF- α (**Figura 5.1.**), y el mismo no formó parte de ninguno de los 6 tándems mencionados (**T1**, **T2**, **T3**, **T8**, **T9** y **T10**); sugiriéndose entonces que las estructuras de tipo tándems lineal presentarían funciones sinérgicas, o distintas, a las exhibidas por los péptidos sintéticos 11-mer que las conforman. Sin embargo, la ausencia de niveles apreciables de TNF- α en el control de referencia, restaría fiabilidad a estos resultados dado que, como ya se mencionó, nuestro grupo reportó previamente la producción de TNF- α por parte de PEC estimuladas con PSEx [Mourglia-Ettlin et al., 2018]. Por ello, estos ensayos deberían repetirse para poder extraer conclusiones más confiables respecto del efecto que los péptidos sintéticos tendrían sobre la modulación de la producción de TNF- α en PEC estimuladas con PSEx.

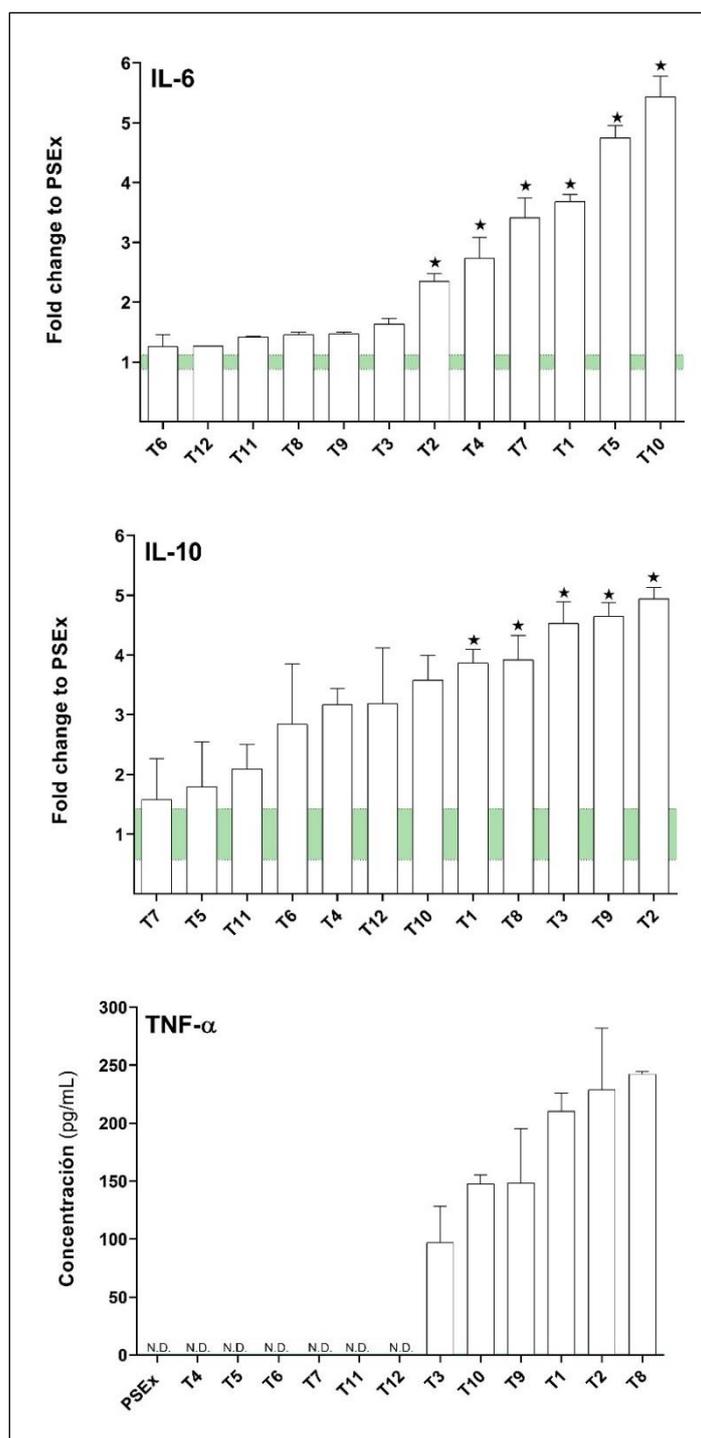


Figura 6.13. Determinación de IL-6, IL-10 y TNF- α en sobrenadantes de cultivo de PEC. Las PEC se estimularon con PSEx (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en presencia de los péptidos (45 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se determinó la concentración de las respectivas citoquinas mediante ensayo de ELISA. Como controles se utilizaron: (i) PEC solas en medio de cultivo, (ii) PEC estimuladas únicamente con PSEx (control de referencia), y (iii) PEC estimuladas con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, control positivo). Para IL-6 e IL-10, los resultados se muestran normalizados respecto al control de referencia (cuyos valores se muestran como banda color verde). Para TNF- α se representan sus valores de concentración. Para todos los casos se representa media (\pm SEM). (*) $p < 0,05$ (ANOVA, con corrección de Tukey) respecto al control de referencia.

6.7.2. Efecto de los péptidos 35-mer sobre la producción de anticuerpos por PEC estimuladas con antígenos parasitarios.

En paralelo al análisis de citoquinas, se evaluó el efecto de los tándems sobre los niveles anticuerpos específicos (sAc) y polireactivos (pAc) producidos por cultivos de PEC estimulados con PSEx. Para ello se siguieron los mismos protocolos previamente optimizados para la valoración de los péptidos sintéticos 11-mer, utilizando como controles las siguientes condiciones: (i) control basal (PEC solas en medio de cultivo), (ii) control de referencia (PEC estimuladas únicamente con 15 µg/mL de PSEx), y (iii) control positivo (PEC estimuladas únicamente con 0,1 µg/mL de LPS). La determinación de sAc y pAc se realizó mediante ELISA sobre placas de microtitulación sensibilizadas con antígenos somáticos de PSC de *E. granulosus* s.l. (fracción denominada SPE [Mourglia-Ettlin et al., 2016a]) o BSA-DNP (hapteno modelo para determinar polireactividad en anticuerpos [García-Luna et al., 2021]), respectivamente. El título de sAc y pAc se definió como el valor de absorbancia de las muestras ensayadas simultáneamente a una misma dilución (no saturante) y, finalmente, se reportaron normalizados respecto del control de referencia correspondiente. En la **Tabla 5.1.** se reportaron previamente los resultados obtenidos para los controles ensayados.

En la **Figura 6.14.** se muestran los resultados obtenidos sobre el efecto de los tándems en la producción de sAc por parte de PEC estimuladas con PSEx. Para sIgM se observó que 2 de los 12 péptidos ensayados (**T8** y **T9**) potenciaron su producción, mientras que otros 2 (**T2** y **T3**) la disminuyeron. Por su parte, para sIgA se observó que solo **T2** moduló su producción, reduciéndola significativamente; mientras que ninguno la potenció. Por último, ninguno de los péptidos sintéticos 35-mer moduló significativamente la producción sIgG por parte de PEC estimuladas con PSEx.

Por su parte, en la **Figura 6.15.** se resumen los resultados obtenidos sobre el efecto de los tándems en la producción de pAc por parte de PEC estimuladas con PSEx. En este caso, se observó que los niveles de pIgM y pIgG fueron ambos modulados por los mismos 2 tándems y en el mismo sentido: mientras que **T1** potenció significativamente su producción, **T8** la reprimió. En cuanto a pIgA, aunque la gran mayoría de los péptidos sintéticos 35-mer (10 de 12) modularon negativamente su producción (**T2, T3, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11, T12**), ninguno la potenció. En este punto, se destaca **T8** ya que fue capaz de potenciar la producción de sIgM (**Figura**

6.14.) y, simultáneamente, reprimió las respuestas de pAc independientemente del isotipo analizado (**Figura 6.15.**). Lamentablemente, debido a los requerimientos mínimos impuestos por el *software* de análisis para frecuencias aminoacídicas, dicho estudio no se pudo realizar para los estudios de inmunomodulación sobre cultivos de PEC estimulados con PSEx.

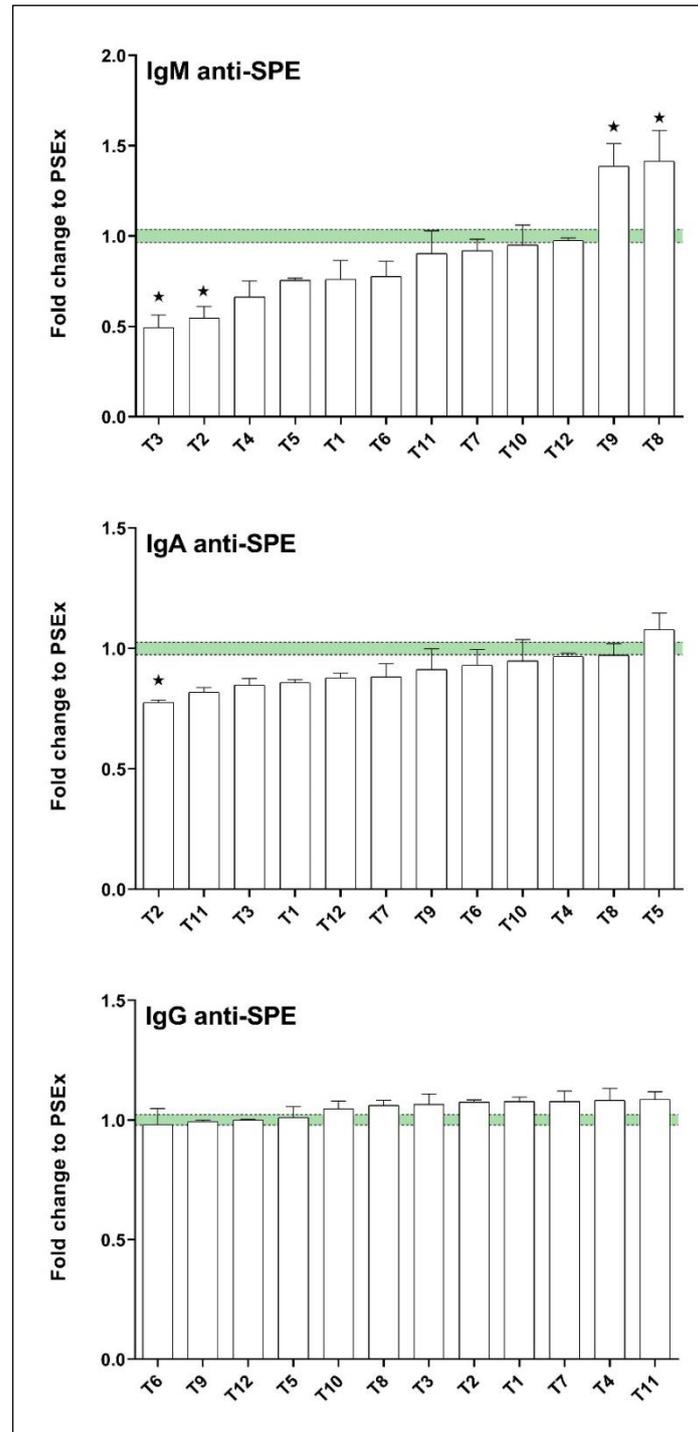
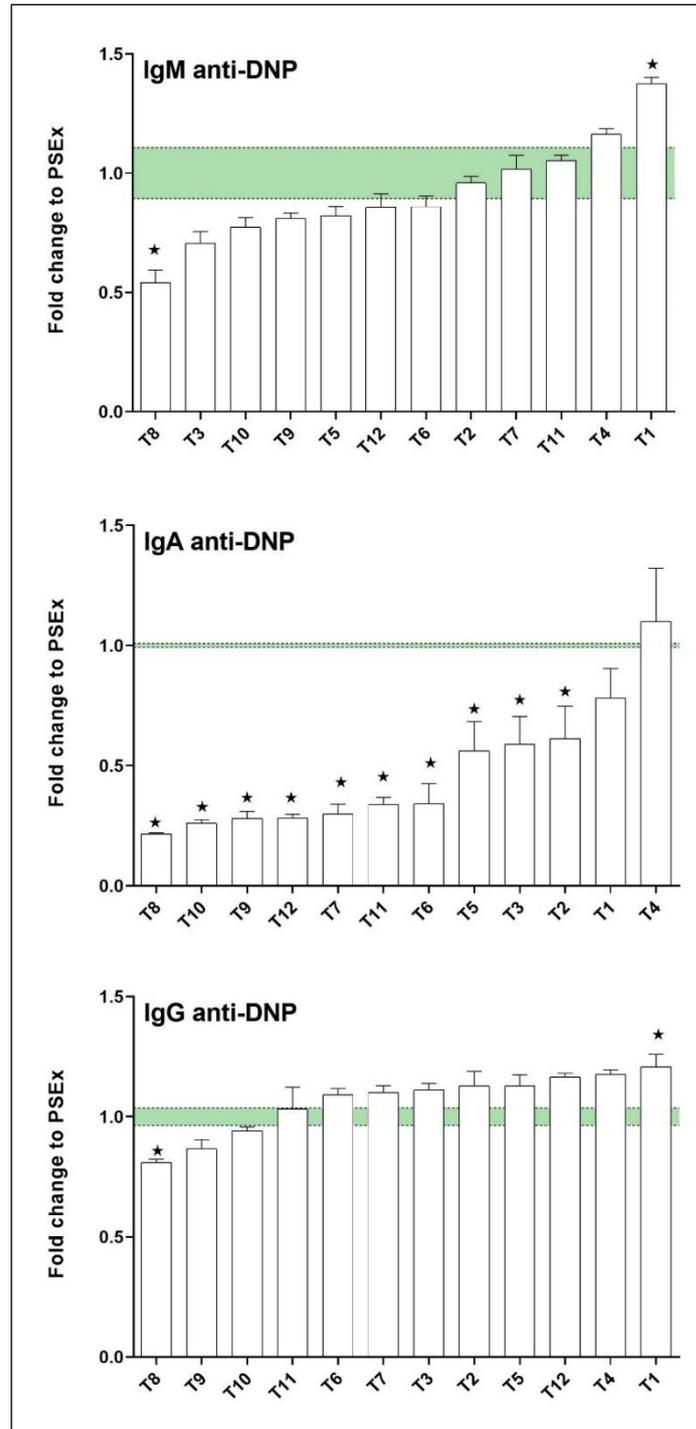


Figura 6.14. Determinación de anticuerpos específicos anti-SPE (IgM, IgA e IgG). Las PEC se estimularon con PSEx (15 µg/mL) en presencia de los péptidos (45 µg/mL) y se determinó el título de los respectivos isotipos ensayo de ELISA. Como controles se utilizaron: (i) PEC solas en medio de cultivo, (ii) PEC estimuladas únicamente con PSEx (control de referencia), y (iii) PEC estimuladas con LPS (1 µg/mL, control positivo). Los resultados se muestran normalizados respecto a la condición de referencia (cuyos valores se muestran como banda color verde). Para todos los casos se representa media (± SEM). (*) $p < 0,05$ (ANOVA, con corrección de Tukey) respecto al control de referencia.



B.C. María Clara González Porcile

Figura 6.15. Determinación de anticuerpos polireactivos anti-DNP (IgM, IgA e IgG). Las PEC se estimularon con PSEx (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en presencia de los péptidos (45 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se determinó el título de los respectivos isotipos ensayo de ELISA. Como controles se utilizaron: (i) PEC solas en medio de cultivo, (ii) PEC estimuladas únicamente con PSEx (control de referencia), y (iii) PEC estimuladas con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, control positivo). Los resultados se muestran normalizados respecto a la condición de referencia (cuyos valores se muestran como banda color verde). Para todos los casos se representa media (\pm SEM). (*) $p < 0,05$ (ANOVA, con corrección de Tukey) respecto al control de referencia.

6.8. Efecto de los péptidos 35-mer sobre la interacción física entre células RAW264.7. y antígenos parasitarios.

Para evaluar el efecto de los tándems sobre la interacción de células RAW264.7. con antígenos parasitarios, se procedió de manera análoga al estudio realizado con los péptidos sintéticos 11-mer. Muy brevemente, se pre-incubaron 2 μg de la sonda PSEx-FITC con distintas masas de cada tándem (5, 20 y 50 μg), y luego se incubaron con células RAW264.7. a 4°C. Como condición de referencia se incubaron células RAW264.7. en presencia únicamente de la sonda PSEx-FITC. Luego, las células se analizaron mediante citometría de flujo, determinando el valor de la media geométrica (GeoMean) para la intensidad de fluorescencia detectada en el canal FL-1 (FITC). Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 6.16.** y **Figura 6.17.** normalizados respecto de la condición de referencia y agrupados según el RS de origen de los tándems. Los valores de intensidad de fluorescencia obtenidos para la condición de referencia (promedio \pm SEM) oscilaron entre 3,38 \pm 0,08 y 7,5 \pm 0,2 para los distintos ensayos.

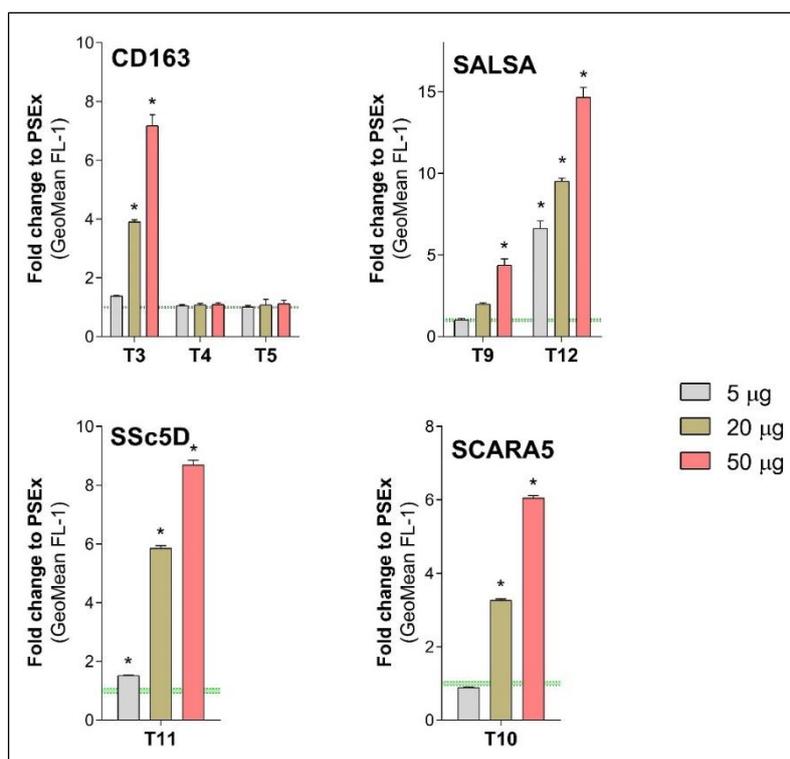


Figura 6.16. Ensayo de interacción física entre PSEx-FITC y células RAW264.7. Las células se incubaron con PSEx-FITC (2 µg) pre-incubado con masas crecientes de los péptidos sintéticos (5 µg, 20 µg y 50 µg) y se determinó la media geométrica de la intensidad de fluorescencia en el canal FL-1. Los resultados de aquellos RS cuyos péptidos potenciaron la interacción física, se muestran normalizados respecto a la condición basal (células incubadas únicamente con PSEx-FITC). Para todos los casos se representa media (\pm SEM). (*) $p < 0,05$ (ANOVA, con corrección de Tukey) respecto a la condición basal.

