



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



Programa de Posgrado en Química  
Facultad de Química - Universidad de la República  
Programa para el Desarrollo de las Ciencias Básicas

***“Péptidos sintéticos para inmunodiagnóstico de hidatidosis humana:  
Estrategias de identificación, selección y valoración”***

**Tesis de Maestría**

Presentada como requisito para optar al título de

**Magíster en Química**

**B.C. Javier Magnone Zozaya**

Director Académico: **Dr. Gustavo Mourglia-Ettlin**

Directores de Tesis: **Dra. Cecilia Sónora, Dr. Gustavo Mourglia-Ettlin**

Tribunal Evaluador: **Dra. Analía Rial, Dra. Celia Buzzi, Dra. Mariana Barraco**

**Montevideo, junio de 2024**

*“...Encontré el camino al caminar, y al perderme, me logré encontrar...”*

*LGM.*

## RESUMEN

La equinococosis quística (EQ), o hidatidosis, es una infección parasitaria zoonótica causada por cestodos del complejo genético *Echinococcus granulosus sensu lato* (s.l.), siendo la enfermedad tropical desatendida de mayor prevalencia e incidencia en Uruguay. En humanos, la EQ es una patología con curso normalmente asintomático, cuyo diagnóstico involucra técnicas imagenológicas; requiriendo equipamiento especializado y de alto costo, así como personal capacitado. Por su parte, aunque las técnicas serológicas para su diagnóstico son una opción de menor costo y realizables en instalaciones básicas, los inmunoensayos actuales para EQ presentan valores de sensibilidad y especificidad variables; haciendo que no sean la primera opción diagnóstica. Estos problemas suelen deberse a las características de los antígenos parasitarios utilizados (crudos, purificados y/o recombinantes), por lo que el desarrollo de péptidos sintéticos como antígenos para inmunodiagnóstico ha ganado popularidad recientemente. Dichos péptidos simulan/imitan epítopes B presentes en proteínas antigénicas naturales, y pueden sintetizarse de manera automatizada no-biológica a gran escala. La selección de dichos péptidos es el paso más importante para alcanzar el éxito deseado. En ese sentido, la disponibilidad actual del genoma/proteoma de diversos organismos, sumado al desarrollo de algoritmos potentes para análisis bioinformáticos, han contribuido enormemente a la predicción *in silico* de péptidos antigénicos con potencial valor inmunodiagnóstico. Por ello, en la presente tesis partimos del proteoma completo reportado para *E. granulosus* s.l. y, aplicando diversas estrategias bio-inmuno-informáticas, seleccionamos más de 60 péptidos potencialmente útiles para inmunodiagnóstico de EQ humana. Los mismos se sintetizaron comercialmente y luego se valoró su desempeño inmunodiagnóstico utilizando una amplia seroteca de estudio, generada en la presente tesis, compuesta por muestras provenientes de pacientes con EQ confirmada por cirugía, de donantes sanos y de pacientes con otras parasitosis. Finalmente, aunque los resultados obtenidos no superaron el desempeño diagnóstico alcanzado por el *kit* comercial utilizado como referencia, los mismos permitieron concluir sobre modificaciones futuras a realizar sobre el flujo de trabajo bio-inmuno-informático desarrollado, de forma tal que puedan alcanzarse mejores resultados. Asimismo, dichos resultados permitieron generar evidencia empírica relacionada con diversas propiedades y características que los péptidos sintéticos deben cumplir/exhibir para ser potencialmente útiles en técnicas de inmunodiagnóstico para EQ humana. En suma, en la presente tesis se generaron importantes conocimientos teóricos y experimentales que, a futuro, permitirán avanzar en el desarrollo de inmunoensayos basados en péptidos sintéticos, potencialmente útiles para diagnosticar diversas patologías infecciosas.

## ABSTRACT

Cystic echinococcosis (CE), or hydatidosis, is a zoonotic parasitic infection caused by cestodes of the genetic complex *Echinococcus granulosus sensu lato* (s.l.), being the neglected tropical disease with the highest prevalence and incidence in Uruguay. In humans, CE is a pathology with a normally asymptomatic course, whose diagnosis involves imaging techniques; requiring specialized and high-cost equipment, as well as trained personnel. In this sense, although serological techniques for diagnosis are a lower-cost option and can be carried out in basic facilities, current immunoassays for CE have variable sensitivities and specificities; making them not the first diagnostic option. Such problems are usually due to the characteristics of the parasite antigens used (crude, purified and/or recombinant), and thus, the development of synthetic peptides as antigens for immunodiagnosis has recently gained popularity. These peptides simulate/mimic B cell epitopes present in natural antigenic proteins, and can be synthesized in a non-biological, automated manner on a large scale. The selection of these peptides is the most important step to achieve the desired success. In this sense, the current availability of the genome/proteome of various organisms, added to the development of powerful algorithms for bioinformatic analysis, have greatly contributed to the *in-silico* prediction of antigenic peptides with potential immunodiagnostic value. Therefore, in this thesis we started from the complete proteome reported for *E. granulosus* s.l. and, applying various bio-immuno-informatic strategies, we selected more than 60 potentially useful peptides for immunodiagnosis of human CE. They were synthesized commercially and then their immunodiagnostic performance was assessed using a large serum bank, generated in this thesis, composed of samples from patients with CE confirmed by surgery, from healthy donors and from patients with other parasitoses. Finally, although the obtained results did not outperform the diagnostic performance achieved by the commercial kit used as a reference, they allowed us to conclude on future modifications to be made to the developed bio-immuno-informatic workflow, in order to further achieve better results. Likewise, these results allowed generating empirical evidence related to various properties and characteristics that synthetic peptides must meet/exhibit to be potentially useful in immunodiagnostic techniques for human CE. In summary, in this thesis important theoretical and experimental knowledge was generated that, in the future, will allow progress in the development of immunoassays based on synthetic peptides, potentially useful for diagnosing various infectious pathologies.

## AGRADECIMIENTOS

Enfrentarme a los agradecimientos de esta tesis me transporta inevitablemente a recordar momentos y experiencias vividas durante este proceso. En este análisis retrospectivo de estos últimos años, aparecen por un lado una enorme cantidad de recuerdos gratificantes y llenos de felicidad, entremezclados con momentos de soledad y de sacrificio personal. Sin lugar a dudas, es que todos estos momentos -los buenos y los no tanto- han colaborado de una forma u otra a mi crecimiento académico, profesional y personal, siendo factores claves en la culminación de este trabajo; el apoyo, la energía y la ayuda de mucha gente con la que me he cruzado en este camino.

En primer lugar, quiero agradecerle al Dr. Gustavo Mourglia Ettlín por haberme dado esta oportunidad y creer en mí cuando todavía era un estudiante de grado que terminaba sus estudios. Siempre presente, dispuesto y -por qué no- exigente para que pueda dar lo mejor académicamente, para que aprenda ese poquito más, pero siempre con el toque justo y necesario de sensibilidad que requiere el proceso de acompañar y guiar a una persona durante cinco años.

También quiero agradecerle a mi cotutora, la Dra. Cecilia Sónora, que siempre me contagió de su optimismo cuando las cosas no salían como las habíamos planeado, que me aconsejó de forma libre y desde el corazón en los momentos más difíciles de la tesis.

Gracias a Clari, esa amiga que la FQ me dio y que de una forma u otra se volvió testigo, confidente y casi que coautora de esta tesis, con su ayuda en los infinitos ELISA que se llevó este proyecto.

Quiero agradecer también a todos los integrantes de la “Casita de Adelante”: a Joaco y Seba que me enseñaron unos cuantos fundamentos de inmunología y bioinformática, y además me ayudaron en algún que otro trabajo experimental; a Pau y Clau por la energía y la buena onda de siempre, y por último a Boti y Vero por su apoyo. También agradecer al resto de los integrantes de la Cátedra de Inmunología; especialmente a Sofi, Marcio y a Nacho -estos últimos dos por las charlas futboleras que salían en los pasillos de Higiene.

Gracias a la Universidad de la República por el financiamiento del proyecto N°251 del llamado CSIC I+D 2018, titulado *“Identificación in silico y validación experimental*

*de nuevos péptidos con valor inmunodiagnóstico para hidatidosis humana”* (responsable: Dr. Gustavo Mourglia-Ettlin), en cuyo marco se realizó la presente tesis; y al PEDECIBA-Química por su apoyo económico como estudiante del programa.

Agradecer también a la Dra. Ana Hernández por la colaboración de muestras para la formación de la seroteca y a las Dras. Ana María Ferreira y Maite Folle, y la Mag. Sofía Lagos, por la colaboración del rAgB<sub>1</sub>.

Al Dr. Daniel Da Rosa y al Dr. Michel Rosas, que además de colaborar con un gran número de muestras para la formación de la seroteca, me ayudaron en la búsqueda y recolección de los datos demográficos de las mismas.

Por último, del ámbito personal, agradecer a todas esas personas con las que tuve la suerte y el destino de convivir durante estos últimos años y que siempre estaban ahí siguiendo el minuto a minuto de los interminables capítulos de la tesis; aconsejando, motivando o a veces solamente escuchando: Andre, Leto, Sofi, Belu, Facu, Santi, Chucho y más.

A la Comunera por enseñarme esta filosofía de vida; siempre compartida y con el otro al lado. Y finalmente, a mis viejos y mis hermanos; que, desde distintos lados, siempre están tirando juntos y para el mismo lugar.