Como se observa en la **Figura 6.16.**, 5 de los 12 tándems en estudio (**T3**, **T9**, **T10**, **T11** y **T12**) potenciaron significativamente la interacción entre las células RAW264.7. y la sonda PSEx-FITC; al menos en una de las masas de tándems ensayadas. Los incrementos observados variaron desde 1,5 hasta 14,6 veces respecto de la condición de referencia; siendo máximo para **T12** (derivado del receptor SALSA). Por otro lado, únicamente el **T8** (derivado del receptor CD6) redujo significativamente la interacción entre células RAW264.7. y la sonda PSEx-FITC; mientras que la mitad de los péptidos sintéticos 35-mer (**T1**, **T2**, **T4**, **T5**, **T6** y **T7**) no mostraron efecto alguno en el rango de masas ensayadas (**Figura 6.17.**).

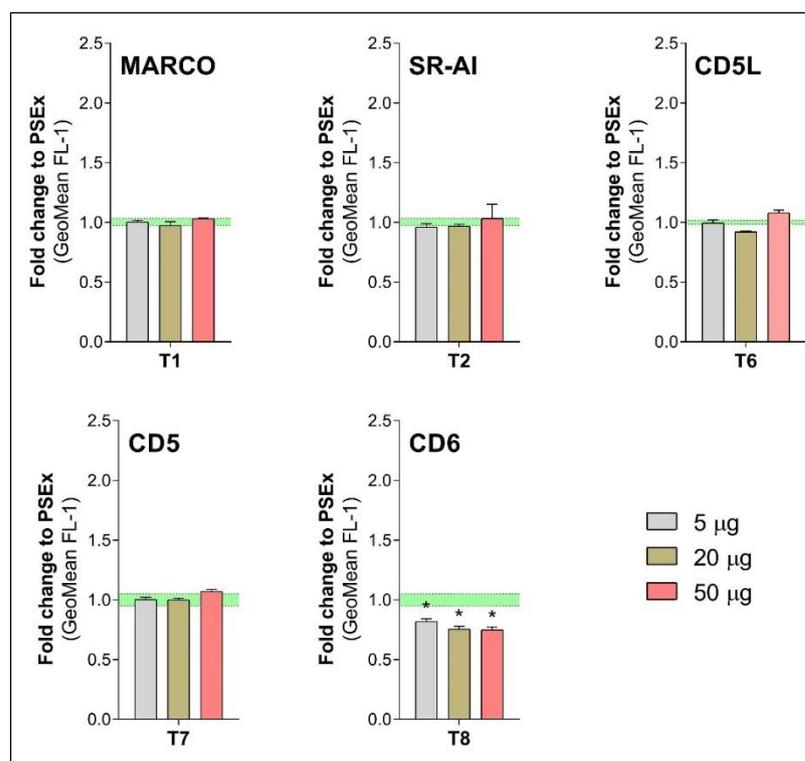


Figura 6.17. Ensayo de interacción física entre PSEx-FITC y células RAW264.7. Las células se incubaron con PSEx-FITC (2 µg) pre-incubado con masas crecientes de los péptidos sintéticos (5 µg, 20 µg y 50 µg) y se determinó la media geométrica de la intensidad de fluorescencia en el canal FL-1. Los resultados de aquellos RS cuyos péptidos reprimieron, o no modificaron, la interacción física, se muestran normalizados respecto a la condición basal (células incubadas únicamente con PSEx-FITC). Para todos los casos se representa media (\pm SEM). (*) $p < 0,05$ (ANOVA, con corrección de Tukey) respecto a la condición basal.

Como se discutió previamente, nuestro grupo de trabajo demostró recientemente que rshCD6 es capaz de interferir en la interacción entre macrófagos peritoneales primarios y la sonda PSEx-FITC [García-Luna, 2022]. En este sentido, resulta interesante destacar que, mientras los péptidos sintéticos 11-mer derivados de CD6 o bien no afectaron la interacción entre células RAW264.7. y la sonda PSEx-FITC (p17), o bien la potenciaron (p18 y p19) (Figura 5.8.), el tándem conformado por dichos péptidos 11-mer (T8) fue el único en reducir de manera significativa dicha interacción (Figura 6.17.). Esto sugeriría entonces que los péptidos sintéticos 11-mer derivados de CD6 no retienen la capacidad de bloqueo observada para rshCD6, pero que la misma se recupera cuando se combinan linealmente para conformar T8; actuando este tándem como un posible peptidomimético de rshCD6, al menos en este aspecto.

Finalmente, se construyó la **Figura 6.18.** para facilitar la integración visual de los resultados obtenidos sobre el efecto de los tándems en la interacción entre células RAW264.7. y la sonda PSEx-FITC. En dicha figura, se resumen los valores hallados para la incubación con 50 μg de cada tándem, normalizados respecto de la condición de referencia correspondiente. Así, se observó que: (i) la mitad de los tándems no modularon la interacción, (ii) **T8** fue el único tándem en reducirla significativamente, y (iii) cinco tándems la potenciaron significativamente (**T3**, **T9**, **T10**, **T11** y **T12**). En este último aspecto, se destaca **T12** por inducir el mayor incremento observado, en línea con lo reportado previamente para **p20** (*pbs1*), el péptido sintético 11-mer que conforma su secuencia (**Figura 5.3.**).

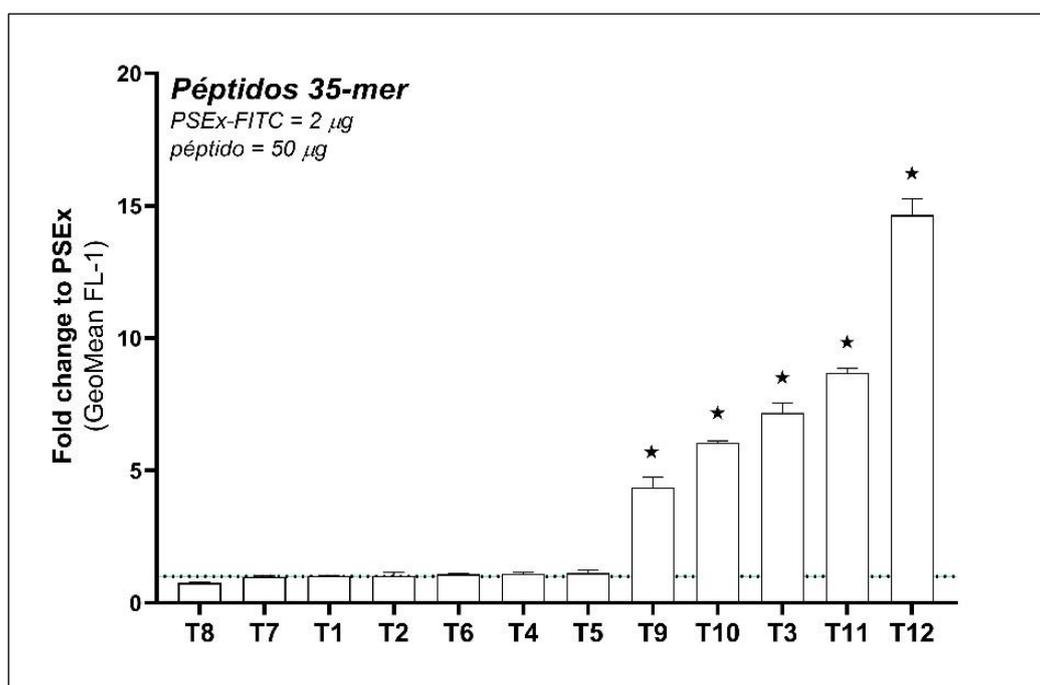


Figura 6.18. Ensayo de interacción física entre PSEx-FITC y células RAW264.7. Representación gráfica de los resultados obtenidos en los distintos ensayos realizados para la condición 50 μg . Los resultados se muestran normalizados respecto a la condición de referencia (células incubadas únicamente con PSEx) según corresponda a su ensayo. Para todos los casos se representa media (\pm SEM). (*) $p < 0,05$ (ANOVA, con corrección de Tukey) respecto al control de referencia.

6.9. Efectos inmunomoduladores de los péptidos 35-mer sobre células RAW264.7. estimuladas con antígenos parasitarios.

Luego de confirmar que algunos de los péptidos sintéticos 35-mer modulan la interacción entre células RAW264.7. y la sonda PSEx-FITC, se evaluó el efecto de los tándems sobre la respuesta de citoquinas y sobre la producción de óxido nítrico (NO) inducidas en cultivos de células RAW264.7. estimulados con PSEx.

6.9.1. Efecto de los péptidos 35-mer sobre la secreción de citoquinas en células RAW264.7. estimuladas con antígenos parasitarios.

En primer lugar, se evaluó el efecto de los tándems sobre la producción de IL-6, IL-10 y TNF- α en cultivos de células RAW264.7. estimuladas con PSEx. Para ello, se procedió de forma análoga a lo realizado con los péptidos sintéticos 11-mer, determinando la concentración de citoquinas en sobrenadantes de cultivos mediante el uso de *kits* comerciales para ELISA de captura. Muy brevemente, se incubaron células RAW264.7. en presencia de 15 $\mu\text{g/mL}$ de PSEx y 45 $\mu\text{g/mL}$ de cada uno de los tándems en estudio, ensayando como controles las siguientes condiciones: (i) control basal (células RAW264.7. solas en medio de cultivo), (ii) control de referencia (células RAW264.7. estimuladas únicamente con 15 $\mu\text{g/mL}$ de PSEx), y (iii) control positivo (células RAW264.7. estimuladas únicamente con 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS).

En la **Figura 6.19.** se muestran los resultados obtenidos; destacándose, al igual que en el ensayo análogo con péptidos sintéticos 11-mer, que no se detectó ninguna de las citoquinas analizadas en el control de referencia. Sin embargo, se observó que 3, 6 y 12 de los tándems indujeron la secreción de IL-6, IL-10 y TNF- α , respectivamente, en cultivos de células RAW264.7. estimuladas con PSEx. En líneas generales, se observaron valores bajos de concentración para IL-6 (nunca superiores a 70 pg/mL) y altos para IL-10 y TNF- α (cercaos a 400 y 4.000 pg/mL , respectivamente). En particular, los tándems **T5**, **T6** y **T7** se destacaron por potenciar la producción de las tres citoquinas, siendo los únicos que indujeron la producción de IL-6 y los mejores potenciadores de IL-10. Por su parte, y junto a los tándems **T4** y **T12**, indujeron los mayores niveles de TNF- α . Por lo tanto, los tándems **T5**, **T6** y **T7** se destacaron por ser

los únicos en potenciar en gran medida la producción de las tres citoquinas en estudio (Figura 6.19).

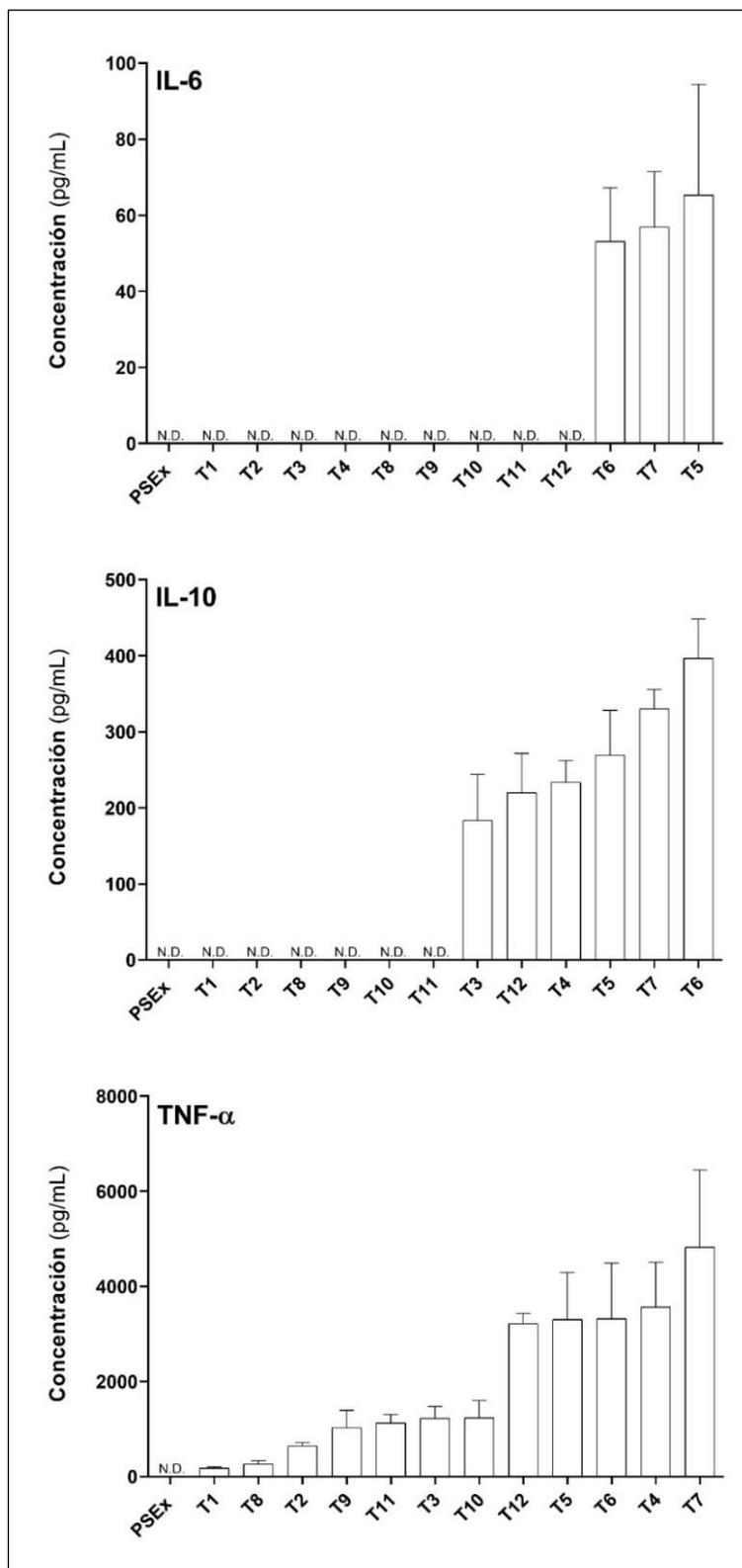


Figura 6.19. Determinación de IL-6, IL-10 y TNF- α en sobrenadantes de cultivos de células RAW264.7. Las células RAW264.7 se estimularon con PSEx (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en presencia de los péptidos (45 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se determinó la concentración de las respectivas citoquinas mediante ensayo de ELISA. Como controles se utilizaron: (i) células solas en medio de cultivo, (ii) células estimuladas únicamente con PSEx (control de referencia), y (iii) células estimuladas con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, control positivo). Para todos los casos se representa los valores de concentración (media \pm SEM). (*) $p < 0,05$ (ANOVA, con corrección de Tukey) respecto al control de referencia.

En este contexto, resulta interesante recordar que los tándems **T5**, **T6** y **T7** no modularon la interacción física entre células RAW264.7. y la sonda PSEx-FITC, mientras que **T12** indujo el mayor incremento en dicha interacción (**Figura 6.16.**). Sin embargo, los tándems **T5**, **T6** y **T7** fueron los mayores moduladores de la respuesta de citoquinas en células RAW264.7. estimuladas con PSEx, mientras que **T12** potenció a niveles medios la producción solo de IL-10 y TNF- α (**Figura 6.19.**). Por lo tanto, estos resultados sugerirían, nuevamente, la ausencia de un nexo inequívoco entre modulación de la interacción física de células RAW264.7. y la sonda PSEx-FITC, inducida por los péptidos sintéticos 35-mer, y los efectos de estos últimos sobre la secreción de citoquinas derivada de dicha interacción. Así, los resultados obtenidos con los tándems en este aspecto estarían en línea con los previamente comentados para los péptidos sintéticos 11-mer (**Figura 5.8.** y **Figura 5.12.**).

6.9.2. Efecto de los péptidos 35-mer sobre la producción de NO en células RAW264.7. estimuladas con antígenos parasitarios.

De manera análoga a lo realizado con los péptidos sintéticos 11-mer, se evaluó el efecto de los tándems sobre la producción de NO por parte de células RAW264.7. estimuladas con PSEx. La producción de NO se determinó mediante la reacción de Griess aplicada a sobrenadantes de cultivo de células RAW264.7. incubadas con PSEx en presencia de cada uno de los tándems, utilizando los protocolos desarrollados previamente para el estudio de los péptidos sintéticos 11-mer y ensayando las siguientes condiciones control: (i) control basal (células RAW264.7. en medio de cultivo), (ii) control de referencia (células RAW264.7. estimuladas únicamente con 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PSEx), y (iii) control positivo (células RAW264.7. estimuladas únicamente con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS). Los valores de concentración de nitritos (promedio \pm SEM) en el control de

referencia y en el control positivo fueron de $135 \pm 9 \mu\text{M}$ y $163 \pm 19 \mu\text{M}$, respectivamente, mientras que en el control basal no se detectaron valores apreciables.

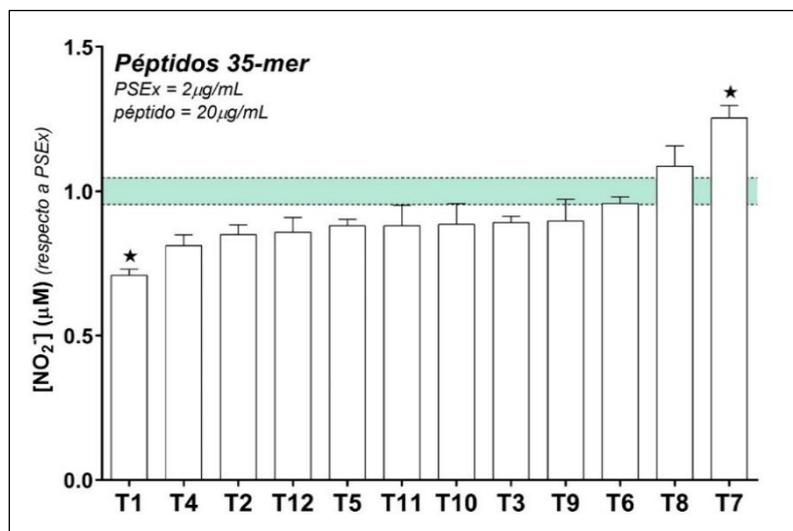


Figura 6.20. Producción de óxido nítrico. Las células se estimularon PSEx en presencia de los péptidos en estudio y se evaluó la producción de NO. Como control de referencia se utilizaron células RAW264.7 en medio de cultivo, como control de referencia: células RAW264.7 estimuladas con PSEx (2 $\mu\text{g/mL}$) y como control positivo: células RAW264.7 estimuladas con LPS (1 $\mu\text{g/mL}$). Los resultados se muestran normalizados respecto a la condición de referencia (cuyos valores se muestran como banda color verde). Para todos los casos se representa media (\pm SEM). (*): Diferencia significativa (ANOVA con corrección de Tukey; $p < 0,05$) respecto al control de referencia.

En la **Figura 6.20.** se muestran los resultados obtenidos normalizados con respecto al control de referencia, observándose que únicamente **T7** (derivado del receptor CD5) potenció la producción de NO en células RAW264.7. estimuladas con PSEx, mientras que **T1** (derivado del receptor MARCO) reprimió dicha producción. Los restantes 10 tándems no mostraron modulaciones significativas en la producción de NO. En este punto, cabe destacar que ninguno de los 27 péptidos sintéticos 11-mer ensayados potenció la producción de NO en células RAW264.7. estimuladas con PSEx, mientras que solo dos de ellos (**p9** y **p11**, derivados de CD163 y CD5L, respectivamente) la disminuyeron significativamente (**Figura 5.17.**), no existiendo por lo tanto una correlación entre dichos péptidos sintéticos 11-mer y los tándems **T1** y **T7**. Por lo tanto, los resultados obtenidos sugerirían que la conformación de estructuras de tipo tándem lineal a partir de los respectivos péptidos 11-mer no favorecería la

modulación de la respuesta respecto a la producción de NO por parte de células RAW264.7. estimuladas con PSEx.