## ABREVIACIONES

a.a. (aminoácido)

Ag5 (antígeno 5)

AgB (antígeno B)

BSA (seroalbúmina bovina)

COB (cobertura)

DMSO (dimetil-sulfóxido)

DS (donante sano)

EBL (epítoto B lineal)

EBLL (epítoto B lineal “limpio”)

ED (eficiencia diagnóstica)

ELISA (enzimo-inmunoensayo)

EQ (equinococosis quística)

Esp (especificidad)

ETD (enfermedad tropical desatendida)

FN (falso negativo)

FP (falso positivo)

FPKM (del inglés, *Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads*)

GPI (glicosilfosfatidilinositol)

GU4 (péptido de 34 aminoácidos derivado de la secuencia del AgB<sub>2</sub>)

HAI (hemaglutinación indirecta)

HLA (molécula del MHC de clase II humano)

IB (immunoblot)

ID (identidad)

Ind (indeterminado)

LH (líquido hidático)

NP (normoproteico)

O.N. (toda la noche; del inglés: *overnight*)

OMS (Organización Mundial de la Salud)

OP (otras parasitosis)

p/n (cociente de absorbancias entre los *pools* de muestras positivas y negativas)

p176 (péptido de 38 aminoácidos correspondiente a la región N-terminal del AgB<sub>1</sub>)

PBS (buffer fosfato salino)

pI (punto isoeléctrico)

PS (péptido señal)

PTM (modificación postraducciona)

QH (quiste hidático)

RC (reactividad cruzada)

RTM (región transmembrana)

Se (sensibilidad)

SM (secretoma)

TA (temperatura ambiente)

TM (transmembranoma)

TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina)

VN (verdadero negativo)

VP (verdadero positivo)

## ÍNDICE

### CAPÍTULO 1.

#### INTRODUCCIÓN.

1.1. Equinococosis quística.....	2
1.1.1. Ciclo de vida de <i>Echinococcus granulosus</i> s.l.....	3
1.1.2. <i>E. granulosus</i> s.l. y EQ: Distribución geográfica y epidemiología.....	5
1.1.3. Manifestaciones clínicas de la EQ en humanos.....	6
1.2. Diagnóstico de EQ en humanos.....	7
1.2.1. Antígenos utilizados en el serodiagnóstico de EQ en humanos.....	9
1.2.1.1. Líquido hidático.....	10
1.2.1.2. Antígeno B.....	12
1.2.1.3. Antígeno 5.....	14
1.3. Uso de péptidos sintéticos en inmunodiagnóstico.....	15
1.3.1. Péptidos sintéticos en inmunodiagnóstico de EQ humana.....	17
1.4. HIPÓTESIS.....	19
1.5. OBJETIVOS.....	19
1.5.1. Objetivo general.....	19
1.5.2. Objetivos específicos.....	20

### CAPÍTULO 2.

#### MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Banco de sueros humanos (seroteca).....	21
2.1.1. Generación de la seroteca.....	21

2.1.2. Caracterización de la seroteca: Concentración proteica.....	22
2.1.3. Caracterización de la seroteca: Serología para EQ.....	22
2.2. Predicción del secretoma y transmembranoma parasitario.....	24
2.3. Identificación de Epítopes B Lineales.....	25
2.4. Identificación de Epítopes B Lineales Limpios.....	27
2.5. Péptidos sintéticos.....	29
2.6. Producción y purificación de AgB <sub>1</sub> recombinante eucariota.....	31
2.7. Inmunoensayos en formato ELISA.....	31
2.7.1. Protocolo general de ELISA.....	31
2.7.2 <i>Checkerboard</i> en formato ELISA.....	33
2.8. Modelado estructural.....	34
2.9. Análisis estadísticos.....	34

### **CAPÍTULO 3.**

#### ***Generación y caracterización de una seroteca útil para estudios de inmunodiagnóstico en EQ humana.***

Resultados y discusión.....	35
3.1. Descripción clínico-demográfica de la seroteca generada.....	36
3.2. Caracterización de la seroteca generada.....	38
3.2.1. Perfil proteico de la seroteca generada.....	38
3.2.1.1. Perfil proteico de la seroteca utilizando solo el subgrupo EQ con información clínica.....	41
3.2.2. Perfil serológico de la seroteca generada.....	44
3.2.2.1. Perfil serológico de la seroteca utilizando solo el subgrupo EQ con información clínica.....	45

3.3. Asociaciones entre datos clínicos y perfiles proteico-serológicos en la seroteca generada.....	47
3.3.1. Evaluación de la asociación proteico-serológica en la seroteca.....	47
3.3.2. Evaluación de la asociación clínico-serológica en el subgrupo EQ con información clínica.....	48

#### **CAPÍTULO 4.**

##### ***Predicción in silico del secretoma y transmembranoma de Echinococcus granulosus e identificación de péptidos en los mismos con potencial serodiagnóstico.***

Resultados y discusión.....	51
4.1. Predicción bioinformática del SM y TM de <i>E. granulosus</i> .....	52
4.1.1. Predicción bioinformática del SM parasitario.....	53
4.1.2. Predicción bioinformática del TM parasitario.....	54
4.2. Selección inmuno-informática de proteínas presentes en el SM y TM parasitario con potencial valor serodiagnóstico en EQ humana.....	55
4.2.1. Selección de proteínas altamente antigénicas.....	56
4.2.2. Selección de proteínas antigénicas capaces de ser presentadas en moléculas MHC-II humanas.....	57
4.3. Selección inmuno-informática de péptidos con potencial valor serodiagnóstico en EQ humana presentes en proteínas de interés del SM y TM parasitario.....	59

#### **CAPÍTULO 5.**

##### ***Evaluación del potencial serodiagnóstico de los péptidos sintéticos identificados a partir del SM y TM de E. granulosus.***

Resultados y discusión.....	67
5.1. Caracterización fisicoquímica de los péptidos sintéticos.....	68

5.1.1. Análisis de las propiedades fisicoquímicas de los péptidos sintéticos.....	68
5.1.2. Solubilización de los péptidos sintéticos.....	72
5.2. Estudio del valor serodiagnóstico de los péptidos sintéticos en EQ humana.....	76
5.2.1. <i>Screening</i> de los péptidos sintéticos mediante estrategia de <i>checkerboard</i> .....	76
5.3. Optimización del ELISA para los péptidos sintéticos seleccionados por <i>checkerboard</i> .....	82
5.3.1. Optimización del ELISA: Incubación de las muestras.....	83
5.3.2. Optimización del ELISA: Dilución de muestras.....	86
5.3.3. Optimización del ELISA: Revelado.....	88
5.4. Evaluación del desempeño diagnóstico de los péptidos sintéticos seleccionados.....	90

## CAPÍTULO 6.

### ***Péptidos derivados de antígenos comúnmente utilizados en serología para EQ: Identificación in silico y evaluación experimental de su valor inmunodiagnóstico.***

Resultados y discusión.....	92
6.1. Identificación <i>in silico</i> de péptidos con potencial valor serodiagnóstico derivados de los antígenos parasitarios Ag5 y AgB.....	94
6.2. Caracterización de los péptidos seleccionados derivados del Ag5 y AgB.....	97
6.2.1. Análisis de las propiedades fisicoquímicas de los péptidos seleccionados.....	98
6.2.2. Solubilización de los péptidos sintéticos derivados del Ag5 y AgB.....	100
6.3. Evaluación del valor serodiagnóstico de los péptidos sintéticos derivados del Ag5 y AgB.....	102
6.4. Estudio comparativo del desempeño serodiagnóstico del AgB <sub>1</sub> recombinante y de péptidos sintéticos derivados de su secuencia.....	105
6.4.1. Caracterización <i>in silico</i> de rAgB <sub>1</sub> y de los péptidos sintéticos derivados de su secuencia.....	106

6.4.2. Evaluación comparativa del valor inmunodiagnóstico de rAgB <sub>1</sub> y de los péptidos sintéticos derivados de su secuencia.....	110
6.4.2.1. Comparación del valor inmunodiagnóstico de rAgB <sub>1</sub> y de los péptidos sintéticos derivados de su secuencia: <i>Screening</i> mediante estrategia de <i>checkerboard</i> .....	110
6.4.2.2. Evaluación del desempeño diagnóstico de rAgB <sub>1</sub> y de los péptidos derivados de su secuencia.....	114

## **CAPÍTULO 7.**

<b>DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS.....</b>	<b>121</b>
--	------------

<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>143</b>
--------------------------	------------

## CAPÍTULO 1.

### 1. INTRODUCCIÓN.

Los helmintos son organismos pertenecientes al reino Animalia, comúnmente conocidos como gusanos. Son animales invertebrados de cuerpo alargado, sin extremidades, que presentan simetría bilateral y cuyo tamaño puede variar desde unas pocas décimas de milímetros hasta varios metros [Brusca & Brusca et al., 2003]. Los helmintos incluyen organismos de vida libre, así como organismos parásitos, que en su mayoría se encuentran muy bien adaptados a este tipo de vida y, como consecuencia de esta adaptación, presentan grandes diferencias morfológicas y fisiológicas con los organismos de vida libre.

Los helmintos parásitos tienen ciclos de vida complejos y son considerados endoparásitos, ya que generalmente sus estadios infectivos se alojan en órganos internos (principalmente hígado, intestino, estómago y/o pulmones) de diversas clases de animales; tanto vertebrados como invertebrados. Como grupo, los helmintos no constituyen un grupo monofilético, dado que comprenden distintos *phyla*. Por un lado, se encuentran los nematelmintos, conocidos también como nemátodos o gusanos redondos, y, por otro lado, están los platelmintos o gusanos planos. Dentro de estos últimos se encuentran dos grupos importantes de helmintos parásitos: los trematodos y los cestodos. Mientras que los trematodos se caracterizan por presentar cuerpos planos y alargados con ventosas, sistemas digestivos ramificados y ciclos de vida complejos con múltiples hospederos intermediarios, los cestodos tienen cuerpos segmentados en forma de cinta, carecen de sistema digestivo y sus ciclos de vida generalmente implican dos hospederos.

El grupo de patologías derivadas de la infección por helmintos parásitos forma parte de las denominadas Enfermedades Tropicales Desatendidas (ETDs) descritas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), las cuales se asocian principalmente con entornos empobrecidos, especialmente en ambientes calurosos y húmedos de los climas tropicales y subtropicales. La mayoría de las ETDs son enfermedades parasitarias transmitidas por insectos o de propagación mediante agua contaminada y/o suelo infestado por huevos de gusanos. 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 de por vida. 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 existen redes de saneamiento. El hecho de considerar a las ETDs en forma colectiva es también importante para los programas de control, ya que muchas personas sufren varias ETDs simultáneamente [WHO]. La lista actual de ETDs contiene 17 enfermedades distintas, siendo la equinococosis quística (EQ) o hidatidosis la de mayor prevalencia en Uruguay.

### 1.1. Equinococosis quística.

Las equinococosis son un grupo de infecciones zoonóticas causadas por el estadio larvario de cestodos pertenecientes al género *Echinococcus*. Dentro de estas, originalmente se consideraba a *E. granulosus* como el único agente causante de EQ, pero actualmente se reconocen otras especies dentro del mismo complejo genético (denominado *E. granulosus sensu lato*, s.l.) que causan la misma patología [Nakao et al., 2013]. Así, diferentes variantes génicas, o genotipos, de *E. granulosus* s.l. se han ido identificando, cada uno de ellos mostrando diferencias 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., 2005; Hüttner et al., 2008]. Las especies causantes de EQ se engloban dentro del complejo *E. granulosus* s.l., que incluye a *E. granulosus* s.s., *E. equinus*, *E. ortleppi* y *E. canadensis*. 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 [LyMBERG 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 poliquística por *E. vogeli* y *E. oligarthrus*. Hasta el momento, no se han reportado casos de equinococosis humana debida a infección por *E. equinus*, *E. shiquicus* o *E. felidis* [Álvarez-Rojas et al., 2014].

### 1.1.1. Ciclo de vida de *Echinococcus granulosus* s.l.

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 adulta del gusano en sus intestinos, y uno habitualmente herbívoro (por ejemplo: ovejas, cabras, vacas, caballos, etc.) que se comporta como hospedero intermediario albergando en sus vísceras el estadio larvario denominado metacestodo o quiste hidático (QH) [CDC, 2019].

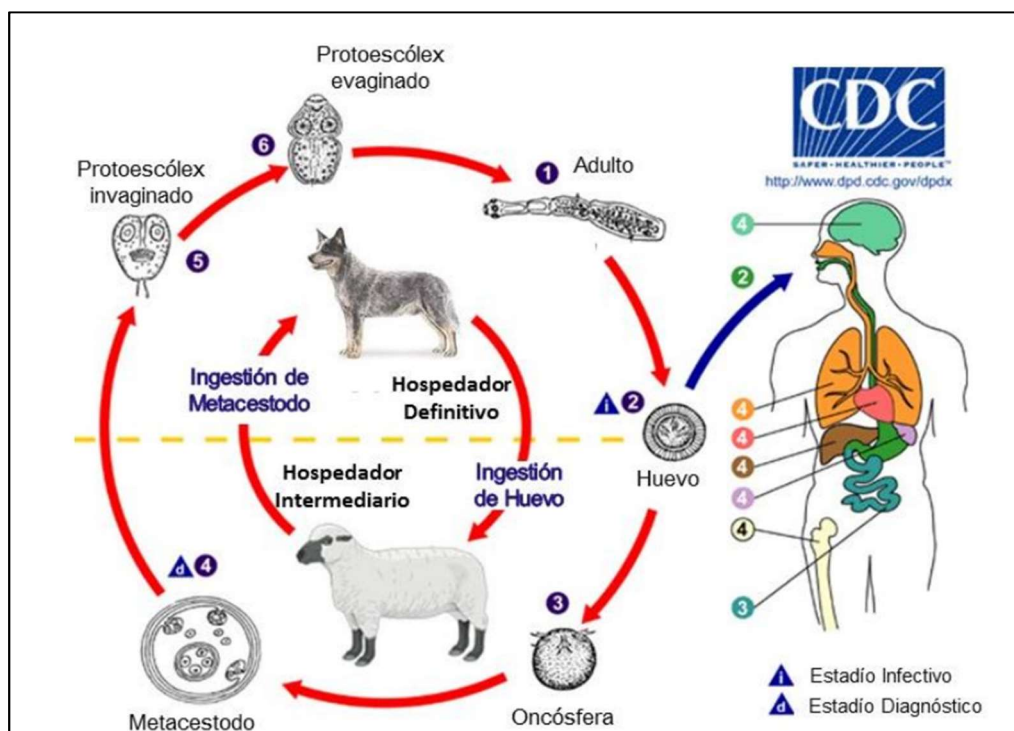
El hospedero definitivo puede estar infectado simultáneamente con cientos de gusanos adultos capaces de producir miles de huevos al día mediante reproducción sexual. El adulto de *E. granulosus* s.l. es hermafrodita y segmentado, donde cada segmento presenta órganos sexuales masculinos y femeninos. Estos huevos se liberan al medio externo con las heces del hospedero definitivo pasando así a ser el estadio infectivo para los hospederos intermediarios que los ingieran.

Una vez en el intestino del hospedero intermediario, el huevo eclosiona y libera al embrión (también conocido como oncósfera), que es capaz de atravesar la lámina propia intestinal para luego viajar por los vasos sanguíneos hasta alcanzar diversos órganos o tejidos; generalmente hígado y/o pulmón, pero también pueden ser riñones, bazo, cerebro, entre otros. Tras establecerse en ellos, la oncósfera puede dar origen al estadio larvario (metacestodo, hidátide o simplemente QH), que se desarrolla como una vesícula unilocular distendida conteniendo líquido (líquido hidático, LH).

En el interior de los QH, y mediante reproducción asexual de la membrana germinativa, se producen los protoescólices que son liberados al LH. En caso que las vísceras infectadas de un hospedero intermediario sean el alimento de un posible

hospedero definitivo, los protoscolecemas tienen la potencialidad de diferenciarse (cada uno de los miles que pueden coexistir en un mismo QH) en gusanos adultos intestinales; cerrándose así el ciclo de vida del parásito.

Cabe destacar que, si bien toda especie animal en la cual es naturalmente posible el establecimiento de metacestodos de *E. granulosus* s.l. puede considerarse como hospedero intermediario, si dicha especie no permite la continuidad del ciclo (como en el caso de los humanos), se la denomina hospedero intermediario accidental [Agudelo-Higuera et al., 2016].

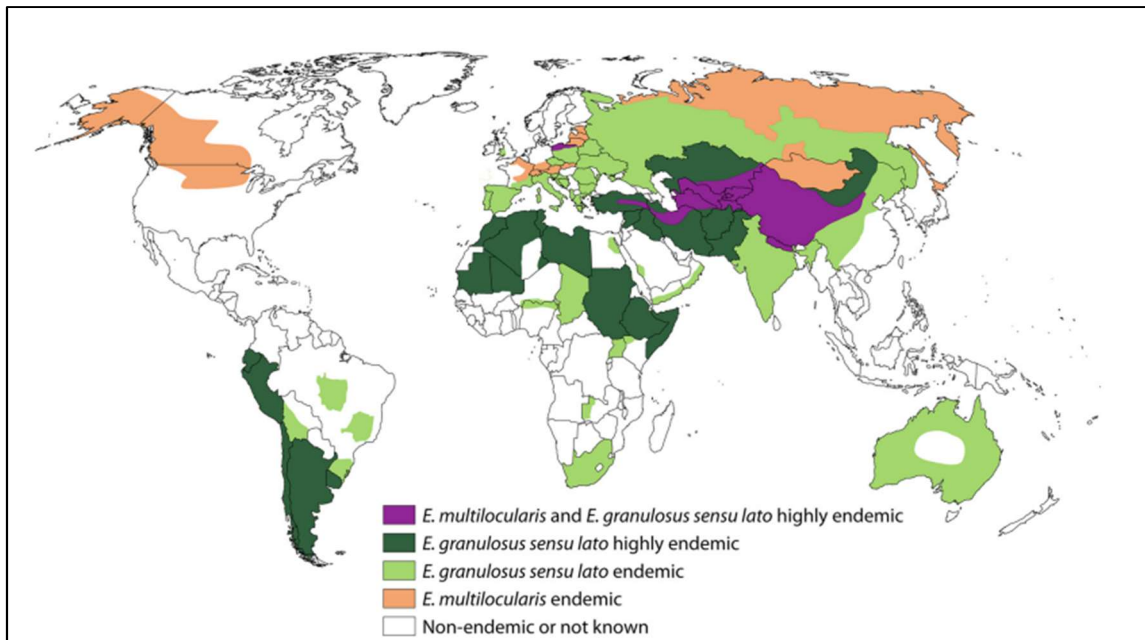


**Figura 1.1. Ciclo de vida de *Echinococcus granulosus* s.l.** La forma adulta (1) se establece en el intestino delgado de su hospedero definitivo y genera huevos embrionados que se liberan con las heces. El hospedero intermediario se infecta con estos huevos (2), la oncosfera eclosiona en sus intestinos (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 maduro y por reproducción asexual genera protoscolecemas, que son el estadio infeccioso para el hospedero definitivo (5) y (6). El hombre puede actuar como un hospedero intermediario accidental, interrumpiendo el ciclo de vida del parásito. Adaptado de [CDC, 2019].

### 1.1.2. *E. granulosus* s.l. y EQ: Distribución geográfica y epidemiología.

La EQ muestra una distribución cosmopolita, y representa un problema serio de salud pública en algunas regiones. Como se observa en la **Figura 1.2.**, la EQ es una zoonosis considerada endémica (y a veces hiper-endémica) en el cono sur de América del Sur, en la región mediterránea de Europa, en el área centro-este de Asia y en el este de África [Budke et al., 2006; Cucher et al., 2016]. El genotipo G1 de *E. granulosus* s.s. es el responsable de aproximadamente el 90% de los casos humanos de EQ, y se asocia al ciclo de transmisión perro-oveja. Por su parte, *E. canadensis* le sigue como especie responsable del mayor número de casos en humanos, representando los genotipos G6 y G7 el 7,3% y 3,7% de todas las infecciones a nivel mundial, respectivamente [Álvarez-Rojas et al., 2014].

A nivel epidemiológico, los valores de incidencia de EQ en humanos pueden superar los 50 cada 100.000 personas-año en áreas endémicas, y tasas de prevalencia tan altas como 5-10% se han reportado 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 un millón de *DALYs* (del inglés *Disability-Adjusted Life Years*), y de tres mil millones de dólares americanos en las industrias agropecuarias [Budke et al., 2006]. Claramente, estos datos hacen de la EQ un importante problema de salud pública, que se asocia a grandes pérdidas económicas principalmente en países de recursos medios-bajos.



**Figura 1.2. Distribución geográfica de *E. granulosus* s.l. y *E. multilocularis*.** A diferencia de *E. multilocularis*, el parásito *E. granulosus* s.l. se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial, con alta prevalencia en la zona mediterránea de Europa, en Asia (especialmente en Rusia y China), en la zona norte y este de África, y en la zona sur de América Latina. La imagen está basada en estudios epidemiológicos recientes [McManus et. 2012; Deplazes et al. 2017; Rossi et al. 2016; Romig et al., 2011].

### 1.1.3. Manifestaciones clínicas de la EQ en humanos.

El espectro de manifestaciones clínicas de la EQ en humanos es altamente heterogéneo, dependiendo de varias circunstancias particulares como, por ejemplo, cuál es el órgano afectado, cuál es la localización del QH dentro de dicho órgano, cuál es el tamaño y la integridad del QH, entre otras [Agudelo-Higueta et al., 2016]. Asimismo, la especie/genotipo del parásito infectante también se ha sugerido como un factor influyente en la presentación clínica de la EQ en humanos [Moro & Schantz, 2006; Sadjjadi et al., 2013].

La mayoría de los pacientes con EQ (40-80%) presentan un único QH que compromete principalmente a un único órgano. En este sentido, el hígado está afectado aproximadamente en el 70% de los casos, siendo el lóbulo derecho el sitio de preferencia para el establecimiento del QH. Los pulmones son el segundo órgano de mayor

preferencia para el parásito, afectando aproximadamente al 20% de los pacientes. Sin embargo, cabe destacar que los QH pueden localizarse prácticamente en cualquier órgano o estructura anatómica del cuerpo humano; por ejemplo: cavidades abdominales o pleurales, riñones, bazo, cerebro, ojos, ovarios, testículos, páncreas, etc. [Kern et al., 2017].

Los síntomas clínicos suelen aparecer cuando el QH aumenta más de 10 cm de diámetro en el hígado, o cuando más del 70 % del volumen del órgano es ocupado, resultando en compresión física y/o daño a los conductos biliares, las venas hepáticas, la vena porta y/o la arteria hepática. En cualquier órgano, la compresión de estructuras vitales puede ser sintomática, incluso en QH de tamaño pequeño y mediano. Los pacientes sintomáticos con QH hepáticos suelen presentar malestar en la parte superior del abdomen y falta de apetito, y la compresión de los conductos biliares puede provocar ictericia. El dolor torácico, la tos y/o la hemoptisis, pueden ser indicativos de QH en el pulmón, y su rotura hacia los bronquios, puede provocar la expulsión de material parasitario. Por otro lado, en pacientes con QH cerebrales se pueden observar variados síntomas neurológicos; ya sean signos de hipertensión intracraneal, epilepsia, todo tipo de parálisis, etc. En cualquier órgano, la rotura o fisura de un QH puede provocar fiebre, urticaria, eosinofilia e incluso *shock* anafiláctico. Por esto último, la punción de QH en pacientes con EQ ha sido contraindicada por mucho tiempo [Wen et al., 2019].