Finalmente, y con el objetivo de facilitar visualmente la integración del gran y diverso volumen de datos recabados en el presente capítulo, se generó la **Tabla 6.6.** para resumir comparativa y simultáneamente los mismos. En ella, los péptidos sintéticos 35-mer analizados se ordenaron de manera creciente de acuerdo al número de parámetros que fueron capaces de modificar; destacándose los extremos de la tabla. Por un lado, **T11** (derivado del receptor SSc5D) ejerció el menor número de acciones inmunomoduladoras. En este sentido, resulta interesante destacar que mientras los péptidos sintéticos **p25** y **p27**, ambos constituyentes de **T11**, ejercieron el mayor número de actividades inmunomoduladoras en sus respectivos ensayos (**Tabla 5.1.**), la mayoría de las mismas se perdieron una vez dentro de la estructura de tipo tándem lineal **T11** (**Tabla 6.6.**); mostrando la importante variación existente entre sus formas “libres” vs. “en tándem lineal”. Por otro lado, en el extremo inferior de la tabla se destacan **T1**, **T2** y **T8** por exhibir el mayor número de actividades inmunomoduladoras (**Tabla 6.6.**). En este punto, resulta interesante destacar que mientras **T1** y **T2** no modificaron la interacción entre células RAW264.7 y la sonda PSEx-FITC, **T8** fue el único tándem que bloqueó significativamente dicha interacción (**Figura 6.17**), mientras que los péptidos 11-mer que lo conformaron o bien no afectaron dicha interacción (**p17**), o bien la potenciaron (**p18** y **p19**) (**Figura 5.8.**). Estos hallazgos sugerirían nuevamente que las interacciones péptido-antígeno involucrados en las funciones inmunomoduladoras no serían necesariamente las mismas que las implicadas en la interacción célula-antígeno.

En suma, mediante la ejecución del Objetivo Específico #5 de la presente tesis, se diseñaron 12 péptidos 35-mer en formato tándem a partir de las secuencias 11-mer homólogas a *pbs1* previamente halladas en los RS MARCO, SR-AI, CD163, CD5L, CD5, CD6, SALSA, SCARA5 y SSc5D. Los tándems diseñados mostraron alta diversidad de secuencias y de estructuras tridimensionales posibles; así como diferencias en sus propiedades fisicoquímicas. Dichos péptidos 35-mer se sintetizaron comercialmente con alta pureza, se solubilizaron exitosamente y mostraron muy buenos perfiles de biocompatibilidad con sistemas mamíferos. Por su parte, 7 de los 12 tándems exhibieron actividad antiparasitaria intrínseca en cultivos axénicos bajo condiciones

metabólicamente estresantes, y 4 de ellos retuvieron dicha actividad bajo condiciones metabólicamente óptimas. Estos resultados sugirieron que, al menos algunos de los 12 tándems diseñados, serían de interés para el diseño de intervenciones profilácticas con acciones protoscolicidas. Finalmente, se observó que, al menos *in vitro*, los tándems diseñados exhibieron un amplio y variado abanico de actividades potencialmente inmunomoduladoras, algunas de las cuales podrían ser de utilidad a la hora de diseñar posibles usos profiláctico y/o terapéuticos frente a la EQ secundaria.

Tabla 6.6. Resumen de resultados de ensayos funcionales para células RAW264.7 y PEC. (↑) Potencian, (↓) Reprimen, (=) Sin efecto. Verde: aumentan interacción entre células RAW264.7 y PSEx-FITC. Rojo: disminuyen dicha interacción. Blanco: no modulan la interacción entre células RAW264.7 y PSEx-FITC.

Péptidos 35-mer	Citoquinas (RAW264.7.)			NO	Citoquinas (PEC)			sAc			pAc		
	IL6	IL10	TNF α		IL6	IL10	TNF α	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG
T11	=	=	↑	=	=	=	=	=	=	=	=	↓	=
T10	=	=	↑	=	↑	=	↑	=	=	=	=	↓	=
T4	=	↑	↑	=	↑	=	=	=	=	=	=	=	=
T12	=	↑	↑	=	=	=	=	=	=	=	=	↓	=
T6	↑	↑	↑	=	=	=	=	=	=	=	=	↓	=
T5	↑	↑	↑	=	↑	=	=	=	=	=	=	↓	=
T9	=	=	↑	=	=	↑	↑	↑	=	=	=	↓	=
T3	=	↑	↑	=	=	↑	↑	↓	=	=	=	↓	=
T7	↑	↑	↑	↑	↑	=	=	=	=	=	=	↓	=
T2	=	=	↑	=	↑	↑	↑	↓	↓	=	=	↓	=
T8	=	=	↑	=	=	↑	↑	↑	=	=	↓	↓	↓
T1	=	=	↑	↓	↑	↑	↑	=	=	=	↑	=	↑

Capítulo 7.

Efectos profilácticos e inmunomoduladores inducidos sobre el modelo murino de EQ secundaria por parte de los péptidos sintéticos diseñados.

Resultados y discusión.

En el presente capítulo, se abordan los principales resultados obtenidos en relación a la caracterización *in vivo* de los efectos profilácticos e inmunomoduladores inducidos por los péptidos sintéticos *11-mer* y *35-mer* sobre el modelo murino de EQ secundaria (Objetivo específico #6). En este sentido, se reportan los distintos esquemas de trabajo y sus respectivas condiciones; y se describen y analizan los resultados obtenidos. Cabe mencionar que, si bien originalmente se planificó realizar estos ensayos luego de culminar con la caracterización *in vitro* de la actividad antiparasitaria e inmunomoduladora de los péptidos sintéticos, dicho orden cronológico no pudo llevarse a cabo dadas las características propias del modelo experimental de EQ secundaria; principalmente, el largo tiempo de desarrollo parasitario en el hospedero murino. Así, los ensayos *in vivo* reportados en el presente capítulo se debieron realizar en paralelo con las actividades descritas en los capítulos precedentes.

A grandes rasgos, para evaluar el potencial profiláctico de los péptidos sintéticos en estudio se utilizó el modelo murino de EQ secundaria [González-Porcile et al., 2024], siguiendo una estrategia similar a la reportada en el estudio de profilaxis realizado con los ectodominios recombinantes solubles de CD5 y CD6 (rshCD5 y rshCD6) [Mourglia-Ettlin et al., 2018]. En dicho estudio, se realizaron dos administraciones intraperitoneales (i.p.) de 25 µg/proteína/ratón cada una: una 1 h pre-desafío parasitario y la otra 1 h post-desafío. Para ello, se trabajó con cuatro grupos de ratones hembras adultas de la cepa Balb/c (n=6-8/grupo), las cuales se desafiaron mediante inoculación i.p. con 200 µL de una suspensión conteniendo 2.000 PSC viables de *E. granulosus* s.s. (genotipo G1) en PBS estéril: (i) grupo control (desafiados y tratados con PBS estéril), (ii) grupo control negativo de tratamiento (desafiados y tratados con BSA en PBS estéril), (iii) grupo experimental de tratamiento CD5 (desafiados y tratados con rshCD5 en PBS estéril) y (iv) grupo experimental de tratamiento CD6 (desafiados y tratados con

rshCD6 en PBS estéril). Luego de 14 meses post-infección (p.i.), se realizó la eutanasia de todos los animales y, tras su necropsia, se analizaron diversos parámetros parasitológicos. Los resultados obtenidos mostraron que rshCD5, y en menor medida rshCD6, presentaron acciones profilácticas significativas en el modelo murino de EQ secundaria, ya que su infusión redujo la proporción de ratones efectivamente infectados, así como el número de quistes hidáticos desarrollados y la carga parasitaria total por ratón [Mourglia-Ettlin et al., 2018].

En los experimentos descritos en el presente capítulo, los animales (en todos los casos ratones hembras Balb/c adultas) se desafiaron y se trataron de manera similar a lo reportado previamente [Mourglia-Ettlin et al. 2018], con algunas modificaciones que se describen en cada experimento, para luego, analizar el resultado de los diversos tratamientos sobre el desarrollo de la EQ secundaria. Para ello, se realizó la eutanasia de los ratones mediante exceso de anestesia inhalatoria 7 meses p.i. para luego realizar inmediatamente su necropsia, exponiendo cuidadosamente la cavidad peritoneal. Los quistes encontrados se removieron y se identificaron según el ratón de origen para su posterior análisis. Después del procesamiento de cada ratón se realizó una evaluación parasitológica del resultado de la infección, evaluando diversos parámetros: (i) número de individuos infectados por grupo (se consideró individuo infectado todo aquel que exhibió al menos un quiste hidatídico peritoneal en el punto final de la infección), (ii) masa quística total por ratón infectado (se definió como la suma de la masa individual de cada quiste dentro de un mismo ratón infectado), (iii) carga parasitaria total por ratón infectado (se definió como la suma del volumen individual de cada quiste dentro de un mismo ratón infectado).

Finalmente, y por motivos logísticos tanto de disponibilidad de ratones como de parásitos, sumado a las sucesivas dificultadas experimentadas, la evaluación del potencial valor profiláctico de los péptidos sintéticos se realizó en etapas, las cuales se describen a continuación en orden cronológico según el experimento al cual correspondieron.

Objetivo Específico #6: *Evaluar los efectos profilácticos e inmunomoduladores de los péptidos diseñados haciendo uso del modelo murino de EQ secundaria.*

7.1. Experimento #1: Valor profiláctico de los péptidos 11-mer derivados de CD5 y CD6.

Las actividades experimentales del presente capítulo se diseñaron inicialmente de manera que pudiese diferenciarse los efectos profilácticos reportados para los receptores CD5 y CD6 (rshCD5 y rshCD6) [Mourglia-Ettlin et al. 2018] de los demás receptores. Por ello, en primer lugar (**experimento #1**), se trabajó con tres grupos de ratones (n=10/grupo), los cuales se inocularon por vía i.p. con: (i) una solución de PBS estéril conteniendo una mezcla de los tres péptidos sintéticos 11-mer derivados de CD5 (**p14, p15 y p16**; 20 µg/péptido/ratón), (ii) una solución de PBS estéril conteniendo una mezcla de los tres péptidos 11-mer derivados de CD6 (**p17, p18 y p19**; 20 µg/péptido/ratón), o (iii) una solución de PBS estéril (grupo control). En todos los casos, se inocularon 200 µL de solución utilizando agujas estériles de calibre 27G. Luego de 30 min, todos los individuos de los tres grupos se inocularon i.p. con 200 µL/ratón de una suspensión conteniendo 2.000 PSC viables de *E. granulosus* s.l.; utilizando agujas estériles de calibre 23G. A los 7 meses p.i., se realizó la eutanasia y necropsia de todos los individuos y en la **Figura 7.1.** se resumen los resultados obtenidos.

En cuanto al número de individuos infectados, se observó que el total de los ratones de los tres grupos desarrolló quistes hidáticos en su cavidad peritoneal, sin diferencias en este parámetro entre tratamientos (**Figura 7.1.A.**). Por otra parte, los valores de mediana y rango para el análisis de masa total de quistes por ratón (en gramos) fueron de 4,87 (1,87-15,90) para el grupo control, 4,05 (1,09-8,47) para el grupo tratado con los péptidos sintéticos 11-mer derivados de CD5 y 6,43 (2,94-15,77) para el grupo tratado con los péptidos sintéticos 11-mer derivados de CD6; nuevamente sin diferencias significativas entre tratamientos (**Figura 7.1.B.**). Sin embargo, y pese a la gran dispersión individual observada, el grupo de ratones tratados con los péptidos sintéticos 11-mer derivados de CD5 mostró una tendencia numérica hacia la reducción en la masa total de quistes por ratón respecto del grupo control (4,87 vs. 4,05, respectivamente). Por su parte, los valores de mediana y rango para el análisis de carga parasitaria total de quistes por ratón (en mL) fueron de 4,75 (1,50-14,00) para el grupo control, 3,50 (1,00-7,50) para el grupo tratado con los péptidos sintéticos 11-mer derivados de CD5 y 5,50 (2,00-15,50) para el grupo tratado con los péptidos sintéticos 11-mer derivados de CD6, nuevamente sin diferencias significativas entre tratamientos

(Figura 7.1.C.). Sin embargo, nuevamente se observó que el grupo de ratones tratados con los péptidos sintéticos 11-mer derivados de CD5 mostró una tendencia numérica hacia la reducción en la carga parasitaria total por ratón respecto del grupo control (3,50 vs 4,75, respectivamente).

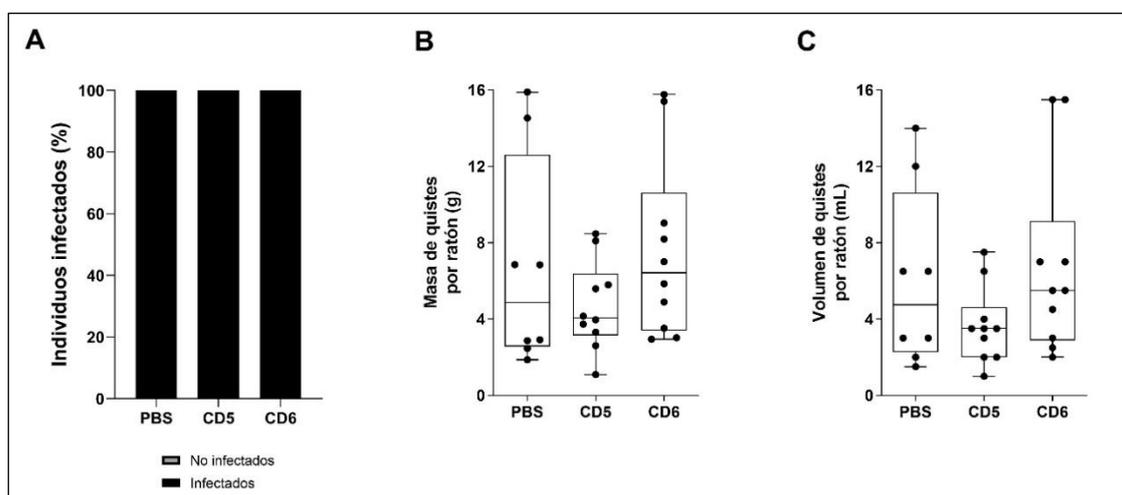


Figura 7.1. Evaluación del valor profiláctico de los péptidos sintéticos 11-mer derivados de CD5 y CD6. A tres grupos de ratones Balb/c ($n=10/\text{grupo}$) se les inoculó por vía i.p.: (i) una mezcla de péptidos sintéticos 11-mer derivados de CD5 (**p14**, **p15** y **p16**; 20 $\mu\text{g}/\text{péptido}/\text{ratón}$; grupo CD5), (ii) una mezcla de péptidos 11-mer derivados de CD6 (**p17**, **p18** y **p19**; 20 $\mu\text{g}/\text{péptido}/\text{ratón}$; grupo CD6), o (iii) PBS estéril (grupo PBS). Luego de 30 min se les inoculó por vía i.p. una suspensión de 2.000 PSC viables/ratón. El resultado del experimento se analizó 7 meses p.i., evaluando: (A) la proporción de ratones infectados, (B) la masa quística por ratón (g), y (C) el volumen de quistes por ratón (mL). En (B) y (C) se muestran los resultados en formato de cajas-y-bigotes. (*) $p<0,05$ (test de Fisher para A, test de Mann-Whitney para B y C; siempre respecto del grupo PBS).

Si bien estos resultados no fueron significativos, se obtuvieron valores de acción profiláctica promisorios para la mezcla de péptidos sintéticos 11-mer derivados de CD5, lo cual estaría en línea con el reporte previo de nuestro grupo referido a la acción profiláctica de rshCD5 en el modelo murino de EQ secundaria [Mourglia-Ettlin et al., 2018]. Asimismo, la acción potencialmente diferencial observada para los péptidos sintéticos 11-mer derivados de CD5 y de CD6 podría relacionarse con los resultados obtenidos para el estudio de la actividad antiparasitaria intrínseca, donde se observó que los péptidos derivados de CD5 (**p14**, **p15** y **p16**) se destacaron por inducir muerte parasitaria con incrementos superiores a 1,5 veces respecto del control basal en cultivos

axénicos metabólicamente estresantes (**Figura 4.3.**). Además, estos resultados se encuentran en línea con resultados reportados recientemente por nuestro grupo donde se observó que la muerte de parásitos provocada *in vitro* por rshCD5, a su máxima concentración ensayada, aumentaba casi al doble respecto de la condición basal en cultivos axénicos metabólicamente estresantes [García-Luna et al., 2024]. En consecuencia, se consideró acertado profundizar en el estudio del potencial profiláctico *in vivo* para los péptidos derivados de CD5 (**p14, p15 y p16**).

7.2. Experimento #2: Valor profiláctico de los péptidos 11-mer derivados de CD5.

En base a los resultados surgidos del **experimento #1**, se intentó profundizar en el potencial profiláctico de los péptidos sintéticos 11-mer derivados de CD5. Para ello, se realizó un nuevo ensayo (**experimento #2**) administrando la mezcla de péptidos sintéticos **p14, p15 y p16** en mayor dosis y modificando su esquema de administración. Así, se trabajó con dos grupos de ratones (n=10/grupo), los cuales se inocularon por vía i.p. con: (i) una solución de PBS estéril conteniendo una mezcla de los tres péptidos sintéticos 11-mer derivados de CD5 (**p14, p15 y p16**; 75 µg/péptido/ratón) o (ii) una solución de PBS estéril (grupo control). En todos los casos, se inocularon 200 µL/ratón de solución utilizando agujas estériles de calibre 27G. Luego de 30 min, todos los individuos de los dos grupos se inocularon por vía i.p. con 200 µL/ratón de una suspensión conteniendo 2.000 PSC viables de *E. granulosus* s.l.; utilizando agujas estériles de calibre 23G. Luego de 24h, se administró por vía i.p. una segunda dosis igual de los distintos tratamientos según correspondiese (mezcla de péptidos vs. PBS).

Al realizar la eutanasia y la necropsia de los ratones 7 meses p.i., no se observaron quistes hidáticos en ninguno de los ratones de los grupos ensayados. Por lo tanto, dicho experimento se consideró una infección fallida; un fenómeno, lamentablemente, no poco frecuente al trabajar con el modelo murino de EQ secundaria [González-Porcile et al., 2024]. Aunque las causas de una infección fallida pueden ser múltiples, en el presente trabajo se puede destacar: (i) desconocimiento del genotipo parasitario de los PSC utilizados, y (ii) falta de consistencia entre infectividad parasitaria y viabilidad de los PSC determinada mediante tinción con eosina.