## 1.2. Diagnóstico de EQ en humanos.

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 QH 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 (QH con membranas internas separadas) y CE3b (QH con vesículas hijas íntegras), basándose principalmente en sus diferencias en perfiles metabólicos y de respuesta a los tratamientos no-quirúrgicos. En este sentido, los QH CE3a serían verdaderamente

“transicionales” ya que pueden ser tanto activos como inactivos, mientras que los QH CE3b son siempre activos.

La clasificación de Gharbi es particularmente ventajosa en casos de QH 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 QH inaccesibles a estudios por ultrasonido, se suelen utilizar otras técnicas imagenológicas, como la tomografía computarizada o la resonancia magnética [Brunetti et al., 2010].



**Figura 1.3. Clasificación estandarizada de quistes hidáticos según WHO-IWGE.** CE1, CE2 y CE3a corresponden a quistes activos, CE3b quistes transicionales, y CE4 y CE5 a quistes inactivos. Tomada de [Brunetti et al., 2016].

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].

Las metodologías de tamizaje primario desarrolladas hasta el momento incluyen enzimo-inmunoensayos (ELISA), hemaglutinación indirecta (HAI), aglutinación de látex mediada por anticuerpos, técnicas de inmunofluorescencia y ensayos de inmuno-electroforesis o inmunoblots (IB); siendo la metodología de ELISA la más utilizada. Estos métodos varían en su sensibilidad, y comparten como punto en común una baja especificidad, principalmente debido a una significativa tasa de reactividad cruzada con otras patologías infecciosas y no infecciosas.

En un análisis comparativo realizado para distintos ensayos existentes para EQ hepática se reportó que los valores más altos de sensibilidad pertenecieron a los formatos de ELISA e inmunocromatográficos, seguido de IB, siendo la HAI el formato que presenta los menores valores de sensibilidad [Tamarozzi et al., 2021]. Sin embargo, esta comparación presenta sus limitaciones ya que se utilizaron distintos paneles de suero para su evaluación. Cuando se comparan distintos formatos de trabajo con la misma seroteca de trabajo, se observa que el IB es el formato que presenta los mayores valores de sensibilidad, siendo los formatos de ELISA y HAI comparables entre sí [Vola A et al., 2019].

Los factores que afectan negativamente a los resultados serológicos son tanto técnicos como propios del paciente. Dentro de los factores técnicos se destaca la calidad de la preparación antigénica utilizada para detectar la presencia de anticuerpos específicos. Por su parte, dentro de las variables propias del paciente se destacan: el estadio, número y localización de QH, la presencia de complicaciones, y la infección con otra enfermedad parasitaria o no parasitaria. Así, se ha observado que, para los quistes en estadio activo, cuanto mayor es el tamaño del quiste, mayor es el valor de sensibilidad diagnóstica [Lissandrin et al., 2015]. Además, pacientes con QH hepáticos en estadios CE4 y CE5 suelen ser seronegativos en un alto porcentaje de casos (30-58%, 50-87%, respectivamente), mientras que las tasas de seronegatividad son menores en presencia de quistes en estadios CE1, CE2 y CE3 (5-20%) [Hernandez-Gonzalez et al., 2018; Han et al., 2019; Tamarozzi et al., 2016]. Por otra parte, mientras que el 80-95% de los pacientes con EQ hepática muestran resultados serológicos positivos (dependiendo del inmunoensayo utilizado), sólo el 55-70% de los pacientes con EQ pulmonar son seropositivos [Biava et al., 2001].

### **1.2.1. Antígenos utilizados en el serodiagnóstico de EQ en humanos.**

La gran mayoría de los métodos serológicos utilizados para el diagnóstico (o seguimiento) de EQ en humanos se basan en la detección de anticuerpos IgG específicos (o subclases de los mismos) contra antígenos de origen parasitario. Esta estrategia ha mostrado como principal desventaja bajos valores de sensibilidad y/o especificidad,

muchas veces debido a la fuente antigénica utilizada [Carmena et al., 2006]. Por ello, existe bastante literatura sobre el intento por mejorar ambos parámetros mediante el trabajo con antígenos nativos purificados, antígenos recombinantes, y más recientemente, péptidos derivados de los mismos.

Sin embargo, la caracterización y estandarización de los antígenos a utilizar con el fin de mejorar el desempeño diagnóstico de los inmunoensayos sigue siendo un problema en el diagnóstico de EQ en humanos. En este sentido, y dado que la amplia mayoría de los ensayos serológicos comerciales o caseros (*in-house*) utilizan LH, antígeno B (AgB) o antígeno 5 (Ag5), profundizaremos un poco en la utilidad diagnóstica de los mismos.

#### **1.2.1.1. Líquido hidático.**

El LH es una mezcla compleja de moléculas derivadas del parásito, principalmente producidas por la capa germinativa del QH. Algunos de sus componentes se han caracterizado como altamente inmunogénicos y capaces de alcanzar el medio interno del hospedero, desencadenando así fuertes respuestas de anticuerpos. Esta mezcla antigénica se utiliza en varias técnicas serológicas, por ejemplo, en ELISA, HAI e IB. En este sentido, ELISA y HAI normalmente se utilizan como pruebas de primera línea, mientras que IB suele usarse en estudios confirmatorios [Manzano-Román et al., 2015].

El uso de LH para la detección de anticuerpos específicos en pacientes con EQ presenta varias desventajas. En primer lugar, y una de las más importantes, es que un porcentaje importante de pacientes muestran resultados seronegativos. De hecho, estudios de sensibilidad para la detección de anticuerpos específicos para LH del isotipo IgG, han mostrado valores altamente variables (65-100%). En este sentido, las causas de resultados falsos negativos dependen de varios factores posibles, como ser la localización del QH [Kilimcioglu et al., 2013; Akisu et al., 2006], el estado metabólico del QH (quistes en estados activo/transicional favorecen la estimulación del sistema inmune y por tanto aumentan la capacidad de detección de anticuerpos específicos) [Wang et al., 2013; Tamarozzi et al., 2013; Schweiger et al., 2012], la aplicación de un tratamiento farmacológico prequirúrgico (la permeabilidad del quiste luego del tratamiento

farmacológico aumenta la capacidad de detección de anticuerpos específicos) [Tamarozzi et al., 2013; Hernández-González et al., 2012], el número y tamaño de QH [Hernández-González et al., 2012], y la fuente biológica para obtener el LH [Rahimi et al., 2011].

El segundo gran problema al utilizar LH como fuente antigénica en inmunoensayos es el alto porcentaje de resultados falsos positivos detectados. Por ejemplo, en ensayos de tipo ELISA donde se detectan anticuerpos específicos para LH, del isotipo IgG, la tasa de falsos positivos en donantes sanos ha mostrado variaciones importantes dependiendo de la zona geográfica a estudiar; asociada generalmente con la epidemiología de la enfermedad. Así, por ejemplo, se reportaron valores de especificidad del 88% entre donantes sanos de India, mientras que el mismo *kit* comercial enfrentado con una población de donantes sanos de Italia presentó valores de especificidad del 100% [Tamarozzi et al., 2013; Chirag et al., 2015]. En este sentido, las tasas de reactividad cruzada frente a otras parasitosis al utilizar LH suelen ser relativamente altas, por ejemplo, frente a equinococosis alveolar, cisticercosis, esquistosomiasis y/o fascioliasis [Zhang et al., 2012; Moro & Schantz, 2009]. Estos valores de reactividad cruzada pueden oscilar entre 34-43% cuando se comparan con sueros de otras parasitosis (esquistosomiasis y cisticercosis, entre otras), y aumentar a valores de 79-91% para sueros de pacientes con equinococosis alveolar [Kronenberg et al., 2022].

Por último, se ha reportado que el estudio de subclases de IgG específicas contra LH presenta ciertas ventajas, tanto en relación con la actividad metabólica del QH, como con la aparición de recidivas, y para el seguimiento postquirúrgico de la enfermedad. Así, se ha demostrado que la detección de anticuerpos específicos para LH tanto de las subclases IgG<sub>2</sub> como IgG<sub>4</sub> muestra buenas asociaciones con el estadio del QH, con la evolución de la enfermedad y con la presencia de recidivas [Benabid et al., 2013; Lawn et al., 2004; Celik et al., 2009]. Es interesante destacar que las respuestas de IgG<sub>4</sub> específicas para LH predominan en pacientes con QH categoría CE1, CE2 y CE3, mientras que las respuestas IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>3</sub> específicas para LH predominan en pacientes con QH categoría CE4 y CE5 [Carmena et al., 2006; Zhang et al., 2012]. Por último, si bien se han detectado otros isotipos de anticuerpos específicos para LH en pacientes con EQ (IgA, IgM e IgE), su valor diagnóstico no ha mostrado mejoras respecto de la detección de IgG específicas [Manzano-Román et al., 2015].

### 1.2.1.2. Antígeno B.

Con el objetivo de mejorar, al menos parcialmente, los problemas relacionados al uso de LH para la detección de anticuerpos específicos en pacientes con EQ, muchos investigadores han descrito el uso de antígenos derivados del mismo, tanto en forma nativa purificada como en forma recombinante, y, más recientemente, en forma de péptidos sintéticos derivados de sus secuencias aminoacídicas. Sobre esta última estrategia se profundizará más adelante.

Dentro de la lista de antígenos analizados presentes en LH, destaca el antígeno B (AgB) por haber sido estudiado en mayor profundidad. El AgB es una proteína polimérica de 120-160 KDa que -en condiciones reductoras- se disocia en subunidades de 8, 16 y 20-24 KDa. Sus funciones biológicas siguen generando cierto nivel de debate, ya que el espectro de actividades que se le han asignado es muy variado; por ejemplo, se le han atribuido características de inhibidor de proteasas, de inhibidor de la quimiotaxis de neutrófilos, de inductor de respuestas inmunes de tipo Th2 no-protectoras, de inductor de apoptosis en células del sistema inmune, de quelante de xenobióticos, entre otras [Díaz et al., 2016; Silva-Álvarez et al., 2015].

Las moléculas de AgB son codificadas por una familia multigénica que consta de al menos cinco grupos genéticos, denominados EgAgB<sub>1-5</sub>, y que comparten entre 44% y 81% de identidad entre sí a nivel de secuencia aminoacídica. A su vez, cada uno de estos genes presentan diferentes grados de polimorfismo entre sí, observándose para algunas isoformas (EgAgB<sub>3</sub>) una mayor cantidad de sitios polimórficos en relación a otras (EgAgB<sub>1</sub>) [Muzilin et al., 2008]. Esta variabilidad a nivel genético, se complejiza aún más con el hecho de que cada una de dichas isoformas presenta más de 90% de homología con sus ortólogos en *E. multilocularis* (EmAgB<sub>1-5</sub>), y aunque con menor homología, también se encuentran presentes en parásitos del género *Taenia*. Estos factores son responsables de la tasa relativamente alta de reactividad cruzada observada cuando se utiliza AgB -nativo o recombinante- en ensayos serológicos para el inmunodiagnóstico de EQ en humanos [Carmena et al., 2006].

Como se mencionó, el AgB ha sido utilizado tanto en forma nativa purificada a partir de LH, como en forma de proteína recombinante. En este sentido, el AgB nativo ha mostrado valores de sensibilidad diagnóstica que oscilan en el rango 54-100%

dependiendo del formato inmunodiagnóstico utilizado. Por ejemplo, su sensibilidad varía entre 60-85% en ensayos de tipo ELISA, mientras que en estrategias de IB ha mostrado valores de sensibilidad del 60-92% [Carmena et al., 2006]. Por ello, la utilidad en inmunodiagnóstico del AgB nativo purificado ha sido relativizada, ya que no muestra grandes diferencias respecto del uso de LH crudo. De hecho, al igual que lo que ocurre con este último, la fuente biológica de AgB purificado genera gran parte de la variabilidad observada en los valores de sensibilidad diagnóstica. Por ejemplo, se ha reportado que, para una misma cohorte de pacientes, la sensibilidad diagnóstica del AgB purificado a partir de distintas fuentes biológicas de LH varía, aproximadamente, desde un 82% hasta un 97% [Mohammadzadeh et al., 2012].

Por otro lado, y para minimizar la variabilidad de fuentes de purificación, se ha evaluado el uso de formas recombinantes de AgB (rAgB) en técnicas de inmunodiagnóstico; en particular dos isoformas han sido las más estudiadas hasta el momento: rAgB<sub>1</sub> y rAgB<sub>2</sub>. El uso de rAgB<sub>1</sub> ha mostrado valores de sensibilidad muy variables dependiendo del autor que se cite, pudiendo oscilar en el rango 55-84% [Carmena et al., 2006], así como en el rango 71-95% [Ito et al., 2014]. Este mismo fenómeno se observa para el rAgB<sub>2</sub>, donde la sensibilidad varía según el estudio realizado: 63% [Jiang et al., 2012] o 79% [Hernández-González et al., 2012]. A su vez, un estudio comparativo entre las dos subunidades recombinantes reveló que los valores de sensibilidad diagnóstica en pacientes con QH activos/transicionales fueron más altos para rAgB<sub>1</sub> (86-100%) que para rAgB<sub>2</sub> (71-93%); mientras que dichos valores en pacientes con QH inactivos fueron mayores para rAgB<sub>2</sub> (38-69%) que para rAgB<sub>1</sub> (11-42%) [Pagnozzi et al., 2018].

Por ello, y con el objetivo de mejorar los valores de sensibilidad diagnóstica, se han desarrollado distintas variantes de rAgB<sub>2</sub>. Una primera variante consistió en un repetido en *tándem* de la proteína recombinante original (denominado 2B2t) que, sin embargo, mostró valores de sensibilidad y especificidad diagnóstica similares a rAgB<sub>2</sub> (84% y 98%, respectivamente) [Hernández-González et al., 2012]. Otra variante analizada fusionó, de forma recombinante, el antígeno 2B2t con dos secuencias peptídicas (P1 y P5) derivadas de la secuencia aminoacídica de la proteína EPC1 presente en protoescolices de *E. granulosus* s.l., obteniendo buenos resultados en términos de sensibilidad y especificidad (89 y 96%, respectivamente) [Fathi et al., 2018]. Por último, se ha estudiado una variante recombinante formada por cinco secuencias peptídicas

obtenidas tras la predicción de epítopes B lineales en las secuencias de AgB<sub>1</sub> (n=1), AgB<sub>2</sub> (n=1) y Ag5 (n=3). Desafortunadamente, los resultados obtenidos, en términos de sensibilidad y especificidad (63% y 89%, respectivamente), siempre fueron menores que los obtenidos en comparación con el uso de un *kit* comercial basado en LH [Sanchez-Ovejero et al., 2020].

Por otro lado, aunque con menor frecuencia, también se ha evaluado la utilidad diagnóstica de otras isoformas de rAgB. Así, aunque el uso de rAgB<sub>3</sub> y rAgB<sub>5</sub> no ha mostrado mejoras en sensibilidad respecto de las demás subunidades [Jiang et al., 2012], rAgB<sub>4</sub> sería un candidato que merecería más estudio, ya que con su uso se han reportado valores de sensibilidad diagnóstica del 76-92% [Jiang et al., 2012; Kalantari et al., 2010]. Los valores de especificidad observados con las distintas subunidades de rAgB también han mostrado variaciones, aunque las principales reactividades cruzadas se han reportado con muestras de pacientes con equinococosis alveolar o cisticercosis, entre otras enfermedades de origen parasitario [Carmena et al., 2006].

### 1.2.1.3. Antígeno 5.

El Ag5 es otro de los principales antígenos utilizados en el inmunodiagnóstico de EQ en humanos [Carmena et al., 2007]. El mismo es una glicoproteína oligomérica termolábil de 400 kDa, que migra como bandas de 38 kDa y 22 kDa en condiciones reductoras y que está codificado por un único gen correspondiente a la familia de las serinproteasas (proteasas de Serina). Este gen comparte una identidad del 96,7% y 85,5% con secuencias ortólogas en *T. solium* y *E. multilocularis*, respectivamente. El Ag5 se asocia con el sistema de transporte vesicular parasitario, y se expresa tanto en huevos como en protoescólices de *E. granulosus* s.l.; estadios infectivos para humanos y cánidos, respectivamente [Diaz A et al. 2016].

La antigenicidad observada para Ag5 sugiere que dicha proteína llega a los tejidos del hospedero, y se relaciona principalmente con la subunidad de 38 kDa que contiene epítopes con fosfatidil-colina (PC); involucrados en la inducción de respuestas del tipo Th2-no protectoras para el hospedero [Diaz A et al. 2016].

Los distintos estudios realizados con Ag5 han presentado diversos resultados asociados a su desempeño inmunodiagnóstico. En uno de ellos, donde se utilizó Ag5 purificado como fuente antigénica, los valores de sensibilidad y especificidad diagnóstica fueron de 88,3% y 94,1%, respectivamente [Pagnozzi *et al.* 2015]. En dicho estudio, los autores atribuyeron los problemas de reactividad cruzada a la presencia de PC unida covalentemente a la subunidad de 38 kDa del Ag5.

Por otro lado, en otro estudio que también utilizó Ag5 purificado, se concluyó que el Ag5 sería inmunorreactivo durante todas las etapas de la patología, a diferencia del AgB cuyos anticuerpos específicos disminuyen en los estadios CE4 y CE5. A su vez, se observó que los pacientes con más de un QH y/o que recibieron terapia farmacológica, resultaron seropositivos para Ag5 con mayor frecuencia que para AgB [Ahn *et al.* (2015)].

Por último, el Ag5 también se ha evaluado en formato recombinante (rAg5), mostrando valores de sensibilidad diagnóstica (58-71%) que no superan los obtenidos mediante el uso de Ag5 nativo purificado [Sánchez-Ovejero *et al.*, 2020].

### **1.3. Uso de péptidos sintéticos en inmunodiagnóstico.**

El desarrollo y uso de péptidos sintéticos como antígenos para inmunodiagnóstico ha venido ganando popularidad ya que los mismos serían capaces de superar gran parte de las desventajas reportadas para los antígenos crudos, nativos purificados y/o recombinantes. Los péptidos sintéticos como antígenos para inmunodiagnóstico simulan/imitan epítopes B lineales, o conformacionales (mimótopos), presentes en proteínas antigénicas naturales, y de esta forma, por ejemplo, reducen los costos globales de producción al ser sintetizables de manera automatizada, no-biológica y a gran escala. Por otro lado, el uso de dichos péptidos en cuanto estructuras moleculares altamente definidas, minimizaría las posibles reacciones cruzadas que abundan en los inmunoensayos tradicionales, y mejoraría los problemas asociados con la reproducibilidad intra- e inter-ensayos [Gómara & Haro, 2007].

Por ello, los péptidos sintéticos han sido exitosamente evaluados para su uso inmunodiagnóstico en infecciones virales [Gauna *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2016; Wang *et*

al., 2015], bacterianas [Aguiar et al., 2016; Wang et al., 2016; Wang et al., 2020] y parasitarias [Guimaraes-Peixoto et al., 2016; Vengesai et al., 2023; Barreda et al., 2020; Meshgi et al., 2018; Mucci et al., 2017; Florez et al., 2017]. De hecho, actualmente existen a nivel comercial varios inmunoensayos que utilizan péptidos sintéticos como antígenos para el diagnóstico rutinario de enfermedades de origen viral (por ejemplo, Innostest HCV<sup>®</sup> para hepatitis C, Innogenetics-Bélgica), de origen bacteriano (por ejemplo, CTpELISA<sup>®</sup> para clamidiasis, Medac-Alemania) o de causas autoinmunes (por ejemplo, CCP3<sup>®</sup> para artritis reumatoide, InnovaDiagnostics-Suecia) [Gómara & Haro, 2007].

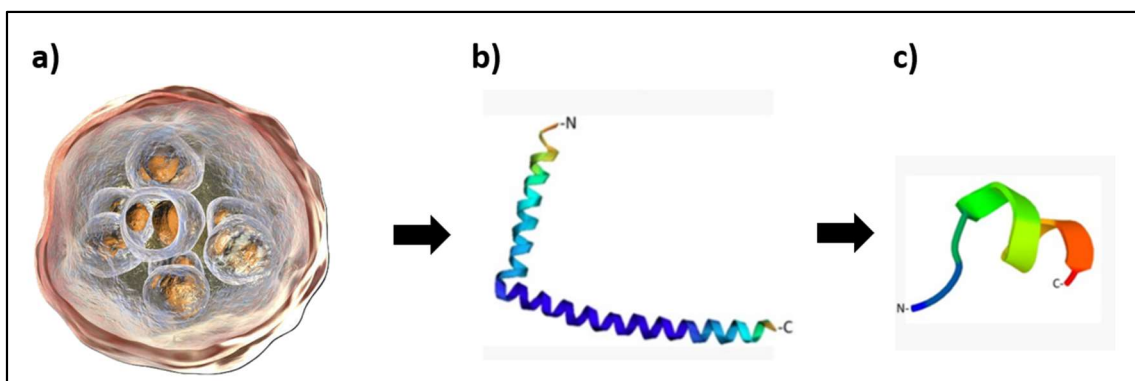
La selección de péptidos sintéticos capaces de actuar funcionalmente como miméticos de epítopes B es uno de los pasos más importantes para alcanzar el éxito deseado. En ese sentido, son numerosas y variadas las estrategias capaces de ser utilizadas, y desde una perspectiva de diseño racional pueden dividirse en dos grandes grupos: métodos experimentales y métodos computacionales. Actualmente, la disponibilidad de información sobre el genoma y/o el proteoma de diversos organismos patógenos, sumado al avance en el desarrollo de algoritmos de análisis bioinformático, han contribuido enormemente a la predicción *in silico* de antígenos con potencial valor en ensayos de inmunodiagnóstico [Sanchez-Trincado et al., 2017]. Las herramientas bio- e inmuno-informáticas reducen enormemente el tiempo y los costos asociados a la identificación de nuevos candidatos con potencial valor inmunodiagnóstico, y aunque aún no son perfectas, los avances y las mejoras que se suceden día a día sobre dichos algoritmos son por demás auspiciosos [Backert & Kohlbacher, 2015]. En este sentido, aunque la exactitud predictiva de varios algoritmos varía dependiendo de la complejidad de los datos en estudio, se ha demostrado que la combinación secuencial de distintas herramientas bioinformáticas mejora la capacidad predictiva. Por ejemplo, aunque la capacidad de predecir si una proteína será o no secretada utilizando un único *software* muestra valores medios de exactitud (63-82%), si se aplican algoritmos secuenciales esta exactitud puede verse significativamente mejorada (92-99%) [Min, 2010].