7.3. Experimento #3: Valor profiláctico de los péptidos 11-mer derivados de MARCO, SR-AI, CD5L, SALSA, SCARA5 y SSc5D.

Por otra parte, se realizó un ensayo para evaluar el potencial valor profiláctico de otros péptidos sintéticos 11-mer sobre el modelo murino de EQ secundaria (**experimento #3**). En este sentido, de acuerdo a la disponibilidad de ratones y de material parasitario, se pudieron analizar los péptidos sintéticos 11-mer derivados de MARCO, SR-AI, CD5L, SALSA, SCARA5 y SSc5D; debiendo excluir los péptidos sintéticos 11-mer derivados de CD163. Así, se trabajó con cinco grupos de ratones (n=9/grupo), los cuales se inocularon por vía i.p. con una solución de PBS estéril conteniendo las siguientes mezclas de péptidos sintéticos 11-mer: (i) los péptidos sintéticos 11-mer derivados de MARCO, SR-AI y SCARA-5, (**p1**, **p2** y **p24**, respectivamente), (ii) los cuatro péptidos sintéticos 11-mer derivados de SALSA (**p20**, **p21**, **p22** y **p23**), (iii) los tres péptidos sintéticos 11-mer derivados de CD5L (**p11**, **p12** y **p13**), (iv) los tres péptidos sintéticos 11-mer derivados de SSc5D (**p25**, **p26** y **p27**), y (v) una solución de PBS estéril (grupo control). En todos los casos, las mezclas contenían 75 µg/péptido/ratón y se inocularon 200 µL de solución utilizando agujas estériles de calibre 27G. Luego de 30 min, todos los individuos se inocularon i.p. con 200 µL/ratón de una suspensión conteniendo 2.000 PSC viables de *E. granulosus* s.l., y 24 h después, se administró por vía i.p. una segunda dosis igual de los tratamientos correspondientes.

Inesperadamente, 24 h después de la segunda dosis de tratamiento los ratones de todos los grupos comenzaron a mostrar signos de afectación física tales como manifestaciones de tipo sudoración (muy probablemente debidas a fiebre) y gran letargia, para finalmente fallecer aproximadamente 24 h después. Aunque no se pudo determinar con certeza la causa de muerte de los animales, y luego de realizar un minucioso análisis del procedimiento realizado, se atribuyó la misma a una posible contaminación bacteriana en el lote de parásitos utilizado, lo cual podría explicar el cuadro compatible con muerte por *shock* séptico. Esta se consideró la causa más probable de muerte dado que incluso los animales del grupo control, los cuales no recibieron péptidos sintéticos, también mostraron el mismo cuadro clínico. En base a estos resultados, se revisaron extensivamente los pasos del protocolo para la obtención

de material parasitario, realizándole varias modificaciones tendientes a minimizar los riesgos de contaminación bacteriana.

7.4. Experimento #4: Valor profiláctico de los péptidos 35-mer derivados de CD5 y CD6.

En paralelo a los experimentos previamente descritos en el **experimento #3**, se procedió también a evaluar el potencial profiláctico de los péptidos sintéticos 35-mer diseñados. En este sentido, se evaluaron en primer lugar los tándems derivados de los receptores CD5 (**T7**) y CD6 (**T8**), siguiendo un esquema modificado de dosis y régimen de administración (**experimento #4**). Para ello, se trabajó con tres grupos de ratones (n=9-10/grupo), los cuales se inocularon por vía i.p. con una solución de PBS estéril conteniendo: (i) el tándem derivado de CD5 (**T7**), (ii) el tándem derivado de CD6 (**T8**), o (iii) solo PBS estéril (grupo control). En ese caso, 30 min antes de inocular los PSC se administró una primera dosis (75 µg/ratón), seguido de una segunda dosis igual a las 24 h post-desafío parasitario. Los volúmenes de las dosis y las agujas utilizadas fueron iguales a los experimentos anteriores, al igual que el procedimiento de desafío parasitario. Luego, 7 meses p.i. se realizó la eutanasia y necropsia de todos los animales y se determinaron los parámetros parasitológicos previamente descriptos (**Figura 7.2.**).

En cuanto al número de individuos infectados, se observó que en el grupo control, 9/10 ratones desarrollaron quistes hidáticos en su cavidad peritoneal, mientras que para el grupo tratado con **T7** el número disminuyó a 7/10. Por el contrario, para el grupo tratado con **T8**, la totalidad de los individuos (9/9) resultaron infectados (**Figura 7.2.A.**). Por otra parte, y evaluando solo a los individuos efectivamente infectados en cada grupo, los valores de mediana y rango para el análisis de masa total de quistes por ratón (en gramos) fueron de 1,70 (0,25-6,24) para el grupo control, 1,29 (0,19-3,74) para el grupo tratado con **T7** y 5,59 (0,89-8,95) para el grupo tratado con **T8**; nuevamente sin diferencias significativas entre tratamientos (**Figura 7.2.B.**). Sin embargo, y pese a la gran dispersión individual observada, el grupo de ratones tratados con **T7** (tándem derivado de CD5) mostró una tendencia numérica hacia la reducción en la masa total de quistes por ratón respecto del grupo control (medianas: 1,29 vs. 1,70, respectivamente). Por su parte, y evaluando solo a los individuos efectivamente infectados en cada grupo, los valores de mediana y rango para el análisis de carga

parasitaria total de quistes por ratón (en mL) fueron de 2,00 (1,00-6,00) para el grupo control, 1,50 (1,00-5,00) para el grupo tratado con **T7** y 6,50 (2,00-9,50) para el grupo tratado con **T8**; nuevamente sin diferencias significativas entre tratamientos (**Figura 7.2.C**). Sin embargo, se observó que el grupo de ratones tratados con **T7** (tándem derivado de CD5) mostró una tendencia numérica hacia la reducción en la carga parasitaria total por ratón respecto del grupo control (medianas: 1,50 vs. 2,00, respectivamente).

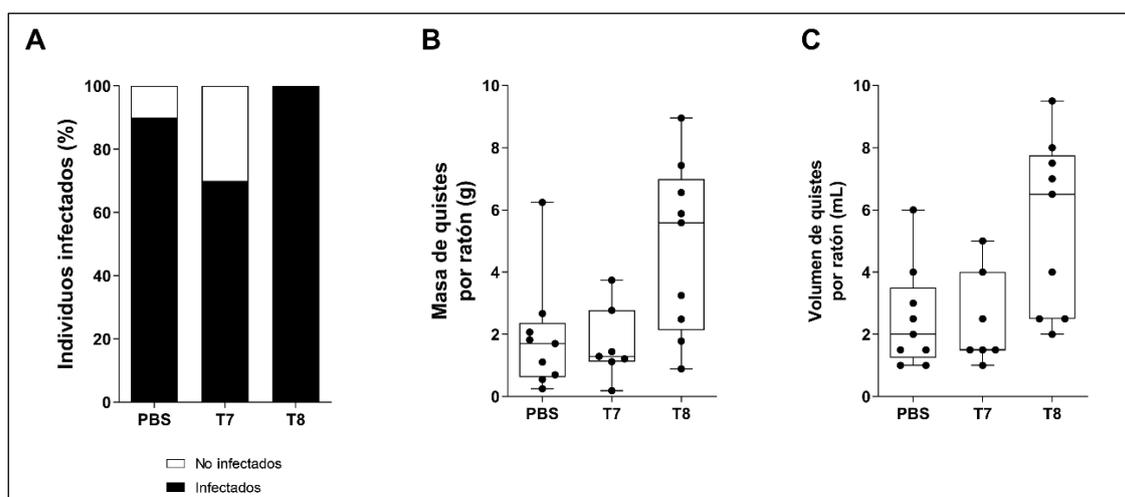


Figura 7.2. Evaluación del valor profiláctico de los péptidos sintéticos 35-mer derivados de CD5 y CD6. A tres grupos de ratones Balb/c ($n=9-10/\text{grupo}$) se les inoculó por vía i.p.: (i) el tándem 35-mer derivado de CD5 ($75 \mu\text{g}/\text{péptido}/\text{ratón}$; grupo **T7**), (ii) el tándem 35-mer derivado de CD6 ($75 \mu\text{g}/\text{péptido}/\text{ratón}$; grupo **T8**), o (iii) PBS estéril (grupo **PBS**). Luego de 30 min se les inoculó por vía i.p. una suspensión de 2.000 PSC viables/ratón, y 24 h p.i. se les administró una dosis igual de péptidos. El resultado del experimento se analizó 7 meses p.i., evaluando: (A) la proporción de ratones infectados, (B) la masa quística por ratón (g), y (C) el volumen de quistes por ratón (mL). En (B) y (C) se muestran los resultados en formato de cajas-y-bigotes. (*) $p < 0,05$ (test de Fisher para A, test de Mann-Whitney para B y C; siempre respecto del grupo PBS).

Si bien estos resultados no fueron significativos, se obtuvieron datos preliminares de acción profiláctica promisorios para **T7**, lo cual estaría en línea con los resultados obtenidos al trabajar con la mezcla de péptidos sintéticos 11-mer derivados de CD5 (**p14**, **p15** y **p16**), y con el reporte previo sobre la acción profiláctica de rshCD5 en el modelo murino de EQ secundaria [Mourglia-Ettlin et al., 2018]. Esto sugeriría que los ligandos parasitarios para el ectodominio de CD5, y para los péptidos sintéticos

derivados de su secuencia (ya sean 11-mer o 35-mer), jugarían un papel de gran relevancia para el establecimiento parasitario; y que, por lo tanto, su bloqueo sería beneficioso para el hospedero infectado.

7.5. Experimento #5: Valor profiláctico de los péptidos 35-mer derivados de MARCO, SR-AI y CD5L.

En paralelo al **experimento #4** descrito para los tándems derivados de CD5 (**T7**) y CD6 (**T8**), se realizó un estudio similar con los péptidos sintéticos 35-mer derivados de los receptores MARCO (**T1**), SR-AI (**T2**) y CD5L (**T6**) (**experimento #5**). Para ello, se trabajó con el mismo lote de parásitos que en el experimento anterior, pero utilizando cuatro grupos de ratones (n=10/grupo) pertenecientes a una camada más joven. Estos grupos se inocularon por vía i.p. con una solución de PBS estéril conteniendo: (i) el tándem derivado de MARCO (**T1**), (ii) el tándem derivado de SR-AI (**T2**), (iii) el tándem derivado de CD5L (**T6**) o (iv) solo PBS estéril (grupo control). En ese caso, 30 min antes de inocular los PSC se administró una primera dosis (75 µg/ratón), seguido de una segunda dosis igual a las 24 h post-desafío parasitario. Los volúmenes de las dosis y las agujas utilizadas fueron iguales a los experimentos anteriores, al igual que el procedimiento de desafío parasitario.

En este caso, 24 h después de la segunda dosis de tratamiento los ratones de todos los grupos comenzaron a mostrar, nuevamente, signos de afectación física y finalmente fallecieron aproximadamente 24 h después. En este experimento, y dado que tanto el lote de parásitos utilizados como los reactivos comunes fueron los mismos que en el **experimento #4** (tratamiento con **T7** y **T8**), no se pudo determinar con certeza la causa de muerte de los animales. Resulta relevante comentar que previo a la segunda dosis de tratamiento, los ratones de todos los grupos se encontraban en perfectas condiciones físicas y comportamentales, y que la única diferencia entre este experimento y el realizado en paralelo con el mismo lote de parásitos (**experimento #4**), fue la edad de los animales; ya que en este caso particular se utilizaron ratones jóvenes (7-8 semanas de edad) recientemente ingresados al bioterio de trabajo (15 días antes del experimento). Por ello, y suponiendo que la edad y el tiempo de aclimatación no hubiesen sido los correctos, se decidió a futuro aguardar al menos un mes entre el ingreso de los animales al bioterio y la ejecución del protocolo de trabajo; siempre y

cuando esto fuese compatible con la disponibilidad de parásitos. Además, se planificó disminuir la dosis de tratamiento administrada, ya que, si bien los péptidos sintéticos no mostraron toxicidad significativa *in vitro*, dichos valores no serían necesariamente extrapolables a la situación *in vivo*.

7.6. Experimento #6: Valor profiláctico de los péptidos 11-mer derivados de MARCO, SR-AI, CD163, CD5L, SALSA, SCARA5 y SSc5D.

Para sobrellevar la serie de eventos desafortunados experimentados, se procedió a realizar un nuevo estudio tendiente a evaluar el potencial valor profiláctico de los péptidos sintéticos 11-mer derivados de los receptores SR-AI, MARCO, SALSA, CD163, CD5L, SCARA5 y SSc5D (**experimento #6**). Para ello, en este caso se trabajó con dos grupos de ratones (n=10/grupo), a los cuales se les inoculó por vía i.p. una solución de PBS estéril conteniendo: (i) una mezcla de todos los péptidos sintéticos 11-mer diseñados a excepción de los derivados de CD5 y CD6 (10 µg/péptido/ratón) y (ii) solo PBS estéril (grupo control). De manera análoga a lo realizado anteriormente, 30 min antes de inocular los PSC se administró una primera dosis de péptidos (10 µg/péptido/ratón), seguida de una segunda dosis igual administrada 24 h post-desafío parasitario. Nuevamente, los volúmenes de las dosis y las agujas utilizadas fueron iguales a los experimentos anteriores, al igual que el procedimiento de desafío parasitario.

Desafortunadamente, 24 h después de la segunda dosis de tratamiento los ratones de todos los grupos comenzaron, nuevamente, a mostrar signos de afectación física, falleciendo aproximadamente 24 h después. En este caso, vale la pena comentar que el lote de parásitos utilizados se compartió con el experimento de otro grupo de trabajo de nuestro laboratorio, el cual los utilizó simplemente para desarrollar el modelo de EQ secundaria murina, no mostrando inconvenientes con sus ratones; descartando así la posibilidad de haber trabajado con un lote de parásitos contaminado. Además, en nuestro caso, nuevamente fallecieron todos los individuos desafiados, independiente de que recibiesen o no tratamiento con los péptidos sintéticos; sugiriendo que estos no serían tampoco la causa del problema. Así, y luego de confirmar que: (i) la manipulación se realizó siguiendo las condiciones de asepsia y esterilidad que nuestro grupo de trabajo ha aplicado a lo largo de muchos años de trabajo, (ii) los animales

utilizados tenían una edad más que adecuada para su uso en el modelo de EQ secundaria (4 meses), y (iii) los ratones estaban completamente adaptados a las condiciones del bioterio (transcurridos 2 meses desde el ingreso), se decidió que, a futuro, se administraría una única dosis de tratamiento, ya que los signos de afectación comenzaron luego de recibir la segunda dosis. Estos problemas igualmente serían relativos, ya que no siempre ocurrieron en todos los experimentos realizados.

7.7. Experimento #7: Valor profiláctico de los péptidos 11-mer y 35-mer derivados de SR-AI, MARCO, CD163, CD5L, SALSA, SCARA5 y SSc5D.

Por último, y en un nuevo intento de sobrellevar, al menos parcialmente, la serie de eventos desafortunados experimentados, se procedió a realizar un estudio adicional tendiente a evaluar el potencial valor profiláctico de los péptidos sintéticos 11-mer y 35-mer derivados de los receptores SR-AI, MARCO, SALSA, CD163, CD5L, SCARA5 y SSc5D (**experimento #7**). Para ello, en este caso se trabajó con tres grupos de ratones (n=8/grupo) a los cuales se les inoculó por vía i.p. una solución de PBS estéril conteniendo: (i) una mezcla de todos los péptidos sintéticos 11-mer diseñados a excepción de los derivados de CD5 y CD6 (20 µg/péptido/ratón), (ii) una mezcla de todos los péptidos sintéticos 35-mer diseñados a excepción de los derivados de CD5 y CD6 (20 µg/péptido/ratón) o (iii) solo PBS estéril (grupo control). De manera análoga a lo realizado anteriormente, 30 min antes de inocular los PSC se administró una única dosis de péptido; mientras que los volúmenes de dosis y las agujas utilizadas fueron iguales a los experimentos anteriores, al igual que el procedimiento de desafío parasitario. Luego de 7 meses p.i. se realizó la eutanasia y la necropsia de todos los ratones, no observándose el desarrollo de quistes hidáticos en ninguno de los grupos ensayados. Por lo tanto, este experimento debió considerarse como una infección fallida; muy probablemente debida a los mismos motivos discutidos previamente en el **experimento #2**: (i) desconocimiento del genotipo parasitario utilizado, y (ii) falta de consistencia entre infectividad parasitaria y viabilidad de los PSC determinada mediante tinción con eosina.

En suma, mediante la ejecución del Objetivo Específico #6 de la presente tesis, se llevaron a cabo varias estrategias experimentales tendientes a evaluar el potencial valor profiláctico de los 27 péptidos sintéticos 11-mer y de los 12 péptidos sintéticos 35-

mer diseñados en este trabajo. En este sentido, en la **Tabla 7.1.** se resumen los distintos experimentos *in vivo* realizados.

Como se comentó previamente, el trabajo realizado en este capítulo presentó diversas problemáticas inesperadas que interfirieron en las posibles conclusiones a extraer. Así, a modo de conclusión solo se pudo sugerir que la mezcla de péptidos sintéticos 11-mer derivados del receptor CD5 (**p14**, **p15** y **p16**), así como también el tándem derivado de dicho receptor (**T7**), serían candidatos de interés a reevaluar como agentes profilácticos frente a la EQ secundaria. De manera interesante, estos resultados estarían en consonancia con los resultados previamente reportados por nuestro grupo utilizando rshCD5 como agente profiláctico [Mourglia-Ettlin et al., 2018; García-Luna et al., 2024]. En este sentido, y para poder concluir correctamente sobre su potencial valor profiláctico en el modelo murino de EQ secundaria, se deberían optimizar sus dosis, el régimen de tratamiento y, quizás también, su vía de administración. Asimismo, sería de interés realizar estudios de biodistribución para los péptidos candidatos a fin de orientar el proceso de optimización del posible tratamiento profiláctico.

Por otro lado, y dadas las múltiples complicaciones ocurridas, no se pudieron extraer mayores conclusiones sobre los demás péptidos sintéticos diseñados; por lo que, a futuro, sería de interés volver a realizar su análisis partiendo de una preselección de aquellos péptidos con mejor actividad protoscolicida intrínseca y/o con propiedades inmunomoduladoras de interés; al menos *in vitro*. Finalmente, dado que no se obtuvieron resultados concluyentes sobre el valor profiláctico de los péptidos sintéticos ensayados, sumado a las limitaciones de tiempo y de disponibilidad de animales y de recursos materiales, no se pudieron realizar los estudios de inmunomodulación *in vivo* originalmente propuestos. Dichos estudios serán de relevancia para la evaluación mecanística de la actividad profiláctica de los péptidos sintéticos que efectivamente la demuestren.

Tabla 7.1. Resumen de los experimentos in vivo realizados. Para cada experimento se detalla edad de los animales, tiempo transcurrido entre ingreso de los animales al bioterio y el experimento, péptidos ensayados, esquema de administración y resultado final. Vale destacar que, a pesar de la diferencia en el resultado final, los PSC utilizados en #4 y #5 fueron los mismos.

Experimento	Edad (meses)	Acclimatación local	Péptidos ensayados	1° dosis (30 min pre-PSC)	2° dosis (24 h post-PSC)	Resultado final
#1	4	3 meses	p14, p15 y p16 (CD5), p17, p18 y p19 (CD6)	20 µg/péptido	-	Infección exitosa
#2	3	1 mes	p14, p15 y p16 (CD5)	75 µg/péptido	75 µg/péptido	Infección fallida
#3	6	4 meses	p1 (MARCO), p2 (SR-AI), p11, p12 y p13 (CD5L), p20, p21, p22 y p23 (SALSA), p24 (SCARA5), p25, p26 y p27 (SSc5D)	75 µg/péptido	75 µg/péptido	Ratones muertos 48 h post-PSC
#4	3	1 mes	T7 (CD5), T8 (CD6)	75 µg/péptido	75 µg/péptido	Infección exitosa
#5	2	15 días	T1 (MARCO), T2 (SR-AI), T6 (CD5L)	50 µg/péptido	50 µg/péptido	Ratones muertos 48 h post-PSC
#6	4	2 meses	p1 (MARCO), p2 (SR-AD), p3, p4, p5, p6, p7, p8, p9 y p10 (CD163), p11, p12 y p13 (CD5L), p20, p21, p22 y p23 (SALSA), p24 (SCARA5), p25, p26 y p27 (SSc5D)	10 µg/péptido	10 µg/péptido	Ratones muertos 48 h post-PSC
#7	5	3 meses	p1 (MARCO), p2 (SR-AD), p3, p4, p5, p6, p7, p8, p9 y p10 (CD163), p11, p12 y p13 (CD5L), p20, p21, p22 y p23 (SALSA), p24 (SCARA5), p25, p26 y p27 (SSc5D) T1 (MARCO), T2 (SR-AI), T3, T4 y T5 (CD163), T6 (CD5L), T9 y T12 (SALSA), T10 (SCARA5), T11 (SSc5D)	20 µg/péptido	-	Infección fallida

Capítulo 8.

DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS

El desarrollo de nuevos agentes terapéuticos basados en péptidos sintéticos presenta un gran número de ventajas respecto al uso de otros agentes biológicos como las proteínas recombinantes. La identificación de péptidos pequeños capaces de generar los mismos efectos biológicos que las formas recombinantes de proteínas completas, abriría una amplia variedad de potenciales intervenciones terapéuticas dadas las ventajas tecnológicas existentes en el campo de la síntesis automatizada no-biológica de péptidos a gran escala, con alta pureza y siguiendo normas GMP. Este abordaje de trabajo ha sido aplicado en forma exitosa para diversos tipos de proteínas con acciones biológicas variadas [da-Costa et al., 2015].

El principal desafío en el desarrollo de péptidos sintéticos con aplicaciones terapéuticas radica en la estrategia para seleccionar estructuras candidatas. En el caso de péptidos con acciones antimicrobianas (ya sean antibacterianos, antivirales, antifúngicos y/o antiparasitarios), una estrategia poco explorada hasta el momento consistiría en partir de la secuencia aminoacídica de receptores inmunes capaces de reconocer estructuras de patógenos, e identificar, dentro de las mismas, secuencias peptídicas que retengan la capacidad de reconocimiento, y, por lo tanto, puedan actuar como agentes potencialmente bloqueantes para dichos patógenos. En este sentido, la SF-SRCR presenta varios miembros capaces de reconocer ligandos microbianos [Martínez et al., 2011], y, por tal motivo, esta superfamilia amerita un estudio profundo y sistematizado al respecto. El caso prototípico de SF-SRCR es el receptor SALSA, cuyas propiedades de unión a componentes bacterianos han sido mapeadas dentro de sus dominios SRCR en una secuencia consenso de 11 aminoácidos denominada *pbsI* [Bikker et al., 2002]; compuesta por el motivo de 9 aminoácidos VEVLxxxxW [Bikker et al., 2004]. Estudios similares de mapeo se han realizado también para otros miembros de la SF-SRCR capaces de interactuar con patógenos, como, por ejemplo, MARCO [Elomaa et al., 1998; Brännström et al., 2002], CD163 [Fabriek et al., 2009] y CD5 y CD6 [Martínez-Florensa et al., 2018].

La capacidad de reconocimiento de patógenos parásitos mediante RS ha sido escasamente estudiada hasta el momento [Bachmann et al., 2022; Zhao et al. 2021; Hamid et al., 2015; Gomes et al., 2009; Rzepecka et al., 2009]. En este sentido, nuestro grupo de trabajo reportó que, al menos CD5 y CD6, son capaces de unir componentes tegumentarios de PSC de *E. granulosus* s.l., y que la administración exógena de las formas recombinantes solubles de ambos ectodominios (rshCD5 y rshCD6) induce profilaxis en el modelo murino de EQ secundaria [Mourglia-Ettlin et al., 2018]. Además, nuestro grupo también reportó que las secuencias homólogas a *pbs1* derivadas de los dominios SRCR tanto de CD5 como de CD6, son capaces de interactuar con un perfil de ligandos de *E. granulosus* s.l. muy similar al de los ectodominios completos de ambos receptores [Miles et al., 2020b]. Por todo ello, el objetivo general de la presente tesis consistió en evaluar el potencial antiparasitario e inmunomodulador de péptidos sintéticos derivados de la secuencia aminoacídica de miembros de la SF-SRCR capaces de reconocer diversas estructuras microbianas; utilizando a *E. granulosus* s.l. como parásito de estudio.

Para ello, en primer lugar, se obtuvieron las secuencias aminoacídicas de los nueve miembros de la SF-SRCR con capacidad reportada para interactuar con ligandos microbianos (MARCO, SR-AI, CD163, CD5L, CD5, CD6, SALSA, SCARA5 y SSc5D), y se identificaron dentro de sus respectivos dominios SRCR, 26 péptidos 11-mer con secuencias homólogas a *pbs1* (Tabla 3.2.). Dichos péptidos se caracterizaron luego en términos de homología respecto a *pbs1* (Tabla 3.2.), de análisis estructural mediante modelados 3D (Figura 3.4., Figura 3.5. y Figura 3.6.) y de diversas propiedades fisicoquímicas (Tabla 3.3.). Estos análisis permitieron concluir que, pese a su pequeño tamaño, los péptidos identificados mostraron una importante diversidad de secuencias y de posibles estructuras tridimensionales, así como diferencias en sus propiedades fisicoquímicas; aun cuando las secuencias presentaran únicamente un aminoácido de diferencia. Los 26 péptidos identificados, más la secuencia *pbs1*, se sintetizaron comercialmente y se solubilizaron exitosamente (Tabla 3.4.).

Adicionalmente, y por fuera de los objetivos inicialmente planteados, se diseñaron nuevas estructuras de tipo tándem lineal, generando así péptidos sintéticos 35-mer bajo la premisa de aumentar la avidéz de la posible interacción entre los péptidos 11-mer y los antígenos parasitarios en estudio. Para ello, y según el número de

secuencias 11-mer identificadas en cada receptor, los mismos se agruparon en tres categorías oportunamente detalladas, diseñándose un total 12 péptidos 35-mer (**Tabla 6.1.** y **Figura 6.1.**). Dichos tándems se caracterizaron de forma análoga a lo realizado con las secuencias peptídicas 11-mer: homología respecto a **T12** (tándem compuesto por tres secuencias alineadas de *pbs1*) (**Tabla 6.2.**), modelados 3D (**Figura 6.3.** y **Figura 6.4.**), y propiedades fisicoquímicas (**Tabla 6.3.**). Los resultados de estos análisis también mostraron una alta diversidad de secuencias y de potenciales estructuras tridimensionales, así como diferencias en sus propiedades fisicoquímicas. Los tándems diseñados también se sintetizaron comercialmente y se solubilizaron exitosamente (**Tabla 6.4.**). Así, la presente tesis partió de un total de 39 péptidos sintéticos a evaluar: 27 péptidos 11-mer y 12 péptidos 35-mer. Además, y dado que en última instancia los péptidos más prometedores serían evaluados en el modelo murino de EQ secundaria, se analizó su potencial toxicidad, mostrando todos ellos buenos perfiles de biocompatibilidad global (**Figura 3.7.**, **Figura 3.8.**, **Figura 6.5** y **Figura 6.6**); por lo que los 39 péptidos sintéticos diseñados continuaron con el flujo de trabajo propuesto.

Luego, se evaluó la posible actividad antiparasitaria intrínseca de los péptidos sintéticos en estudio, mediante el uso de diversos sistemas de cultivo de PSC de *E. granulosus* s.l. Los resultados obtenidos con el uso de cultivos parasitarios axénicos en condiciones metabólicamente estresantes (PBS, 48hs) mostraron que la mayoría de los péptidos sintéticos 11-mer con actividad protoscolicida intrínseca la trasladaron a los péptidos sintéticos 35-mer que los contuvieron (**Figura 4.1.** y **Figura 6.7.**). La única excepción observada correspondió a los péptidos derivados del receptor CD6, ya que si bien sus péptidos 11-mer (**p17**, **p18** y **p19**) presentaron actividad protoscolicida intrínseca en dichos cultivos (**Figura 4.1.**), el tándem conformado por dichas secuencias (**T8**) careció de dicha actividad (**Figura 6.8.**). Luego, y dadas las limitaciones del ensayo, particularmente relacionadas con la variabilidad entre lotes de parásitos, se comparó la actividad protoscolicida intrínseca de todos los péptidos sintéticos 11-mer a una única concentración (5 μ M) frente a un mismo lote de parásitos. Los resultados obtenidos fueron similares a los observados previamente en términos de péptidos con/sin actividad antiparasitaria (**Figura 4.1.** y **Figura 4.3.**), destacándose el péptido 11-mer derivado del receptor MARCO (**p1**) y los tres péptidos 11-mer derivados del receptor CD5 (**p14**, **p15** y **p16**) por inducir incrementos superiores a 1,5 veces respecto del control basal. Así, los cuatro péptidos destacados, ensayados a concentración 5 μ M

en cultivos metabólicamente estresantes para los parásitos, aumentaron la tasa de muerte parasitaria en un 50% aproximadamente. Por su parte, y de manera interesante, en el ensayo análogo realizado con los péptidos sintéticos 35-mer, se destacaron **T1** (tándem derivado del receptor MARCO) y **T7** (tándem derivado del receptor CD5) por lograr incrementos superiores al 50% (1,5 veces) en la tasa de muerte parasitaria respecto de la condición basal (**Figura 6.7.**). De esta forma, los resultados prometedores obtenidos con los tándems 35-mer (**T1** y **T7**) estarían en línea con los observados para sus péptidos constituyentes 11-mer (**p1** y **p14**, **p15** y **p16**, respectivamente). Sin embargo, para confirmar esta relación sería importante corroborar la actividad antiparasitaria de dichos péptidos, tanto 11-mer como 35-mer, utilizando un único lote de parásitos.

Por su parte, cabe destacar que solo 3 de los 12 péptidos 11-mer que mostraron actividad protoscolicida en cultivos parasitarios axénicos bajo condiciones metabólicamente estresantes, retuvieron dicha capacidad en condiciones metabólicamente óptimas (**Figura 4.6.**). Así, los péptidos **p2**, **p19** y **p20** se destacaron por ser los únicos péptidos sintéticos 11-mer capaces de inducir la muerte parasitaria en ambas condiciones; sugiriendo, por lo tanto, que lo harían a través de mecanismos particulares propios. A su vez, la magnitud de dicha actividad disminuyó en estas condiciones de cultivo respecto de los cultivos bajo condiciones metabólicamente estresantes, un hecho esperable *a priori*, observándose un valor de incremento máximo, aproximadamente del doble, en la tasa de muerte parasitaria inducida por **p20**. De manera interesante, en el caso de los tándems, 4 de los 5 que exhibieron actividad antiparasitaria intrínseca en cultivos metabólicamente estresantes, la retuvieron bajo condiciones metabólicamente óptimas (**T1**, **T2**, **T7** y **T12**) (**Figura 6.9.** y **Figura 6.10.**). Asimismo, dicha actividad se observó únicamente a la máxima concentración ensayada (5 μ M), destacándose **T1** (derivado del receptor MARCO), **T7** (derivado del receptor CD5) y **T12** (derivado del receptor SALSA) por inducir los mayores incrementos en la tasa de muerte parasitaria, aproximadamente en un 70-80%, respecto del control basal (**Figura 6.10.**).

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en relación con la actividad protoscolicida intrínseca de los 39 péptidos sintéticos ensayados, se destaca el desempeño de los péptidos derivados de los receptores MARCO, SR-AI, CD5 y SALSA. Mientras que los péptidos derivados de MARCO (**p1** y **T1**) y de CD5 (**p14**,

p15, **p16** y **T7**) mostraron los mayores incrementos en la tasa de muerte parasitaria respecto de la condición basal, los péptidos derivados de MARCO (**T1**), de SR-AI (**p2** y **T2**), de CD5 (**T7**) y de SALSA (**p20** y **T12**) presentaron actividad protoscolicida tanto en condiciones metabólicamente estresantes como óptimas. Cabe mencionar que, tras el análisis detallado de los péptidos sintéticos destacados, no se encontraron patrones comunes relacionados con sus propiedades fisicoquímicas (**Tabla 3.3.** y **Tabla 6.3.**). De hecho, por ejemplo, dichos péptidos presentaron valores de pI muy heterogéneos (desde 3,8 para **p15** hasta 10,4 para **T12**), y, además, los péptidos sintéticos 11-mer **p14**, **p15** y **p16** exhibieron los niveles de homología más bajos respecto a *pbs1* (**p20**) (**Tabla 3.2.**). Por su parte, aunque estructuralmente los tándems mencionados presentaron hojas β en diversas localizaciones (**Figura 6.3.**), dicha característica no se observó en sus péptidos constituyentes 11-mer. Finalmente, el único patrón hallado entre los péptidos sintéticos 11-mer con altos niveles de actividad protoscolicida en cultivos axénicos metabólicamente estresantes (**p1**, **p2**, **p14**, **p15**, **p16** y **p20**), fue la ausencia de residuos aminoacídicos R (Arginina) y G (Glicina) en las posiciones 2 y 9, respectivamente (**Figura 4.5.**).

Los mecanismos involucrados en la actividad antiparasitaria intrínseca exhibida por los péptidos sintéticos destacados, se desconocen. Sin embargo, resultados previos reportados por nuestro grupo de trabajo sobre la actividad protoscolicida de rshCD5 y rshCD6, sugirieron que la misma podría deberse a modulación de la actividad metabólica del parásito y/o a efectos tóxicos directos sobre los PSC [García-Luna et al., 2024]. La interacción directa de rshCD5 y/o rshCD6 con PSC de *E. granulosus* s.l. podría alterar la motilidad de los parásitos, así como su normal asimilación de nutrientes y/o sus mecanismos de detoxificación; de manera que la alteración de dichas funciones podría reducir la viabilidad parasitaria. Esta sugerencia se apoyaría en resultados reportados por nuestro grupo, tras el análisis de los interactomas para rshCD5 y/o rshCD6 con componentes presentes en PSEx [Miles et al., 2020b]. En dicho trabajo, y mediante estrategias de *pull-down* seguidas de análisis proteómicos, se identificaron 20 ligandos parasitarios distintos para rshCD5 y/o rshCD6: 8 compartidos por ambos receptores, 9 sólo para rshCD5 y 3 sólo para rshCD6. Entre los ligandos identificados se incluyeron varias proteínas que cumplen funciones relevantes para el correcto desarrollo del parásito, algunas de las cuales fueron previamente reportadas como potenciales

candidatos vacunales y/o como dianas farmacológicas contra *E. granulosus* s.l. [Miles et al., 2020b].

En el mismo trabajo, también se analizaron los posibles interactores parasitarios para los péptidos sintéticos 11-mer homólogos a *pbs1* derivados de CD5 y de CD6, reportando que muchos de los mismos son compartidos entre los ectodominios completos y los péptidos. Nuevamente, se destacó que la mayoría de dichos interactores corresponderían a proteínas clave del metabolismo y/o la motilidad parasitaria, así como también estarían asociados con posibles mecanismos de defensa y/o vías de detoxificación del parásito [Miles et al., 2020b]. En particular para los péptidos sintéticos 11-mer derivados del receptor CD5, se reportaron 10 ligandos parasitarios para **p14**, 1 para **p15** y 11 para **p16**; mientras que, para los péptidos derivados del receptor CD6, el número de interactores parasitarios fue superior: 29 para **p17**, 11 para **p18** y 18 para **p19** [Miles et al., 2020b].

Entre los interactores compartidos por rshCD5 y rshCD6 y algunos de los péptidos sintéticos 11-mer derivados de sus secuencias, se encuentran las proteínas 14-3-3 (para los péptidos **p14**, **p16**, **p17** y **p19**); una familia de proteínas altamente conservada en eucariotas que participan en distintos eventos celulares básicos, como, por ejemplo, proliferación celular, diferenciación y supervivencia [Cau et al., 2018]. Estas han sido probadas con éxito como candidatos vacunales en diferentes ensayos preclínicos, tanto contra *E. granulosus* s.l. como contra *E. multilocularis* [Siles-Lucas et al., 2008]. También se identificaron las proteínas tegumentarias TegPs (para los péptidos **p17** y **p19**), las cuales suelen recubrir la superficie de muchos helmintos parásitos, y están generalmente involucradas en procesos de absorción de iones, así como en mecanismos de evasión del sistema inmune del hospedero. En particular, se ha sugerido que las TegPs poseen funciones inmunomoduladoras y/o inmunosupresoras tanto en infecciones por *E. granulosus* s.l. [Ortona et al., 2005] como por *E. multilocularis* [Zheng et al., 2018]. Otros ligandos relevantes identificados fueron las enzimas glucolíticas fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa (para el péptido **p16**), previamente reportada como posible diana quimioterapéutica contra *E. granulosus* s.l. [Xiao et al., 1994], y la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (para el péptido **p19**), la cual ha mostrado ser capaz de inducir protección contra *E. multilocularis* en ratones inmunizados [Müller-Schollenberger et al., 2001]. Por último, también se identificó la

enzima glutatión-S-transferasa parasitaria como ligando para los péptidos **p17** y **p19**, un hallazgo probablemente de relevancia dado que la inmunización activa de ratones con la misma induce excelentes niveles de protección contra *E. granulosus* s.l. [Zhu et al. 2015; Arbildi et al., 2024].

En base a los posibles interactores identificados para los péptidos sintéticos 11-mer derivados de los receptores CD5 y CD6, la acción protoscolicida de dichos péptidos podría interpretarse como una consecuencia derivada del bloqueo de la funcionalidad de dichos ligandos por parte de los péptidos. Por ello, resultaría de interés identificar, a futuro, posibles interactores parasitarios para los péptidos derivados de los receptores MARCO (**p1** y **T1**) y SR-AI (**p2** y **T2**), así como para el tándem derivado de CD5 (**T7**) y para los péptidos derivados del receptor SALSA (**p20** y **T12**), de manera que pudiera lograrse una aproximación mecánica relacionada con su capacidad antiparasitaria intrínseca. Adicionalmente, y como otra aproximación que permitiera profundizar en los mecanismos antiparasitarios inducidos por los péptidos sintéticos seleccionados, también sería de interés evaluar la interacción de los mismos con el tegumento de los PSC de *E. granulosus* s.l., siguiendo estrategias previamente reportadas para péptidos antiparasitarios contra otros helmintos parásitos [Landa et al., 2009]. Finalmente, también sería de gran valor evaluar posibles efectos antiparasitarios sinérgicos entre los péptidos sintéticos seleccionados, de manera que pudiera explorarse, al menos indirectamente, el solapamiento de sus posibles acciones protoscolicidas.

En paralelo a la evaluación de la actividad protoscolicida en los 39 péptidos sintéticos diseñados, se exploraron *in vitro* posibles efectos inmunomoduladores ejercidos por los mismos. Para ello, se utilizaron dos sistemas de trabajo en los que se analizaron distintos parámetros. Por un lado, sobre cultivos de PEC murinas se evaluó el efecto de los péptidos sobre la producción de citoquinas y de anticuerpos (específicos y polireactivos) inducida por antígenos tegumentarios de PSC contenidos en la fracción antigénica denominada PSEx [Miles et al., 2019]. Por otro lado, sobre cultivos de células RAW264.7. se evaluó el efecto de los péptidos sintéticos sobre la interacción física de las mismas con antígenos presentes en PSEx, así como el efecto sobre la producción de citoquinas y de NO inducida por PSEx.