De lo anteriormente expuesto se desprende que en la actualidad no solo es importante la optimización de los algoritmos predictivos para la selección de péptidos con potencial valor inmunodiagnóstico, sino que, además, se debe trabajar en el desarrollo de nuevos flujos de trabajo bio- e inmuno-informáticos capaces de combinar dichos algoritmos en secuencias racionales. En este sentido, cabe destacar que nuestro grupo ha

publicado un flujo de trabajo novedoso para la predicción *in silico* de péptidos con potencial valor inmunodiagnóstico en infecciones humanas debidas a parásitos cestodos; sin discriminar entre los mismos [Miles et al., 2017]. En dicho trabajo, mediante el uso secuencial y racional de herramientas bioinformáticas se predijo el secretoma compartido entre los cestodos *E. granulosus* s.l., *E. multilocularis* y *T. solium*, y luego, se aplicaron sobre los componentes del mismo varios predictores immuno-informáticos que permitieron sugerir péptidos con potencial uso inmunodiagnóstico para cualquier de las tres infecciones [Miles et al., 2017]. Sin embargo, dicho trabajo no exploró el desempeño inmunodiagnóstico experimental de dichos péptidos, describiendo solamente las etapas *in silico* de la estrategia diseñada.

### 1.3.1. Péptidos sintéticos en inmunodiagnóstico de EQ humana.

Los antígenos utilizados en técnicas de inmunodiagnóstico para EQ humana, tal y como se mencionó previamente, suelen utilizar antígenos parasitarios crudos, nativos purificados y/o recombinantes; mientras que el uso de péptidos sintéticos derivados de los mismos aún se encuentra en etapas de desarrollo (Figura 1.4.).



**Figura 1.4. Distintos tipos de fuentes antigénicas útiles para inmunodiagnóstico de EQ.** En la imagen (a) se observa un quiste hidatídico, de donde se extrae la mezcla hidatídica que se utiliza en los kits comerciales disponibles (principalmente LH). La imagen (b) corresponde a la proteína AgB<sub>1</sub> recombinante, mientras que en la imagen (c) se diagrama un péptido sintético derivado de la secuencia AgB<sub>1</sub>.

En inmunodiagnóstico de EQ en humanos, son varios los trabajos donde se ha analizado el desempeño diagnóstico de péptidos sintéticos derivados de la secuencia primaria de antígenos de *E. granulosus* s.l., siguiendo criterios de selección variados. El desempeño diagnóstico de los péptidos ensayados hasta el momento ha mostrado un amplio rango de valores. Por ejemplo, la detección de anticuerpos IgG específicos para el péptido denominado GU4 (34 aminoácidos derivados de la secuencia de AgB<sub>2</sub>), si bien mostró excelentes valores de especificidad y reactividad cruzada (98% y 11%, respectivamente), presentó muy pobres valores de sensibilidad diagnóstica (18%) [Barbieri et al., 1998]. Por su parte, los resultados más promisorios obtenidos hasta el momento utilizando péptidos sintéticos en inmunodiagnóstico de EQ humana corresponden a la detección de anticuerpos IgG específicos para el péptido denominado p176 (38 aminoácidos correspondientes a la región N-terminal de AgB<sub>1</sub>), mostrando valores de sensibilidad del 80%, especificidad del 94% y reactividad cruzada del 9,3% [González-Sapienza et al., 2000]. De hecho, cuando p176 se evaluó en forma específica con pacientes que presentaban EQ pulmonar, un grupo particularmente dificultoso de diagnosticar mediante serología, su desempeño diagnóstico resultó ser muy bueno (sensibilidad: 79%, especificidad: 97%) [Santivañez et al., 2012].

En la actualidad se han desarrollado estrategias para el diseño de péptidos sintéticos que centran su trabajo de forma *in silico*, combinando distintas herramientas bio-inmuno-informáticas. Estas predicciones son realizadas tanto a nivel del proteoma completo del parásito, como partiendo de las principales proteínas parasitarias utilizadas en técnicas inmunodiagnósticas. Entre las estrategias que parten del proteoma parasitario completo, se encuentra la reportada por Batisti Biffignand y colaboradores, donde, tras la aplicación de un flujo de trabajo inmunoinformático que involucraba predicción de epítopes B lineales y modelado tridimensional de los mismos, entre otras, diseñaron y sintetizaron distintos péptidos que mostraron buenos valores de sensibilidad (70-84%) con moderados niveles de especificidad (60-90%) [Gherard Batisti Biffignand et al., 2023].

Por otra parte, entre las estrategias *in silico* que parten de las principales proteínas parasitarias utilizadas en inmunodiagnóstico de EQ, se encuentra la reportada por Chauhan y colaboradores, donde, partiendo de la secuencia aminoacídica de un conjunto diverso de proteínas de *E. granulosus* s.l. (AgB, Ag5, Hsp-80, Hsp-90, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y tetraspanina-1), aplicaron una estrategia de predicción de epítopes B y

T, entre otros, para sintetizar un panel de antígenos peptídicos [Chauhan et al., 2023]. Por su parte, una estrategia de trabajo similar fue reportada por Darabi y colaboradores, en la cual incluyeron la predicción de epítopes B derivados de distintas subunidades del AgB (AgB<sub>1</sub>, AgB<sub>2</sub> y AgB<sub>4</sub>) y de la proteína parasitaria EPC1 [Darabi et al., 2019]. Sin embargo, ambos reportes hicieron foco en la estrategia *in silico* sin realizar la validación experimental de los péptidos identificados.

#### 1.4. HIPÓTESIS.

Aunque existe evidencia previa sobre el uso de péptidos sintéticos como antígenos para inmunodiagnóstico de EQ en humanos, los péptidos ensayados hasta el momento han mostrado distintos niveles de éxito, y derivan básicamente de un único antígeno parasitario: el AgB. Asimismo, la estrategia de selección de dichos péptidos se ha basado principalmente en estudios de identidad/conservación de secuencia, sin la aplicación de otros parámetros. Por ello, planteamos como hipótesis de trabajo que la estrategia de selección de péptidos con potencial valor inmunodiagnóstico para EQ en humanos es clave para alcanzar resultados exitosos. Así, partimos de la concepción que el uso combinado y secuencial de herramientas bio-inmuno-informáticas sobre componentes parasitarios racionalmente seleccionados, permitirá ampliar el espectro de péptidos sintéticos a ensayar experimentalmente para evaluar su desempeño diagnóstico. De esta forma, se generarán condiciones más propicias para mejorar, a futuro, el desempeño de los métodos inmunodiagnósticos en EQ humana.

#### 1.5. OBJETIVOS.

**1.5.1. Objetivo general.** Identificar y seleccionar péptidos con potencial valor inmunodiagnóstico en EQ humana aplicando herramientas bio-inmuno-informáticas, y valorar su desempeño inmunodiagnóstico en ensayos con formato ELISA.

### **1.5.2. Objetivos específicos.**

- (1) Generar una seroteca de calidad para estudios de serodiagnóstico en EQ humana.
- (2) Predecir *in silico* el secretoma y transmembranoma de *E. granulosus* s.l. y a partir de ellos, identificar péptidos con potencial valor serodiagnóstico.
- (3) Estudiar experimentalmente el valor serodiagnóstico de péptidos sintéticos seleccionados del secretoma y transmembranoma de *E. granulosus* s.l.
- (4) Identificar *in silico* péptidos derivados de antígenos comúnmente utilizados en serología de EQ humana y analizar experimentalmente su valor serodiagnóstico.

## CAPÍTULO 2.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1. Banco de sueros humanos (seroteca)

##### 2.1.1. Generación de la seroteca

Originalmente se planeó trabajar con muestras humanas incluidas en serotecas preexistentes y disponibles en el Departamento de Parasitología y Micología de la Facultad de Medicina (Universidad de la República) y en el Laboratorio de Biología Molecular de Hidatidosis (Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica - Facultad de Medicina - Universidad de Buenos Aires, Argentina). Lamentablemente, y debido a las restricciones impuestas a la movilidad entre países por criterios sanitarios en el contexto de la pandemia por COVID-19 (momento crítico 2020-2021 inclusive), no se pudo acceder al banco de muestras de Buenos Aires (Argentina). Por ello, se debió ampliar el banco disponible localmente mediante colaboraciones nacionales. Así, se logró generar una seroteca compuesta por muestras de pacientes con EQ confirmada por cirugía (n=95), donantes de sangre sanos (n=96) y pacientes con otras parasitosis (n=95). Una vez en nuestro poder, las muestras se almacenaron en alícuotas a -80°C; y se extrajo y sistematizó la información demográfica y clínica disponible.

Las muestras de pacientes con EQ se obtuvieron de diversos lugares: (i) el Dr. Daniel Da Rosa (Departamento de Parasitología y Micología, Facultad de Medicina - UdelaR) contribuyó con 47 muestras, (ii) la Dra. Ana Hernández (Laboratorio de Inmunología, Facultad de Química/Ciencias - UdelaR) contribuyó con 43 muestras, y (iii) la Dra. Cecilia Sónora (Licenciatura en Laboratorio Clínico - EUTM - Facultad de Medicina, UdelaR) contribuyó con 5 muestras.

Por otro lado, los sueros de donantes de sangre sanos correspondieron a muestras cedidas por la Dra. Ana Ferreira (Laboratorio de Inmunología, Facultad de Química/Ciencias - UdelaR), las cuales se obtuvieron de un banco nacional de sangre para uso como controles negativos en diversos proyectos desarrollados en el marco de la pandemia por COVID-19.

Finalmente, las muestras de pacientes con otras parasitosis se obtuvieron de diversos lugares: (i) el Dr. Daniel Da Rosa (Departamento de Parasitología y Micología, Facultad de Medicina - UdelaR) contribuyó con 18 muestras, (ii) la Dra. Ana Hernández (Laboratorio de Inmunología, Facultad de Química/Ciencias - UdelaR) contribuyó con 68 muestras, y (iii) la Dra. Cecilia Sónora (Licenciatura en Laboratorio Clínico - EUTM - Facultad de Medicina, UdelaR) contribuyó con 9 muestras.