En relación con la inmunomodulación ejercida por los péptidos sintéticos, tanto 11-mer como 35-mer, sobre cultivos de PEC estimulados con PSEx, se observó que la

producción de citoquinas (IL-6, IL-10 y TNF- α), en caso de ser modulada, generalmente lo fue de manera positiva; es decir, potenciando su producción (**Figura 5.1.** y **Figura 6.13.**). La única excepción a dicho comportamiento correspondió al péptido 11-mer **p4**, el cual redujo significativamente la producción de IL-6 inducida por PSEx (**Figura 5.1.**). Además, se observó que, para las tres citoquinas analizadas, la conformación de estructuras peptídicas de tipo tándem no necesariamente potenció la respuesta modulada por los péptidos constituyentes 11-mer. De hecho, en varios casos, el efecto observado para los péptidos 11-mer se perdió una vez incluidos dentro de péptidos en tándem. Por ejemplo, mientras que **p25** potenció la producción de TNF- α , **p26** la de IL-10 y **p27** la de IL-6 e IL-10 (**Figura 5.1.**), **T11** (tándem conformado por **p25**, **p26** y **p27**), no moduló en ningún sentido la producción de citoquinas en cultivos de PEC estimulados con PSEx (**Figura 6.13.**). Por otra parte, los estudios de inmunomodulación ejercida por los péptidos sintéticos sobre la producción de anticuerpos, permitieron concluir que, generalmente, los péptidos sintéticos 11-mer serían mejores moduladores de las respuestas de anticuerpos específicos (sAc) respecto de las respuestas de anticuerpos polireactivos (pAc) (**Figura 5.3.** y **Figura 5.6.**). En este punto, se destacó **p25** (péptido 11-mer derivado del receptor SSc5D) por ser el único que potenció las respuestas sAc para los tres isotipos analizados (**Figura 5.3.**) y, a su vez, también moduló positivamente la producción de pIgA (**Figura 5.6.**). Sin embargo, y de manera análoga a lo observado para la producción de citoquinas, **p25** perdió dicha actividad al incorporarse a una estructura de tipo tándem (**T11**) (**Figura 6.14.** y **Figura 6.15.**). Por otro lado, si bien los péptidos sintéticos 11-mer exhibieron mejores acciones inmunomoduladoras sobre las respuestas sIgG que los péptidos 35-mer (**Figura 5.3.** y **Figura 6.14.**), dicha actividad no se observó sobre la producción de pIgG (**Figura 5.6.** y **Figura 6.15.**). Por último, **T8** (tándem 35-mer derivado del receptor CD6) se destacó por potenciar la producción de sIgM (**Figura 6.14.**) y, simultáneamente, reprimir las respuestas pAc para los tres isotipos analizados (**Figura 6.15.**). En esta situación resulta interesante destacar que, entre los péptidos 11-mer constituyentes de **T8** (**p17**, **p18** y **p19**), solo **p17** potenció la producción de sIgM; sugiriéndose así que la conformación de **T8** favorecería la modulación de la respuesta de anticuerpos respecto de sus péptidos constituyentes 11-mer. En suma, los ensayos funcionales realizados sobre cultivos de PEC estimulados con PSEx mostraron que, entre los 39 péptidos sintéticos en estudio, algunos de ellos son capaces de modificar la respuesta inmune contra antígenos

parasitarios. Entre estos, los péptidos sintéticos capaces de modular las respuestas de pAc serían de gran interés en el contexto de la infección por *E. granulosus* s.l., ya que los mismos han sido asociados con respuestas inmunes eficientes en el contexto de la EQ [García-Luna et al., 2021], y, al menos para rshCD5 y rshCD6, se reportó que parte de su actividad (inmuno)profiláctica se debería a la potenciación temprana de las respuestas pAc a nivel peritoneal [García-Luna et al., 2024].

Por otro lado, nuestro grupo de trabajo demostró recientemente que los antígenos contenidos en PSEx interactúan físicamente, de forma específica y dosis-dependiente, con PEC murinas; destacándose los macrófagos por su gran capacidad de unión [García-Luna, 2022]. Además, se demostró que rshCD6 inhibe, parcialmente, la interacción física entre componentes de PSEx y macrófagos peritoneales; sugiriéndose que ciertos ligandos parasitarios para rshCD6 estarían involucrados en dicha interacción. Por ello, y considerando que gran parte de los interactores parasitarios de rshCD6 son compartidos con aquellos identificados para los péptidos homólogos a *pbs1* derivados de su secuencia [Miles et al., 2020b], se evaluó el efecto de los péptidos sintéticos sobre la interacción física entre ligandos parasitarios presentes en PSEx (sonda PSEx-FITC) y macrófagos (células RAW264.7.).

Entre los resultados obtenidos en dicho estudio, se destacaron los péptidos sintéticos 11-mer **p20** y **p21** (ambos derivados del receptor SALSA) por inducir los mayores incrementos observados en dicha interacción; en línea con lo observado para el tándem 35-mer que contiene a **p20** (**T12**) (**Figura 5.8.** y **Figura 6.16.**). Por el contrario, únicamente **p24** (péptido 11-mer derivado del receptor SCARA5) y **T8** (péptido 35-mer derivado del receptor CD6), redujeron significativamente la interacción física analizada (**Figura 5.9.** y **Figura 6.17.**). Estos hallazgos resultaron interesantes, ya que, en base a los resultados previamente obtenidos con rshCD6 [García-Luna, 2022], se esperaba *a priori* que, al menos los péptidos derivados de CD6, ejercieran un efecto de bloqueo sobre la interacción entre células RAW264.7. y la sonda PSEx-FITC. Sin embargo, la mayoría de los péptidos o bien no afectaron dicha interacción, o bien la potenciaron (incluidos los péptidos 11-mer **p18** y **p19** derivados de CD6). Sin embargo, **T8** (tándem conformado por los péptidos 11-mer derivados de CD6) fue el único péptido 35-mer que redujo significativamente dicha interacción (**Figura 6.17.**). Esto sugeriría entonces que, si bien los péptidos sintéticos 11-mer derivados de CD6 no retienen la capacidad de

bloqueo observada para rshCD6, esta se recupera cuando los mismos se combinan linealmente para conformar **T8**; actuando este último como un posible peptidomimético de rshCD6, al menos para esta función.

Luego, y dado que varios péptidos sintéticos potenciaron la interacción física entre células RAW264.7. y la sonda PSEx-FITC, se evaluaron posibles efectos funcionales ejercidos por los mismos sobre cultivos de células RAW264.7. estimulados con PSEx. Por un lado, se estudió el efecto de los péptidos sintéticos sobre la producción de citoquinas (IL-6, IL-10 y TNF- α); destacándose que, en los controles de referencia (células estimuladas únicamente con PSEx), no se detectó ninguna de las tres citoquinas analizadas (**Figura 5.12.** y **Figura 6.19.**). En este caso, y al no contar con datos previos sobre el efecto de PSEx en cultivos de células RAW264.7., la detección de las citoquinas en estudio, en presencia de péptidos sintéticos, se consideró modulada positivamente por los mismos como consecuencia de posibles fenómenos de potenciación de la interacción y/o inhibición de efectos represores que pudieran existir. Así, aquellos péptidos, tanto 11-mer como 35-mer, capaces de modular la producción de citoquinas, lo hicieron positivamente; es decir, potenciando su producción (**Figura 5.12.** y **Figura 6.19.**). En este sentido, dentro de los péptidos sintéticos 11-mer, se destacó **p4** por ser el mejor potenciador de la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-6 y TNF- α), y **p6** y **p13** por ser los mejores inductores de IL-10 (citoquina antiinflamatoria) (**Figura 5.12.**); mientras que, de los péptidos 35-mer, se destacaron **T5**, **T6** y **T7** por ser los únicos capaces de potenciar la producción de las tres citoquinas en estudio (**Figura 6.19.**). En este punto resulta importante recordar que, si bien los péptidos **p20**, **p21** y **T12** indujeron los mayores incrementos en la interacción física entre células RAW264.7. y la sonda PSEx-FITC (**Figura 5.8.** y **Figura 6.16.**), ninguno de ellos potenció la producción de IL-6, a la vez que indujeron niveles medios de IL-10 y TNF- α (**Figura 5.12.** y **Figura 6.19.**). Por otra parte, de los mejores potenciadores de la producción de citoquinas (**p4**, **p6**, **p13**, **T5**, **T6** y **T7**) (**Figura 5.12.** y **Figura 6.19.**), la mayoría, con la excepción de **p4**, no modificaron la interacción física entre células RAW264.7. y la sonda PSEx-FITC (**Figura 5.8.**, **Figura 5.9.**, **Figura 6.16.** y **Figura 6.17.**). Así, estos resultados sugerirían la ausencia de un nexo inequívoco entre modulación de la interacción física entre células RAW264.7. y la sonda PSEx-FITC, y modulación de la producción de citoquinas por parte de dichas células estimuladas con PSEx.

Otro posible efecto funcional estudiado en relación a la acción de los péptidos sintéticos sobre cultivos de células RAW264.7. estimulados con PSEx, fue la producción de NO, un mediador inmune con acción protoscolicida demostrada [Zeghir-Bouteldja et al., 2009; Amri et al., 2007; Dematteis et al., 2003]. Los resultados obtenidos mostraron que ninguno de los 27 péptidos sintéticos 11-mer ensayados potenció su producción, mientras que solo 2 de ellos (**p9** y **p11**) la redujeron significativamente (**Figura 5.17.**). Por su parte, entre los péptidos sintéticos 35-mer, se observó que, mientras **T7** (derivado del receptor CD5) potenció la producción de NO, **T1** (derivado del receptor MARCO) redujo dicha producción respecto del control de referencia (**Figura 6.20.**). Así, y considerando que la producción temprana de NO se correlacionaría con mecanismos efectores inductores de muerte sobre PSC de *E. granulosus* s.l., al menos *in vitro* [Mourglia-Ettlin et al., 2016b; Zeghir-Bouteldja et al., 2009; Zeghir-Bouteldja et al., 2013; Amri et al., 2007, Ait-Aissa et al., 2006, Dematteis et al., 2003], se destacó el comportamiento de **T7** por ser el único péptido capaz de potenciar su producción. Esta acción inmunomoduladora sería de relevancia a la hora de sugerir la utilidad de **T7** para el diseño de nuevas intervenciones protoscolicidas que contribuyan a reducir la tasa de posibles EQ secundarias. Sin embargo, no se puede descartar que la reducción en la producción de NO inducida por **T1** pueda, también, tener consecuencias negativas para el parásito durante las etapas tempranas de la infección. En este sentido, se ha reportado recientemente que, al menos para el caso de las especies reactivas del oxígeno (ROS), existe un efecto bidireccional en el contexto de la infección por *E. multilocularis*: mientras las ROS son capaces de dañar al parásito, también actuarían como señales “ambientales” que inducirían el desarrollo parasitario hacia el estadio de metacestodo, favoreciendo, además, el crecimiento de sus células germinativas, al menos *in vitro* [Tian et al., 2024]. Así, la ausencia de estas señales volvería al parásito más susceptible al ataque por parte del sistema inmune del hospedero durante las etapas temprana de la infección. Si bien estos efectos no han sido reportados aún para *E. granulosus* s.l., ni para especies reactivas del nitrógeno como el NO, *a priori* podrían tener cierta relevancia dadas las similitudes existentes entre ambos sistemas. Por lo tanto, de los diversos ensayos funcionales realizados sobre cultivos de PEC y de células RAW264.7. estimulados con PSEx, se concluyó que, en términos generales, los péptidos sintéticos 35-mer modularían un mayor número de parámetros

inmunes que los péptidos 11-mer, destacándose **T1**, **T2** y **T7** por modular la mayoría de los parámetros inmunes evaluados.

El flujo de trabajo de la presente tesis se diseñó, originalmente, de forma tal que, luego de analizar el perfil de biocompatibilidad de los péptidos y de evaluar *in vitro* sus posibles efectos antiparasitarios e inmunomoduladores, fuese posible descartar a aquellos potencialmente tóxicos y/o escasamente prometedores en sus acciones protoscolicidas e inmunomoduladoras. De esta forma, se esperaba, originalmente, acotar el número de péptidos a ensayar en términos profilácticos mediante el uso del modelo murino de EQ secundaria. Sin embargo, y dado que dicho modelo animal requiere de al menos 7 meses para poder evidenciar las acciones buscadas, no fue posible ejecutar la estrategia de investigación inicialmente propuesta, debiendo realizar los estudios *in vivo* prácticamente en paralelo con los ensayos *in vitro*. Así, se llevaron a cabo varios ensayos *in vivo* tendientes a evaluar el potencial valor (inmuno)profiláctico de los 27 péptidos sintéticos 11-mer y de los 12 péptidos sintéticos 35-mer en estudio, los cuales, desafortunadamente, mostraron dificultades que imposibilitaron la extracción de conclusiones (**Tabla 7.1**). En ese sentido, y en base a los ensayos que lograron infecciones exitosas (**Experimento #1** y **Experimento #7**), los resultados obtenidos sugirieron que la mezcla de péptidos sintéticos 11-mer derivados del receptor CD5 (**p14**, **p15** y **p16**), así como también el tándem derivado de dicho receptor (**T7**), serían posibles candidatos de interés a reevaluar como agentes profilácticos frente a la EQ secundaria. Estos hallazgos estarían en línea con los resultados previamente reportados por nuestro grupo en relación al uso de rshCD5 como posible agente (inmuno)profiláctico en el modelo murino de EQ secundaria [Mourglia-Ettlin et al., 2018; García-Luna et al., 2024]. Así, los escasos resultados obtenidos *in vivo* nos sugieren hacer foco, a futuro, en los péptidos sintéticos derivados del receptor CD5; para lo cual, deberían realizarse nuevos ensayos de (inmuno)profilaxis, optimizando el esquema y la vía de administración, así como aplicando diversas combinaciones y/o dosis de péptidos.

Por último, y en base a toda la información recopilada durante la presente tesis, se diseñó una nueva secuencia aminoacídica 11-mer, a ensayar en el futuro, que permitiría optimizar el desempeño de los péptidos estudiados en relación con los resultados obtenidos *in vitro*. Para ello, se seleccionaron, por un lado, las secuencias de

los péptidos sintéticos 11-mer que exhibieron mayor actividad antiparasitaria intrínseca (**p1**, **p2**, **p14**, **p15**, **p16** y **p20**), y, por otro lado, las secuencias de los péptidos 11-mer capaces de inmunomodular el mayor número de parámetros analizados (**p21**, **p23**, **p25** y **p27**). Dichas secuencias se analizaron en su conjunto, manualmente, en búsqueda de un posible patrón compartido (**Figura 8.1**). De esta forma, se observó que ciertas posiciones en las secuencias 11-mer están altamente conservadas respecto a *pbs1* (por ejemplo, las posiciones 1, 4 y 11), mientras que otras posiciones muestran un importante grado de variabilidad (por ejemplo, las posiciones 7, 8, y 10), sugiriendo que no estarían directamente involucradas en la modulación de los parámetros analizados.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
p1	G	R	A	E	V	Y	Y	S	G	T	W
p2	G	R	V	E	I	L	H	S	G	Q	W
p14	G	Q	L	E	V	Y	L	K	D	G	W
p15	G	V	V	E	F	Y	S	G	S	L	G
p16	G	T	V	E	V	R	Q	G	A	Q	W
p20	G	R	V	E	V	L	Y	R	G	S	W
p21	G	R	V	E	I	L	Y	R	G	S	W
p23	G	R	V	E	I	H	Y	G	G	T	W
p25	G	R	L	E	V	W	H	G	G	R	W
p27	G	R	L	E	V	W	H	A	G	R	W

Figura 8.1. Secuencias 11-mer seleccionadas. Se representan las secuencias de los péptidos seleccionados alineadas, ordenadas N→C. Las posiciones 1 y 4 (flechas naranjas), se destacan por ser 100% conservadas, mientras que las posiciones 6, 7, 8 y 10 (flechas verdes) son altamente variables.

En la **Tabla 8.1**, se resume el patrón de posibles combinaciones, racionalmente identificadas, para dar lugar a nuevas secuencias de 11 aminoácidos potencialmente de interés; diferentes a todas las evaluadas en la presente tesis (tanto en formato 11-mer como 35-mer). Cabe mencionar que, respecto a las posiciones conservadas, si bien las mismas muy probablemente ocupen un papel importante dada su conservación evolutiva dentro de los RS seleccionados, desde un punto de vista de la diversidad de combinaciones a evaluar, sería interesante explorar el efecto de su modificación en el

diseño de nuevos péptidos potencialmente antiparasitarios y/o inmunomoduladores. Asimismo, aunque las posiciones 7 y 10 no parecerían ser relevantes dada su alta variabilidad entre los péptidos seleccionados, la presencia de H (Histidina) en posición 7 y de R (Arginina) en posición 10, favorecería *a priori* las funciones inmunomoduladoras del péptido (**Figura 8.1.**).

Tabla 8.1. Patrón de secuencias aminoacídicas propuesto en base a la selección de péptidos 11-mer con efectos *in vitro* destacables. (x = cualquier aminoácido)

Posición (N→C)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Aminoácido	G	R	V	E	V	x	x	x	G	x	W

Finalmente, y dado que, como se comentó previamente, el flujo de trabajo experimental aplicado en la presente tesis fue distinto al originalmente propuesto, se procedió a evaluar, de manera retrospectiva, toda la información generada para así poder sugerir una versión optimizada del flujo de trabajo desarrollado. De esta forma, y en base a los resultados obtenidos *in vitro* con los 39 péptidos sintéticos estudiados, referidos a su biocompatibilidad, actividad protoscolicida intrínseca y acciones inmunomoduladoras *in vitro*, se seleccionarían los péptidos 35-mer **T1**, **T2**, **T7** y **T12** para evaluar en nuevos ensayos *in vivo* de (inmuno)profilaxis en el modelo murino de EQ secundaria. Se prestaría especial atención a dichos péptidos, y no a sus secuencias 11-mer constituyentes, ya que, aunque estas últimas también se destacaron por su actividad antiparasitaria intrínseca, no mostraron un marcado perfil inmunomodulador. Asimismo, sería de interés realizar ensayos de toxicidad aguda en ratones con los péptidos seleccionados (**T1**, **T2**, **T7** y **T12**) para minimizar posibles efectos secundarios derivados de su aplicación *in vivo*. Con los péptidos seleccionados que efectivamente muestren acciones (inmuno)profilácticas en el modelo murino, se realizarían optimizaciones de su uso (régimen y vía de administración, dosis, combinación farmacológica, etc.), y se evaluaría la posible inmunomodulación inducida *in vivo* para generar una aproximación mecanística que justifique su acción (inmuno)profiláctica.

Por otro lado, sería de gran valor adicional evaluar la biodistribución de los péptidos que resulten más promisorios para poder explorar luego, estrategias que permitan aumentar la misma. En ese sentido, estudios realizados en otros modelos

animales para aplicación de péptidos sintéticos antimicrobianos, con longitudes similares a los ensayados en la presente tesis, mostraron que el *clearance* plasmático mejora significativamente cuando los péptidos se combinan, por ejemplo, con polietilenglicol o con polímeros de poliglicerol hiperramificado de alto peso molecular [Brunetti J. et al. 2016, Esposito T. et al. 2024]. Asimismo, también se han reportado resultados prometedores al combinar péptidos sintéticos antimicrobianos con distintos sistemas nanoparticulados, tanto para potenciar su acción como para disminuir su toxicidad, a la vez que actuando como vehículos que aumentan la vida media de los péptidos [Imperlini et al., 2023; Groo et al., 2018; Almaaytah et al., 2017].

En otra línea de trabajo, aquellos péptidos que resulten más promisorios en términos de acción (inmuno)profiláctica en el modelo murino de EQ secundaria, también podrían ensayarse como agentes coadyuvantes de apoyo para los tratamientos actualmente tendientes a disminuir la tasa de posibles recidivas. En este sentido, se proponen dos usos potenciales para los péptidos más prometedores, en base a la actividad protoscolicida de los mismos. En primer lugar, los péptidos podrían inyectarse dentro del quiste hidático previo a su remoción quirúrgica siguiendo la estrategia PAIR (del inglés, *Puncture, Aspiration, Injection, and Reaspiration*), la cual corresponde a un procedimiento de drenaje percutáneo de quistes hidáticos que implica cuatro pasos secuenciales: (i) punción del quiste con aguja fina (P), (ii) aspiración de parte del contenido quístico (A), (iii) instilación de una sustancia protoscolicida dentro del quiste (I), y (iv) reaspiración del contenido quístico con aguja fina (R) [Nunnari et al., 2012]. De esta forma, se minimiza la potencial diseminación local, peritoneal y/o sistémica de PSC viables contenidos en el quiste, en caso que el mismo sea fértil, derivada de posibles roturas ocasionadas al mismo durante la intervención quirúrgica de remoción [Khuroo, 2021]. En este contexto, los péptidos más prometedores con buenos perfiles de actividad protoscolicida podrían ser de utilidad para ampliar el listado de posibles sustancias a utilizar en el paso de instilación (I) del procedimiento PAIR. Por ello, sería de interés realizar ensayos de actividad antiparasitaria similares a los desarrollados en la presente tesis, pero incubando los PSC con los péptidos sintéticos en presencia de líquido hidático fértil, de forma tal que se pudiese determinar si los mismos retienen su actividad protoscolicida en un ambiente similar al cual encontrarían durante el procedimiento PAIR. Asimismo, y de manera complementaria, se podrían realizar ensayos *ex vivo* sobre quistes fértiles obtenidos tras decomiso sanitario durante la faena

de ganado, aplicándoles a los mismos un procedimiento de tipo PAIR y evaluando *a posteriori* la viabilidad de los PSC. Este tipo de ensayo ha sido recientemente validado, utilizando quistes fértiles de origen ovino, para evaluar el uso de extractos vegetales con acciones protoscolicidas como posibles agentes a incluir durante el procedimiento PAIR [Mahmoodpour et al. 2023]. En segundo lugar, los péptidos más prometedores con buena actividad protoscolicida podrían administrarse de forma local en la zona periquística, antes y después de la cirugía de remoción, con el interés de minimizar posibles riesgos de siembra parasitaria, anafilaxis y/o recidivas. Este tratamiento podría coadyuvar en la quimioprofilaxis pre- y posoperatoria usualmente realizada mediante la administración de benzimidazoles, específicamente albendazol, durante al menos 15 días precirugía y, por lo menos, durante tres ciclos posoperatorios [Nunnari et al., 2012; Pinto, 2017].

Por fuera del contexto de la EQ secundaria, y dada la amplia variedad de patógenos capaces de ser reconocidos por los RS seleccionados para el diseño de los péptidos, estos últimos también podrían estudiarse en términos de su espectro de posibles actividades antimicrobianas (antibacterianas, antivirales, antifúngicas y antiparasitarias). En este sentido, el péptido sintético 11-mer **p20**, correspondiente a la secuencia consenso *pbs1* presente en el receptor SALSA, mostró una sorprendente capacidad para inducir la aglutinación de *Streptococcus mutans* y de otras bacterias patógenas [Bikker et al., 2002; 2004], sugiriendo su potencial aplicabilidad para el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos. Por su parte, los péptidos 11-mer homólogos a *pbs1* derivados del receptor CD6 (**p17**, **p18** y **p19**) fueron previamente sugeridos, también, como posibles agentes antibacterianos [Martínez-Florensa et al., 2018]. En particular, los tres péptidos en cuestión mostraron una alta afinidad de unión por PAMPs de bacterias Gram-negativas (LPS) y Gram-positivas (ácido lipoteicoico), en ambos casos exhibiendo valores de K_d en el rango nM. En dicho estudio, **p19** se destacó por poseer amplias propiedades de aglutinación bacteriana y por mejorar, tras su administración sistémica, la supervivencia de ratones sometidos a sepsis polimicrobiana. Asimismo, **p19** mostró importantes efectos aditivos en la supervivencia de dichos ratones al combinarse con imipenem/cilastatina [Martínez-Florensa et al., 2018]. Por otro lado, y más recientemente, nuestro grupo reportó que, al menos *in vitro*, los tándems derivados de los receptores CD5 (**T7**) y CD6 (**T8**) inhiben el crecimiento fúngico de *Cryptococcus neoformans*, así como también interfieren en sus procesos de inducción capsular y de

titanización, dos factores de virulencia fúngicos implicados en la evasión de la respuesta inmune [Mourglia-Ettlin et al., 2024]. Así, se sugirió que tanto **T7** como **T8**, podrían ser de utilidad para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos contra la criptococosis. En base a toda esta evidencia, resultaría por demás interesante explorar el espectro de posibles actividades antimicrobianas para los 39 péptidos sintéticos diseñados en la presente tesis. De hecho, nuestro grupo de trabajo ha comenzado recientemente a ejecutar un proyecto de investigación para evaluar, de manera sistemática, el potencial valor antifúngico de los péptidos sintéticos 35-mer desarrollados en la presente tesis (Proyecto FCE_1_2023_1_175917 - Responsable: Dr. Mourglia-Ettlin).

Por otro lado, y también por fuera del contexto de la EQ secundaria, los péptidos sintéticos desarrollados en la presente tesis también podrían ser evaluados en términos de su potencial utilidad para la detección de infecciones focales ocultas. A grandes rasgos, dichas infecciones se caracterizan por ser microbiológicamente activas, aunque no produzcan síntomas clínicos perceptibles, dificultando así su diagnóstico y posterior tratamiento [Pallasch & Wahl, 2000; Goymerac & Woollard, 2004]. En este sentido, dada la capacidad de los péptidos sintéticos diseñados para reconocer diversos antígenos microbianos, podría resultar de interés explorar su utilidad para detectar infecciones focales ocultas tras su conjugación con un marcador, por ejemplo, un radiotrazador; un campo de estudio de reciente crecimiento para el trabajo con péptidos antimicrobianos [Ebenhan et al., 2014]. Esta nueva estrategia de diagnóstico consiste en utilizar péptidos antimicrobianos capaces de unirse a patógenos (principalmente bacterias y hongos), y marcarlos con radiotrazadores para que sean de utilidad en la obtención de imágenes efectivas sobre la localización de los mismos; incluidas cepas microbianas resistentes a antibióticos/antifúngicos [Kahts et al., 2024; Ebenhan et al., 2014; Arteaga C. et al 2010]. Resultados prometedores siguiendo esta estrategia, se han obtenido hasta el momento para la detección de *Staphylococcus aureus* mediante tomografía por emisión de positrones (PET) y tomografía por emisión de fotón único (SPECT) [Bhatt-Mitra et al., 2023; Bhatt-Mitra et al., 2024], así como también para la detección de *Candida albicans* y *Aspergillus niger* mediante PET [Osorio et al., 2024]. Dado el buen perfil de biocompatibilidad de los péptidos sintéticos desarrollados en la presente tesis, y su muy probable diversidad de reconocimiento para antígenos microbianos derivada de su origen en RS, podría resultar en un muy interesante campo de estudio con aplicaciones prácticas relativamente inmediatas.

En suma, la ejecución de la presente tesis generó un gran volumen de información y de datos que, más allá de su utilidad propia y directa relacionada con el campo de la EQ secundaria, brindará herramientas útiles para la búsqueda y optimización de péptidos sintéticos con interés inmunológico, derivados de la secuencia primaria de múltiples y variados inmunoreceptores. Asimismo, la diversidad de péptidos sintéticos desarrollados, sumada a la biocompatibilidad de los mismos y a su potencial valor como inmunomoduladores y como agentes de reconocimiento microbiano, permitirá explorar nuevas líneas de investigación para nuestro grupo de trabajo.

Capítulo 9.

BIBLIOGRAFÍA

Abdelraouf et al. (2015). **Clinical and serological outcomes with different surgical approaches for human hepatic hydatidosis.** *Soc. Brasileira Med. Trop.* 48(5), 587–593.

Agudelo-Higuita et al. (2016). **Cystic Echinococcosis.** *J Clin Microbiol.* 54(3):518-23.

Ait-Aissa et al. (2006). **Alterations in interferon-gamma and nitric oxide levels in human echinococcosis.** *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 52(1):65-70.

Al-Qaoud & Abdel-Hafez (2008). **The induction of T helper type 1 response by cytokine gene transfection protects mice against secondary hydatidosis.** *Parasitol Res.* 102(6), 1151-1155.

Albalawi et al. (2020). **High Potency of Organic and Inorganic Nanoparticles to Treat Cystic Echinococcosis: An Evidence-Based Review.** *Nanomaterials (Basel).* 10(12):2538

Almaaytah et al (2017). **Development of novel ultrashort antimicrobial peptide nanoparticles with potent antimicrobial and antibiofilm activities against multidrug-resistant bacteria.** *Drug Des Devel Ther.* 11:3159-3170.

Álvarez-Rojas et al. (2014). **Echinococcus granulosus sensu lato genotypes infecting humans--review of current knowledge.** *Int J Parasitol.* 44(1):9-18.

Alzoubi et al. (2024). **The recurrence rate after primary resection cystic echinococcosis: A meta-analysis and systematic literature review.** *Asian J Surg.* 9584(24), 02081-5

Amri et al. (2007). **In vitro antihydatic action of IFN-gamma is dependent on the nitric oxide pathway.** *J Interferon Cytokine Res.* 27(9), 781-787.

Amri et al. (2009). **Involvement of IL-10 and IL-4 in evasion strategies of Echinococcus granulosus to host immune response.** *Eur Cytokine Netw.* 20(2), 63-68.

Arbildi et al. (2024). **Immunization with a Mu-class glutathione transferase from Echinococcus granulosus induces efficient antibody responses and confers long-term protection against secondary cystic echinococcosis.** *Microbes Infect.* 26(5-6):105364.

Arif et al. (2008). **Albendazole as an adjuvant to the standard surgical management of hydatid cyst liver.** *Int J Surg.* 6(6):448-51.

Arteaga et al. (2010). **Clinical trial of specific imaging of infections.** *Nucl Med Commun.* 31(8):726-33

Aruffo et al. (1997). **CD6-ligand interactions: a paradigm for SRCR domain function?** *Immunology today.* 18(10), 498-504.

Bachmann et al. (2022). **CD36-A Host Receptor Necessary for Malaria Parasites to Establish and Maintain Infection.** *Microorganisms.* 10(12):2356.

Bhatt-Mitra et al. (2023). **Harnessing positron emission tomography and Cherenkov luminescence imaging with UBI-derived octapeptide.** *Drug Dev Res.* 84(7):1513-1521.

Bhatt-Mitra et al. (2024). **Expanding a peptide-covalent probe hybrid for PET imaging of S. aureus driven focal infections.** *EJNMMI Radiopharm Chem.* 9(1):25.

Balakrishnan et al. (2014). **Differential proteomic analysis of synovial fluid from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients.** *Clinical Proteomics.* 11(1), 1.

Baz et al. (2006). **Complexity and function of cytokine responses in experimental infection by Echinococcus granulosus.** *Immunobiology.* 211(1-2), 3-9.

Bessa-Pereira et al. (2016). **The Scavenger Receptor SSc5D Physically Interacts with Bacteria through the SRCR-Containing N-Terminal Domain.** *Front Immunol.* 7:416.

Bowdish & Gordon (2009). **Conserved domains of the class A scavenger receptors: evolution and function.** *Immunological reviews.* 227(1), 19-31.

Biadlegne et al. (2014). **Mycobacterium tuberculosis Affects Protein and Lipid Content of Circulating Exosomes in Infected Patients Depending on Tuberculosis Disease State.** *Biomedicines.* 10(4), 783-803.

Bikker et al. (2002). **Identification of the bacteria-binding peptide domain on salivary agglutinin (gp-340/DMBT1), a member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily.** *J Biol Chem.* 277(35):32109-32115.

Bikker et al. (2004). **Bacteria binding by DMBT1/SAG/gp-340 is confined to the VEVLXXXXW motif in its scavenger receptor cysteine-rich domains.** *J Biol Chem.* 279(46), 47699-47703.

Brännström et al. (2002). **Arginine residues in domain V have a central role for bacteria-binding activity of macrophage scavenger receptor MARCO.** *Biochem Biophys Res Commun.* 290(5), 1462-1469.

Brunetti & Junghanss (2009). **Update on cystic hydatid disease.** *Curr Opin Infect Dis.* 22(5), 497-502.

Brunetti et al. (2010). **Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans.** *Acta Trop.* 114(1):1-16.

Brunetti et al. (2016). **In vitro and in vivo efficacy, toxicity, bio-distribution and resistance selection of a novel antibacterial drug candidate.** *Sci Rep.* 6:26077.

Budke et al. (2006). **Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis.** *Emerg Infect Dis.* 12(2):296-303.

Caron et al. (2005). **Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells.** *J Immunol.* 175(3):1551-7.

Carrasco et al. (2014). **A role for scavenger-like lymphocyte receptor CD6 in HIV-1 viral infection.** *AIDS Res. Hum. Retrov.* 30(S1): A49-A50 (abstract).

Cau et al. (2018). **Structure, Function, Involvement in Diseases and Targeting of 14-3-3 Proteins: An Update.** *Curr Med Chem.* 25(1):5-21.

CDC, 2019. **Echinococcosis.** www.cdc.gov/dpdx/echinococcosis/index.html

Chappell et al. (2015). **Structures of CD6 and Its Ligand CD166 Give Insight into Their Interaction.** *Structure (London, England: 1993).* 23(8), 1426-1436.

Chai et al. (2021). **Albendazole and Mebendazole as Anti-Parasitic and Anti-Cancer Agents: An Update.** *Korean J Parasitol.* 59(3):189–225

Cibulski et al. (2016). **Quillaja brasiliensis saponins induce robust humoral and cellular responses in a bovine viral diarrhea virus vaccine in mice.** *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 45:1-8.

Craig et al. (2007). **Prevention and control of cystic echinococcosis.** *Lancet Infect Dis.* 7(6):385-94.

Craig (1997). **Echinococcus granulosus: immunodiagnosis and vaccination, a perspective.** *Parassitologia.* 39(4):345-7.

Cucher et al. (2013). **Echinococcus granulosus pig strain (G7 genotype) protoscoleces did not develop secondary hydatid cysts in mice.** *Vet Parasitol.* 193(1-3), 185-192.

Cucher et al. (2016). **Cystic echinococcosis in South America: systematic review of species and genotypes of Echinococcus granulosus sensu lato in humans and natural domestic hosts.** *Trop Med Int Health.* 21(2):166-75.

da-Costa et al. (2015). **Antimicrobial peptides: an alternative for innovative medicines?** *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015 Mar;99(5):2023-40.

de-la-Fuente-Núñez et al. (2017). **Antimicrobial peptides: Role in human disease and potential as immunotherapies.** *Pharmacol Ther.* 178:132-140.

Dematteis et al. (1999). **Antibody and Th1/Th2-type responses in BALB/c mice inoculated with live or dead Echinococcus granulosus protoscoleces.** *Parasite Immunol.* 21(1), 19-26.

Dematteis et al. (2003). **Cytokine response and outcome of infection depends on the infective dose of parasites in experimental infection by Echinococcus granulosus.** *Parasite Immunol.* 25(4):189-197.

Dempster et al. (1991). **Echinococcus granulosus: development of an intermediate host mouse model for use in vaccination studies.** *Int J Parasitol.* 21(5), 549-554.

Dempster et al. (1992). **Echinococcus granulosus: use of an intermediate host mouse model to evaluate sources of protective antigens and a role for antibody in the immune response.** *Int J Parasitol.* 22(4), 435-441.

Daeki et al. (2000). **IgG-subclass antibody responses and the natural history of hepatic cystic echinococcosis in asymptomatic patients.** *Ann Trop Med Parasitol.* 94(4), 319-328.

Ebenhan et al. (2014). **Antimicrobial peptides: their role as infection-selective tracers for molecular imaging.** *Biomed Res Int.* 2014:867381.

Elomaa et al. (1998). **Structure of the human macrophage MARCO receptor and characterization of its bacteria-binding region.** *J Biol Chem.* 273(8):4530-8.

Esposito et al. (2024). **Biodistribution of Native and Nanoformulated Innate Defense Regulator Peptide 1002.** *Mol Pharm.* 21(6):2751-2766.

Fabriek et al. (2005). **The macrophage scavenger receptor CD163.** *Immunobiology.* 210(2-4):153-60.

Fabriek et al. (2009). **The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria.** *Blood.* 113(4), 887-892.

Ferragut & Nieto (1996). **Antibody response of Echinococcus granulosus infected mice: recognition of glucidic and peptidic epitopes and lack of avidity maturation.** *Parasite Immunol.* 18(8), 393-402.

Freeman et al. (1990). **An ancient, highly conserved family of cysteine-rich protein domains revealed by cloning type I and type II murine macrophage scavenger receptors.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 87(22), 8810-8814.

Galgóczy et al. (2019). **Cysteine-Rich Antifungal Proteins from Filamentous Fungi are Promising Bioactive Natural Compounds in Anti-Candida Therapy.** *Isr J Chem.* 59(5):360-370.

Gao et al. (2022). **Adaptation of African swine fever virus to porcine kidney cells stably expressing CD163 and Siglec1.** *Front Immunol.* 13:1015224.

García-Luna et al. (2021). **Polyreactive antibodies as potential humoral biomarkers of host resistance to cystic echinococcosis.** *Parasite Immunol.* 43(3), e12802.

García-Luna et al. (2024). **Recombinant CD5 and CD6 Ectodomains Induce Antiparasitic and Immunomodulatory Effects in Secondary Cystic Echinococcosis.** *Parasite Immunol.* 46(4):e13034

Ghasemi et al. (2021). **The effect of exogenous ciliary neurotrophic factor on cell cycle and neural differentiation markers of in vitro model cells: New insights for future therapeutic approaches.** *Cell Biochem Funct.* 39(5):636-645.

Gebe et al. (1997). **Molecular cloning, mapping to human chromosome 1 q21-q23, and cell binding characteristics of Spalpha, a new member of the scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) family of proteins.** *J Biol Chem.* 272(10):6151-8.

Gebe et al. (2000). **Molecular cloning, genomic organization and cell-binding characteristics of mouse Spalpha.** *Immunology.* 99(1):78-86.

Gomes et al. (2009). **The scavenger receptor MARCO is involved in Leishmania major infection by CBA/J macrophages.** *Parasite Immunol.* 31(4):188-98.

Gonçalves et al. (2009). **Molecular cloning and analysis of SSc5D, a new member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily.** *Mol Immunol.* 46(13), 2585-2596.

González-Porcile et al. (2024). **Mouse model of secondary cystic echinococcosis.** *Methods in Cell Biology.* 185, 115-136.

Gough & Gordon (2000). **The role of scavenger receptors in the innate immune system.** *Microbes and Infection.* 2(3), 305-311.

Goymerac & Woollard (2004). **Focal infection: a new perspective on an old theory.** *Gen Dent.* 52(4):357-61; quiz 362, 365-6.

Groo et al. (2018). **Reverse micelle-lipid nanocapsules: a novel strategy for drug delivery of the plectasin derivate AP138 antimicrobial peptide.** *Int J Nanomedicine.* 13:7565-7574.

Gunti & Notkins, (2015). **Polyreactive Antibodies: Function and Quantification.** *J Infect Dis.* 212 Suppl 1(Suppl 1):S42-6.

Hamid et al. (2015). **Eimeria bovis infection modulates endothelial host cell cholesterol metabolism for successful replication.** *Vet Res.* 46(1):100.

Heath & Lawrence (1996). **Antigenic polypeptides of Echinococcus granulosus oncospheres and definition of protective molecules.** *Parasite Immunol.* 18(7), 347-357.

Heath (1970). **The development of Echinococcus granulosus larvae in laboratory animals.** *Parasitology*. 60(3), 449-456.