### **2.1.2. Caracterización de la seroteca: Concentración proteica**

La cuantificación de proteínas totales en las muestras se realizó mediante el ensayo colorimétrico del ácido bicinconínico, adaptado para el trabajo en placas de microtitulación (Micro BCA™ Protein Assayed Kit, #23235, Thermo Scientific).

El procedimiento se basó en sembrar 50 µL/pocillo de las muestras a analizar (estándar o muestras problema diluidas en PBS) en una placa de microtitulación de 96 pocillos en fondo plano (Deltalab, S.L.). A cada pocillo se le agregaron 50 µL de mezcla reactiva conteniendo 25 partes de solución A (buffer carbonato-tartrato alcalino), 24 partes de solución B (ácido bicinconínico) y 1 parte de solución C (solución de sulfato de cobre). Luego, se agitó la placa durante 1 min a 450 r.p.m., se incubó a 37°C en cámara húmeda por 2 h y se leyó la absorbancia a 560 nm.

Para generar la curva de calibración se utilizó una muestra de suero humano previamente cuantificada mediante el método de Biuret utilizando el analizador automático Atellica (CI 1900 System, Siemens), cuya concentración de proteínas totales fue igual a 69 mg/mL. La sensibilidad alcanzada en el ensayo colorimétrico del ácido bicinconínico fue de 3,9 µg/mL.

### **2.1.3. Caracterización de la seroteca: Serología para EQ**

Para la validación del desempeño diagnóstico de la seroteca generada, se utilizó el kit comercial *Hydatidosis ELISA IgG* (Vircell®, S.L.). El mismo se trata de una prueba inmunoenzimática indirecta (96 pocillos) utilizada para determinar la presencia en suero o plasma, de anticuerpos IgG humanos específicos contra antígenos del líquido hidático de *E. granulosus* s.l. En la **Tabla 2.1.** se detallan los componentes del kit comercial.

Brevemente, se sembró de forma individual en cada pocillo 5 µL de muestras, controles o suero *cut-off* (muestra utilizada para determinar el valor de corte de la técnica) diluidos en 100 µL de *Vircell Serum Diluent* y se incubó la placa durante 45 min a 37°C. Luego, se aspiró el contenido y se realizaron los lavados correspondientes con 300 µL/pocillo de *Vircell Wash Buffer* (5 lavados). A continuación, se añadieron 100 µL/pocillo de *Vircell IgG Conjugate* y se incubó la placa durante 30 min a 37 °C. Nuevamente, se aspiró el contenido y se realizó una segunda tanda de lavados con 300 µL/pocillo de *Vircell Wash Buffer* (5 lavados). Finalmente, se añadieron 100 µL/pocillo de *Vircell TMB Substrate* y se incubó la placa durante 20 min a temperatura ambiente y en oscuridad. La reacción enzimática se detuvo añadiendo 50 µL/pocillo de *Vircell Stop Reagent* y se valoró espectrofotométricamente a 450/620 nm.

El índice de anticuerpos específicos (IA) se estableció como:  $IA = (D.O. \text{ de la muestra problema} / \text{promedio D.O del suero } cut-off) \times 10$ ; y los IA obtenidos se interpretaron como: negativo (IA <9), indeterminado (IA = 9-11), y positivo (IA >11); en todos los casos siguiendo las instrucciones del fabricante.

**Tabla 2.1.** Componentes del kit de ELISA comercial *Vircell*<sup>®</sup>.

Nombre	Composición
<i>Vircell Hydatidosis Plate</i>	Placa de 96 pocillos sensibilizada con antígenos de líquido hidatídico de <i>E. granulosus</i> s.l.
<i>Vircell Serum Diluent</i>	Tampón fosfato con estabilizante de proteínas (neolone y bronidox), coloreado de azul.
<i>Vircell IgG Cut-off Control</i>	Suero <i>cut-off</i> con Neolone y Bronidox
<i>Vircell IgG Positive Control</i>	Suero control positivo con Neolone y Bronidox
<i>Vircell IgG Negative Control</i>	Suero control negativo con Neolone y Bronidox
<i>Vircell IgG Conjugate</i>	Dilución de globulinas anti-IgG humana conjugadas a peroxidasa, con Neolone y Bronidox, coloreada de naranja
<i>Vircell TMB Substrate</i>	Solución de sustrato con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y TMB
<i>Vircell Stop Reagent</i>	Solución de parada: ácido sulfúrico 0.5 M
<i>Vircell Wash Buffer</i>	Solución de lavado: tampón fosfato con Tween-20 y con Proclin 300.
<b>Abreviaturas:</b> IgG, Inmunoglobulina G. TMB, tetrametilbenzidina. M, Molar.	

## 2.2. Predicción del secretoma y transmembranoma parasitario

El proteoma de *E. granulosus* s.s. (Genotipo 1) se descargó desde [www.wormbase.org](http://www.wormbase.org) el 01/06/2019, y la predicción del secretoma (SM) y del transmembranoma (TM) parasitario teórico se realizó mediante un flujo de trabajo basado en reportes previos de nuestro grupo [Miles et al., 2017]. El mismo consistió en la aplicación combinada y secuencial de diversos *softwares on-line* de uso libre. En la **Tabla 2.2.** se reporta la versión utilizada de los mismos, la función del predictor, el umbral de positividad seleccionado y la dirección *web* de cada plataforma.

La predicción del SM teórico siguió el siguiente flujo de trabajo. Brevemente, el proteoma teórico parasitario completo se analizó en primer lugar con el *software TMHMM v2.0* [Krogh et al., 2001] para determinar la presencia de regiones transmembrana (RTMs). Valores  $>0,8$  indicaron la presencia de RTMs mientras que valores menores indicaron ausencia de las mismas. En este análisis, se seleccionaron las proteínas que no presentaron RTMs y las que presentaron una única RTM. Las proteínas con un sola RTM predicha se estudiaron adicionalmente con el *software Phobius* [Käll et al., 2004] a fin de identificar la presencia de péptido señal (PS). En dicho *software*, valores  $> 0,5$  indicaron la presencia de PS. Así, el conjunto de proteínas seleccionados, es decir, aquellas con ausencia de RTM y/o presencia de una única RTM con secuencia de PS, se analizaron luego con los *softwares SignalP v5.0* [Petersen et al., 2011] y *SecretomeP* [Bendtsen et al., 2004] para determinar la capacidad de su secreción por vía clásica y/o vía no-clásica, respectivamente. Los umbrales de positividad utilizados fueron 0,5 para *SignalP* y 0,6 para *SecretomeP*; y las proteínas que continuaron los análisis posteriores fueron aquellas con al menos un valor de *score* positivo en alguno de los predictores.

Finalmente, se realizó la predicción de tres posibles destinos de exportación subcelular: (i) ubicación mitocondrial con el *software TargetP v2.0* [Emanuelsson et al., 2000] aplicando un umbral de positividad  $> 0,6$ , (ii) ubicación en el retículo endoplásmico (RE) con el *software PS Scan* [de Castro et al., 2006] utilizando un umbral de positividad  $> 0,6$ , y (iii) anclaje a glicosilfosfatidilinositol (GPI) con el *software PredGPI* [Pierleoni et al., 2008] aplicando un umbral de positividad  $> 0,5$ . Las proteínas sin ninguna señal de exportación se seleccionaron y conformaron el SM parasitario predicho.

La predicción del TM teórico fue similar a la obtención del SM con algunas diferencias en la estrategia de selección. Brevemente, con el *software TMHMM v2.0*

[Krogh et al., 2001] se seleccionaron las proteínas que presentaron al menos una RTM, y aquellas proteínas con una única RTM se analizaron mediante el *software Phobius* [Käll et al., 2004], seleccionando aquellas que carecían de secuencia de PS. Así, sobre las proteínas con más de una RTM y aquellas con una única RTM sin secuencia de PS, el estudio continuó con la predicción e identificación de posibles sitios de exportación subcelular: *TargetP v2.0* [Emanuelsson et al., 2000] para mitocondria y *PS Scan* [de Castro et al. 2006] para RE. Las proteínas carentes de cualquier señal de exportación se seleccionaron y conformaron el TM parasitario predicho.

Tabla 2.2. <i>Softwares</i> utilizados en el flujo de trabajo para predecir el secretoma y transmembranoma parasitario.			
<i>Software y Versión</i>	<b>Función de predictor</b>	<b>Umbral</b>	<b>Dirección <i>web</i></b>
TMHMM v2.0	Cuantificación de RTM	0,8	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/">https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/</a>
Phobius	Presencia de PS	0,5	<a href="https://phobius.sbc.su.se/">https://phobius.sbc.su.se/</a>
Signal P v5.0	Secreción de proteínas por vía clásica	0,5	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/">https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/</a>
Secretome P v1.0	Secreción de proteínas por vía no clásica	0,6	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/services/SecretomeP-1.0/">https://services.healthtech.dtu.dk/services/SecretomeP-1.0/</a>
Target P v2.0	Localización subcelular de exportación mitocondrial	0,6	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/services/TargetP-2.0/">https://services.healthtech.dtu.dk/services/TargetP-2.0/</a>
PS Scan	Localización subcelular de exportación al RE	0,6	<a href="https://prosite.expasy.org/">https://prosite.expasy.org/</a>
Pred GPI	Localización subcelular de anclaje a GPI	0,5	<a href="https://busca.biocomp.unibo.it/">https://busca.biocomp.unibo.it/</a>
<i>Abreviaturas:</i> RTM, regiones transmembrana. PS, péptido señal. RE, retículo endoplásmico. GPI, glicosilfosfatidilinositol.			

### 2.3. **Identificación de Epítopes B Lineales**

A partir del SM y TM predicho para *E. granulosus* s.s. (Genotipo 1), se identificaron epítopes B lineales (EBL) en ciertas proteínas de interés para los objetivos

de la presente tesis. Para ello, se aplicó un flujo de trabajo basado en reportes previos de nuestro grupo [Miles et al., 2017], consistente en la aplicación combinada y secuencial de diversos *softwares on-line* de uso libre. En la **Tabla 2.3.** se reporta la versión utilizada de los mismos, la función del predictor, el umbral de positividad seleccionado y la dirección *web* de cada plataforma.

En primer lugar, se identificaron proteínas de alto interés inmunodiagnóstico en el SM y TM parasitario siguiendo un flujo de trabajo particular. Brevemente, se realizó en primer lugar un estudio de homología para todas las proteínas del SM y TM predicho mediante *BlastP* [Altschul, et al., 1990] contra cualquier proteína presente en la base de datos de NCBI, a excepción de aquellas pertenecientes a los filos nematodos y platelmintos (incluyendo este último las clases trematodos y cestodos). Así, se seleccionaron las proteínas con porcentajes de identidad < 25%. El estudio continuó con dos análisis de antigenicidad realizados de forma consecutiva utilizando los *softwares Vaxijen v2.0* primero [Doytchinova et al., 2008] y *Antigen-Pro* después [Magnan et al., 2010], seleccionando las proteínas que superaron el *score* de antigenicidad establecido en 0,5 para ambos predictores.