Heath et al. (1981). **Resistance to Echinococcus granulosus infection in lambs.** *J Parasitol*. 67(6), 797-799.

Hernández-Pomi et al. (1997). **Analysis of cytokine and specific antibody profiles in hydatid patients with primary infection and relapse of disease.** *Parasite Immunol*. 19(12), 553-561.

Horton (1997). **Albendazole in treatment of human cystic echinococcosis: 12 years of experience.** *Acta Tropica*. 64(1-2), 79-93.

Horton (2003). **Albendazole for the treatment of echinococcosis.** *Fundam Clin Pharmacol*. 17(2), 205-212

Hüttner et al. (2008). **Genetic characterization and phylogenetic position of Echinococcus felidis (Cestoda: Taeniidae) from the African lion.** *Int J Parasitol*. 38, 861–868.

Imperlini et al. (2023). **Peptides against Bacterial Pathogens: Innovative Delivery Nanosystems for Pharmaceutical Applications.** *Antibiotics (Basel)*. 12(1):184.

Jiang et al. (2006). **Identification and characterization of murine SCARA5, a novel class A scavenger receptor that is expressed by populations of epithelial cells.** *J Biol Chem*. 281(17), 11834-45

García-Luna, Joaquín (2022). Tesis de Maestría en Química: “**Análisis funcional de la interacción entre Echinococcus granulosus y los receptores linfocitarios CD5 y CD6**”. Facultad de Química – UdelaR, PEDECIBA Química-MEC. Uruguay.

John et al. (2019). **In vitro analysis of synthetic peptides in blocking the entry of dengue virus.** *Virus Res*. 260:142-150.

Junghanss et al. (2008). **Clinical management of cystic echinococcosis: state of the art, problems, and perspectives.** *Am J Trop Med Hyg*. 79(3), 301-311.

Kahts M. et al. (2024). **Recently developed radiopharmaceuticals for bacterial infection imaging.** *EJNMMI Radiopharm Chem*. 9(1):49.

Kang et al. (2020). **IL-10 Protects Mice From the Lung Infection of Acinetobacter baumannii and Contributes to Bacterial Clearance by Regulating STAT3-Mediated MARCO Expression in Macrophages.** *Front Immunol*. 11:270.

Kazmirchuk et al. (2017). **Designing anti-Zika virus peptides derived from predicted human-Zika virus protein-protein interactions.** *Comput Biol Chem*. 71:180-187.

Khuroo et al. (1993). **Percutaneous drainage versus albendazole therapy in hepatic hydatidosis: a prospective, randomized study.** *Gastroenterology*. 104(5):1452-9.

Khuroo (2021). **Percutaneous Drainage in Hepatic Hydatidosis-The PAIR Technique: Concept, Technique, and Results.** *J Clin Exp Hepatol*. 11(5):592-602.

Lamiabile et al. (2016). **PEP-FOLD3: faster de novo structure prediction for linear peptides in solution and in complex.** *Nucleic Acids Res*. 44(W1):W449-54.

Landa et al. (2009). **Antimicrobial peptides (Temporin A and Iseganan IB-367): effect on the cysticerci of Taenia crassiceps.** *Mol Biochem Parasitol*. 164(2):126-30.

Lei et al. (2019). **The antimicrobial peptides and their potential clinical applications.** *Am J Transl Res*. 11(7):3919-3931.

Li et al. (2023). **Species-specific MARCO-alphavirus interactions dictate chikungunya virus viremia.** *Cell Reports*. 42(5), 112418.

Lightowlers (2010). **Fact or hypothesis: concomitant immunity in taeniid cestode infections.** *Parasite Immunol*. 32(8), 582-589.

Lissandrin et al. (2015) **Factors influencing the serological response in hepatic echinococcus granulosus infection.** *Am J Trop Med Hyg*. 94:166–71.

Liu et al. (2013) **Peptides corresponding to the predicted heptad repeat 2 domain of the feline coronavirus spike protein are potent inhibitors of viral infection.** *PLoS One*. 8(12):e82081.

Liu et al. (2023). **Genetically modified pigs with CD163 point mutation are resistant to HP-PRRSV infection.** *Zool Res*. 45(4):833-844.

Lymbery et al. (2015). **Echinococcus canadensis, E. borealis, and E. intermedius. What's in a name?** *Trends Parasitol*. 31(1):23-9.

Maciel et al., (2008). **Anti-plasmodium activity of angiotensin II and related synthetic peptides.** *PLoS One*. 3(9):e3296.

Mahmoodpour et al. (2023). **In vitro and ex vivo protoscolicidal effects of hydroalcoholic extracts of Eucalyptus microtheca on protoscoleces of Echinococcus granulosus sensu stricto: A light and scanning electron microscopy (SEM) study.** *Exp Parasitol*. 251:108553.

Mansour et al., (2015). **Peptide IDR-1018: modulating the immune system and targeting bacterial biofilms to treat antibiotic-resistant bacterial infections.** *J Pept Sci*. 21(5):323-9.

Manzano-Román et al. (2015). **Serological Diagnosis and Follow-Up of Human Cystic Echinococcosis: A New Hope for the Future?** *Biomed Res Int.* 2015:428205.

Martínez et al. (2011). **The conserved scavenger receptor cysteine-rich superfamily in therapy and diagnosis.** *Pharmacol Rev.* 63(4), 967-1000.

Martínez et al. (2014). **The macrophage soluble receptor AIM/Api6/CD5L displays a broad pathogen recognition spectrum and is involved in early response to microbial aggression.** *Cell Mol Immunol.* 11(4), 343-354.

Martínez-Florensa et al. (2014). **Targeting of key pathogenic factors from gram-positive bacteria by the soluble ectodomain of the scavenger-like lymphocyte receptor CD6.** *J Infect Dis.* 209(7), 1077-1086.

Martínez-Florensa et al. (2016). **Protective Effects of Human and Mouse Soluble Scavenger-Like CD6 Lymphocyte Receptor in a Lethal Model of Polymicrobial Sepsis.** *Antimicrob Agents Chemother.* 61(1), e01391-16.

Martínez-Florensa et al. (2018). **Conserved Bacterial-Binding Peptides of the Scavenger-Like Human Lymphocyte Receptor CD6 Protect From Mouse Experimental Sepsis.** *Front. Immunol.* 9,627.

Mattos et al. (2024). **The immunology of B-1 cells: from development to aging.** *Immun Ageing.* 21(1):54.

Miles et al. (2019). **Combining proteomics and bioinformatics to explore novel tegumental antigens as vaccine candidates against *Echinococcus granulosus* infection.** *J Cell Biochem.* 120(9):15320-15336.

Miles et al. (2020a). **Linking murine resistance to secondary cystic echinococcosis with antibody responses targeting *Echinococcus granulosus* tegumental antigens.** *Immunobiology.* 225(3), 151916.

Miles et al. (2020b). **Interactome analysis of CD5 and CD6 ectodomains with tegumental antigens from the helminth parasite *Echinococcus granulosus sensu lato*.** *Int J Biol Macromol.* 164, 3718-3728.

Miles et al. (2023). **Experimental cystic echinococcosis as a proof of concept for the development of peptide-based vaccines following a novel rational workflow.** *Biologicals.* 82:101684.

Miyazaki et al. (1999). **Increased susceptibility of thymocytes to apoptosis in mice lacking AIM, a novel murine macrophage-derived soluble factor belonging to the scavenger receptor cysteine-rich domain superfamily.** *J Exp Med.* 189(2):413-22.

Mourglia-Ettlin et al. (2011). **Early peritoneal immune response during *Echinococcus granulosus* establishment displays a biphasic behavior.** *PLoS Negl Trop Dis.* 5(8), e1293.

Mourglia-Ettlin et al. (2016a). **Natural and induced antibodies contribute to differential susceptibility to secondary cystic echinococcosis of Balb/c and C57Bl/6 mice.** *Immunobiology*. 221(1), 103-115.

Mourglia-Ettlin et al. (2016b). **Susceptibility and resistance to Echinococcus granulosus infection: Associations between mouse strains and early peritoneal immune responses.** *Immunobiology*. 221(3):418-26.

Mourglia-Ettlin et al. (2018). **The ectodomains of the lymphocyte scavenger receptors CD5 and CD6 interact with tegumental antigens from Echinococcus granulosus sensu lato and protect mice against secondary cystic echinococcosis.** *PLoS Negl Trop Dis*. 12(11): e0006891.

Mourglia-Ettlin et al. (2024). **In Vitro Analysis of Tandem Peptides from Human CD5 and CD6 Scavenger Receptors as Potential Anti-Cryptococcal Agents.** *J Fungi (Basel)*. 24;10(10):667.

Mukouhara et al. (2011). **Surface lipoprotein PpiA of Streptococcus mutans suppresses scavenger receptor MARCO-dependent phagocytosis by macrophages.** *Infect Immun*. 79(12), 4933–4940.

Müller-Schollenberger et al. (2001). **Immunisation with Salmonella typhimurium-delivered glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protects mice against challenge infection with Echinococcus multilocularis eggs.** *Int J Parasitol*. 31(13):1441-9.

Nakao et al. (2013). **Phylogenetic systematics of the genus Echinococcus (Cestoda: Taeniidae).** *Int J Parasitol*. 43(12-13):1017-29.

Netea et al. (2004). **Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system.** *J Leukoc Biol*. 75(5):749-55

Nikapitiya et al. (2020). **Octominin: A Novel Synthetic Anticandidal Peptide Derived from Defense Protein of Octopus minor.** *Mar Drugs*. 18(1):56.

Norouzi et al. (2020). **Scolicidal Effects of Nanoparticles Against Hydatid Cyst Protoscolices in vitro.** *Int J Nanomedicine*. 15:1095-1100

Novakowski et al. (2016). **A naturally occurring transcript variant of MARCO reveals the SRCR domain is critical for function.** *Immunol Cell Biol*. 94(7), 646-655.

Nunnari et al. (2012). **Hepatic echinococcosis: Clinical and therapeutic aspects.** *World J Gastroenterol*. 18(13), 1448-1458

Oliveira et al. (2024). **CD5L as a promising biological therapeutic for treating sepsis.** *Nat Commun*. 15(1), 4119.

Ortona et al. (2005). **Echinococcus granulosus cDNA library with IgG4 from patients with cystic echinococcosis identifies a new tegumental protein involved in the immune escape.** *Clin Exp Immunol.* 142(3):528-38.

Osorio et al. (2024). **Peptide derived from plant defensins: A promising ⁶⁸Ga radiolabelled agent for diagnostic of infection foci in PET.** *Chem Biol Drug Des.* 104(1):e14578.

Pallasch & Wahl, (2000). **The focal infection theory: appraisal and reappraisal.** *J Calif Dent Assoc.* 28(3):194-200.

Pang et al. (2018). **Radical versus conservative surgical treatment of liver hydatid cysts: a meta-analysis.** *Front Med.* 12(3), 350-359.

Pertinhez et al. (2018). **Dissection of the Structural Features of a Fungicidal Antibody-Derived Peptide.** *Int J Mol Sci.* 19(12):3792.

Pfalzgraff et al. (2018). **PS-neutralizing peptides reduce outer membrane vesicle-induced inflammatory responses.** *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* (10):1503-1513.

Piccoli et al. (2014). **Long-term sonographic and serological follow-up of inactive echinococcal cysts of the liver: hints for a "watch-and-wait" approach.** *PLoS Negl Trop Dis.* 8(8), e3057.

Pinto (2017). **Diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la hidatidosis.** *Rev Chil Cirugia.* 69(1), 94-98.

Plevriti et al. (2024). **The Role of Soluble CD163 (sCD163) in Human Physiology and Pathophysiology.** *Cells.* 13(20), 1679.

PrabhuDas et al. (2017). **A Consensus Definitive Classification of Scavenger Receptors and Their Roles in Health and Disease.** *J Immunol.* 198(10), 3775-3789.

Reichhardt et al. (2020). **Structures of SALSA/DMBT1 SRCR domains reveal the conserved ligand-binding mechanism of the ancient SRCR fold.** *Life Sci Alliance.* 3(4):e201900502.

Resnick et al. (1996). **Structures of class A macrophage scavenger receptors. Electron microscopic study of flexible, multidomain, fibrous proteins and determination of the disulfide bond pattern of the scavenger receptor cysteine-rich domain.** *J Biol Chem.* 271(43), 26924-26930.

Riganò et al. (1995a). **In vitro production of cytokines by peripheral blood mononuclear cells from hydatid patients.** *Clin Exp Immunol.* 99(3), 433-439.

Riganò et al. (1995b). **Immunological markers indicating the effectiveness of pharmacological treatment in human hydatid disease.** *Clin Exp Immunol.* 102(2), 281-285

Riganò et al. (1996). **Production of IL-5 and IL-6 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with Echinococcus granulosus infection.** *Clin Exp Immunol.* 105(3), 456-459.

Rinaldi et al. (2014). **Medical treatment versus "Watch and Wait" in the clinical management of CE3b echinococcal cysts of the liver.** *BMC infectious diseases.* 14, 492.

Rogan et al. (2015). **Post-encystment/established immunity in cystic echinococcosis: is it really that simple?** *Parasite Immunol.* 37(1), 1-9.

Rzepecka et al. (2009). **Calreticulin from the intestinal nematode Heligmosomoides polygyrus is a Th2-skewing protein and interacts with murine scavenger receptor-A.** *Mol Immunol.* 46(6):1109-19.

Sanjurjo et al. (2015). **AIM/CD5L: a key protein in the control of immune homeostasis and inflammatory disease.** *J Leuk Biol.* 98(2), 173-184.

Sarhan et al. (2012). **Hepatitis C virus infection of human T lymphocytes is mediated by CD5.** *J Virol.* 86(7), 3723-3735.

Sarrias et al. (2004a). **The Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) domain: an ancient and highly conserved protein module of the innate immune system.** *Crit Rev Immunol.* 24(1), 1-37.

Sarrias et al. (2004b). **Biochemical characterization of recombinant and circulating human Spalpha.** *Tissue Antigens.* 63(4):335-44.

Sarrias et al. (2005). **A role for human Sp alpha as a pattern recognition receptor.** *J Biol Chem.* 280(42), 35391-35398.

Sarrias et al. (2007). **CD6 binds to pathogen-associated molecular patterns and protects from LPS-induced septic shock.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 104(28), 11724-11729.

Severi et al. (1997). **Antibody response of Echinococcus granulosus infected mice: protoscolex specific response during infection is associated with decreasing specific IgG1/IgG3 ratio as well as decreasing avidity.** *Parasite Immunol.* 19(12), 545-552.

Shakibaie et al. (2022). **Effects of green synthesized zinc nanoparticles alone and along with albendazole against hydatid cyst protoscoleces.** *Ann Med Surg (Lond).* 78:103746.

Shams et al. (2011). **Role of albendazole in the management of hydatid cyst liver.** *Saudi J Gastroenterol.* 17(5):343-7.

Sharafi et al. (2017). **Scolicidal agents for protoscolices of Echinococcus granulosus hydatid cyst: Review of literature.** *J Res Med Sci.* 22:92.

Siles-Lucas et al. (2008). **14-3-3 proteins in Echinococcus: their role and potential as protective antigens.** *Exp Parasitol.* 119(4):516-523.

Smego et al. (2003). **Percutaneous Aspiration-Injection-Reaspiration Drainage Plus Albendazole or Mebendazole for Hepatic Cystic Echinococcosis: A Meta-analysis.** *Clin Infect Dis.* 37(8), 1073–1083

Soleymani et al. (2024). **Effects of Albendazole, Mebendazole, and Praziquantel Nanocapsules against Protoscolices of Hydatid Cyst.** *Pathogens.* 13(9), 790.

Stojkovic et al. (2009). **Treatment response of cystic echinococcosis to benzimidazoles: a systematic review.** *PLoS Negl Trop Dis.* 3(9), e524.

Tamarozzi et al. (2016). **Comparison of the diagnostic accuracy of three rapid tests for the serodiagnosis of hepatic cystic echinococcosis in humans.** *PLoS Negl Trop Dis.* 10:e0004444.

Thompson (1995). **Echinococcus and Hydatid Disease.** Eds. Thompson & Lymbery. Oxford: CAB International, UK; 1995: 1-50.

Tian et al. (2024). **ROS are required for the germinative cell proliferation and metacestode larval growth of Echinococcus multilocularis.** *Front Microbiol.* 15:1410504.

Todorov et al. (1992). **Chemotherapy of human cystic echinococcosis: comparative efficacy of mebendazole and albendazole.** *Ann Trop Med Parasitol.* 86(1), 59-66.

Velasco-de-Andrés et al. (2020). **The Lymphocytic Scavenger Receptor CD5 Shows Therapeutic Potential in Mouse Models of Fungal Infection.** *Antimicrob Agents Chemother.* 65(1):e01103-20.

Velasco-Tirado et al. (2017). **Recurrence of cystic echinococcosis in an endemic area: a retrospective study.** *BMC Inf Dis.* 17(1), 455.

Vera et al. (2009). **The CD5 ectodomain interacts with conserved fungal cell wall components and protects from zymosan-induced septic shock-like syndrome.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 106(5), 1506-1511.

Virginio et al. (2007). **Effects of protoscoleces and AgB from Echinococcus granulosus on human neutrophils: possible implications on the parasite's immune evasion mechanisms.** *Parasitol Res.* 100(5):935-42.

Vizioli & Salzet, (2002). **Antimicrobial peptides versus parasitic infections?** *Trends Parasitol.* 18(11):475-6.

WHO. **Neglected Tropical Diseases.** <https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases>.

Xiao et al. (1994). **Effects of mebendazole, albendazole, and praziquantel on fumarate hydratase, pyruvate kinase, and phosphoenolpyruvate carboxykinase of Echinococcus granulosus cyst wall harbored in mice.** *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* 15(1):69-72.

Xiao et al. (2006). **Echinococcus shiquicus, a new species from the Qinghai-Tibet plateau region of China: discovery and epidemiological implications.** *Parasitol Int.* 55 Suppl: S233-6.

Yanaba et al, (2009). **The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals.** *J Immunol.* 182(12):7459-72.

Zani et al. (2015). **Scavenger receptor structure and function in health and disease.** *Cells.* 4(2),178–201.

Zeghir-Bouteldja et al. (2009). **In Vitro Study of Nitric Oxide Metabolites Effects on Human Hydatid of Echinococcus granulosus.** *J Parasitol Res.* 2009:624919.

Zeghir-Bouteldja et al. (2013). **Comparative study of nitric oxide (NO) production during human hydatidosis: relationship with cystic fluid fertility.** *Parasitol Res.* 112(2):649-54.

Zhang et al. (2001). **Further studies on an intermediate host murine model showing that a primary Echinococcus granulosus infection is protective against subsequent oncospherical challenge.** *Parasitol Int.* 50(4), 279-283.

Zhao et al. (2021) **Cutting Edge: CD36 Mediates Phagocyte Tropism and Avirulence of Toxoplasma gondii.** *J Immunol.* 207(6):1507-1512.

Zheng et al. (2018). **Identification of emu-TegP11, an EF-hand domain-containing tegumental protein of Echinococcus multilocularis.** *Vet Parasitol.* 255:107-113.

Zhu et al. (2015). **Mechanism of protective immunity by vaccination with recombinant Echinococcus granulosus glutathione S-transferase (Chinese strain) in mice.** *Exp Ther Med.* 10(3):1127-1132.

ANEXO

González-Porcile MC, Muniz-Lagos AC, Cucher MA, Mourglia-Ettlin G. **Mouse model of secondary cystic echinococcosis.** *Methods Cell Biol.* 2024; 185:115-136. doi: 10.1016/bs.mcb.2024.02.039. PMID: 38556444.