Luego, con estas proteínas altamente antigénicas, se realizó la predicción de su probabilidad de ser presentadas en moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) humanas utilizando el *software NetMHC-II v2.3* [Jensen et al., 2018]. En este análisis se estudiaron 54 moléculas de HLA presentes en la base de datos del *software* (20 para HLA-DQ, 25 para HLA-DR y 9 para HLA-DP), seleccionando las proteínas que superaron el umbral establecidos para un índice de unión < 2%: en más del 85% de las moléculas HLA (46 de 54) para las proteínas del SM, y en más del 90% (49 de 54) para las proteínas del TM.

Por último, sobre el subconjunto seleccionado de proteínas del SM y TM parasitario, se realizó el análisis de EBL utilizando el *software Bepipred v2.0* [Jespersen et al., 2017], aplicando un umbral de positividad > 0,5 y sumando como condición necesaria la presencia de al menos 7 aminoácidos consecutivos en la secuencia peptídica predicha como EBL.

En paralelo, se descargaron de la base de datos de NCBI las secuencias aminoacídicas disponibles correspondientes al Ag5 (EgrG\_000184900) y a las distintas subunidades del AgB de *E. granulosus* s.s. (Genotipo 1): AgB1 (EgrG\_000381200),

AgB2 (EgrG\_000381100), AgB3 (EgrG\_000381600), AgB4 (EgrG\_000381400), AgB5 (EgrG\_000381700), y Ag5 (EgrG\_000184900). Sobre las mismas, se realizó la predicción de EBL utilizando el *software* *Bepipred v2.0* [Jespersen et al., 2017], aplicando los mismos criterios previamente descritos.

Tabla 2.3. <i>Softwares</i> utilizados en el flujo de trabajo para identificar epítopes B lineales.			
<i>Software</i> y Versión	<b>Función de predictor</b>	<b>Umbral</b>	<b>Dirección <i>web</i></b>
BlastP	Alineamiento local de secuencias	25	<a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Vaxijen v2.0	Presencia de antígenos protectores	0,5	<a href="http://www.ddg-pharmfac.net/">http://www.ddg-pharmfac.net/</a>
Antigen-Pro	Presencia de antígenos protectores	0,5	<a href="https://scratch.proteomics.ics.uci.edu/">https://scratch.proteomics.ics.uci.edu/</a>
NetMHC-II v2.3	Unión de péptidos a moléculas de MHC-II	2	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetMHCII-2.3/">https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetMHCII-2.3/</a>
Bepipred v2.0	Presencia de EBL	0,5	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/services/BepiPred-2.0/">https://services.healthtech.dtu.dk/services/BepiPred-2.0/</a>
<i>Abreviaturas:</i> MHC-II, Moléculas de Histocompatibilidad de clase II. EBL, Epítopes B lineales.			

#### 2.4. **Identificación de Epítopes B Lineales Limpios**

A partir de los EBL seleccionados del subconjunto de proteínas de interés presentes en el SM y TM parasitario predicho, se identificaron aquellos EBL carentes de sitios potenciales para modificaciones postraduccionales (PTM). Estos EBL se consideraron como epítopes B lineales limpios (EBLL). Para ello, sobre las proteínas correspondientes a los EBL seleccionados se aplicó una amplia batería de *softwares* de uso libre *on-line* para predecir potenciales sitios de PTM. En la **Tabla 2.4.** se reporta la versión utilizada de los mismos, la función del predictor, el umbral de positividad seleccionado y la dirección *web* de cada plataforma.

De esta forma, se evaluaron sitios para potenciales glicosilaciones utilizando los *softwares* *Netglycate v1.0* [Johansen et al., 2006], *NetNglyc v1.0* [Gupta et al., 2002],

*NetOGlyc v4.0* [Steentoft et al., 2013], y *NetCglyc v1.0* [Julenius et al., 2007]. Además, diversas PTMs de tipo lipídico (S-farnesilación, N-miristoilación y S-geranilgeranilación) se evaluaron con el *software GPS-Lipid v1.0* [Xie et al., 2016], mientras que la posible palmitoilación se estudió con *CSS-Palm* [Ren et al., 2008]. Por otra parte, el estudio de acetilaciones se evaluó utilizando los *softwares NetAcet v1.0* [Kierner et al., 2005] y *GPS-PAIL v2.0* [Deng et al., 2016]. Finalmente, se estudiaron también los potenciales sitios para nitrosilación utilizando el *software GPS-SNO v1.0* [Xue et al., 2010], sulfatación con el *software GPS-TSP v1.0* [Pan et al., 2014], metilación con el *software GPS-MSP v1.0* [Chen, 2006], sumoilación con el *software GPS-SUMO* [Zhao et al., 2014] e identificación de substrato APC/C con el *software GPS-ARM* [Liu et al., 2012]. Una vez analizados los posibles sitios de PTM presentes, se identificaron los EBLL como aquellos EBL que no contuvieran ningún sitio potencial para ninguna de las PTM analizadas.

Por último, para los EBLL identificados se realizó un análisis de homología mediante *BlastP* [Altschul et al., 1990] contra todas las proteínas de la base de datos de NCBI, seleccionando aquellos EBLL cuyas secuencias no presentasen simultáneamente 100% de identidad aminoacídica y 100% de cobertura total con cualquier otro péptido/proteína por fuera de los fillos de nematodos y platelmintos.

**Tabla 2.4.** *Softwares* utilizados en el flujo de trabajo para identificar epítopes B lineales limpios.

<i>Software y Versión</i>	<b>Función de predictor</b>	<b>Umbral</b>	<b>Dirección web</b>
Netglycate v1.0	PTM: O-glicosilación	0,5	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetGlycate-1.0/">https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetGlycate-1.0/</a>
NetNglyc v1.0	PTM: N-glicosilación	0,5	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/">https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/</a>
NetOGlyc v4.0	PTM: O-GalNAc-glicosilación	0,5	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetOGlyc-4.0/">https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetOGlyc-4.0/</a>
NetCglyc v1.0	PTM: C-manosilación	0,5	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetCGlyc-1.0/">https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetCGlyc-1.0/</a>
GPS-Lipid v1.0	PTM: S-farnesilación PTM: N-miristoilación PTM: S-geranil-geranilación	M	<a href="http://lipid.biocuckoo.org/">http://lipid.biocuckoo.org/</a>
GPS-SNO v1.0	PTM: S-nitrosilación	M	<a href="http://sno.biocuckoo.org/">http://sno.biocuckoo.org/</a>
GPS-TSP v1.0	PTM: Tyr-sulfatación	M	<a href="http://tsp.biocuckoo.org/">http://tsp.biocuckoo.org/</a>
GPS-MSP v1.0	PTM: Metilación	A	<a href="https://msp.biocuckoo.org">https://msp.biocuckoo.org</a>
NetAcet v1.0	PTM: Acetilación N-terminal	0,5	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/">https://services.healthtech.dtu.dk/</a>
GPS-PAIL v2.0	PTM: Lys-acetilación	M	<a href="https://pail.biocuckoo.org">https://pail.biocuckoo.org</a>
CSS-Palm	PTM: Palmitoilación	M	<a href="http://gpspalm.biocuckoo.cn/">http://gpspalm.biocuckoo.cn/</a>
GPS-SUMO	PTM: Sumoilación	M/M	<a href="http://sumosp.biocuckoo.org">http://sumosp.biocuckoo.org</a> .
GPS-ARM	PTM: APC/C	A/B	<a href="http://arm.biocuckoo.org/">http://arm.biocuckoo.org/</a>

*Abreviaturas:* PTM, Modificación postraduccional. A, Alto. M, Medio. B, Bajo.

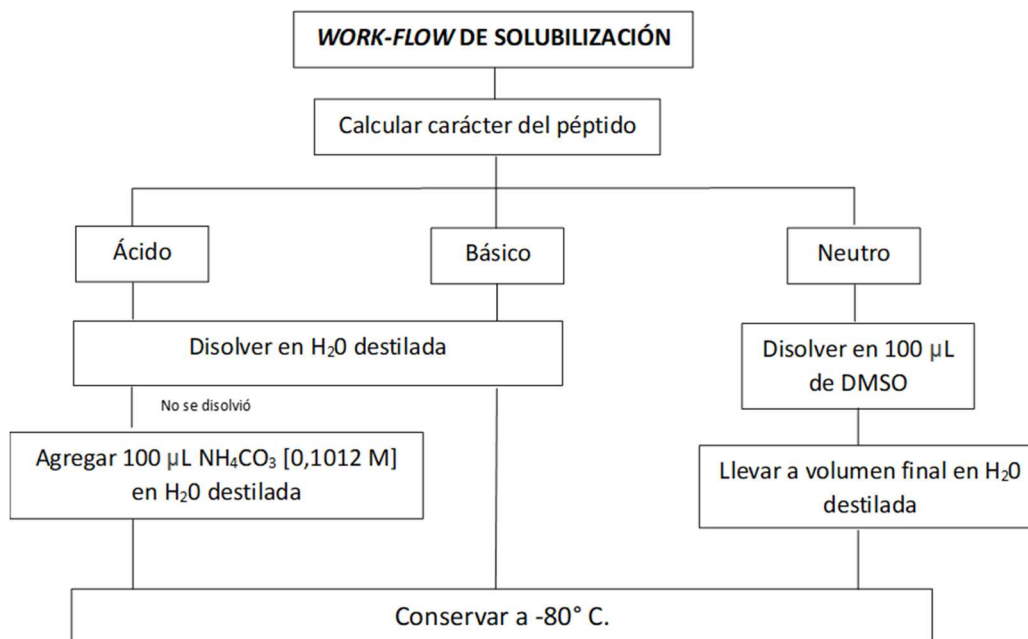
## 2.5. Péptidos sintéticos

Los péptidos correspondientes a las secuencias seleccionados, se adquirieron de manera comercial a la empresa Beijing SBS Genetech Co., Ltd (China); en todos los casos con una pureza >85%. Los péptidos arribaron en forma liofilizada, por lo que se solubilizaron de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas. En este sentido, aunque

existen guías generales para la solubilización de péptidos liofilizados, las mismas no son absolutas y, por lo tanto, se suele requerir de optimizaciones empíricas caso-a-caso.

En esta tesis, luego de varias pruebas, finalmente se logró aplicar una estrategia relativamente sencilla de solubilización (**Figura 2.1.**). Brevemente, y, en primer lugar, se calculó la naturaleza ácida-neutra-básica de cada péptido asignando una carga positiva por cada aminoácido D (ácido aspártico) y E (ácido glutámico) presente en el péptido, y una carga negativa por cada aminoácido R (arginina), K (lisina) y H (histidina). Cuando la sumatoria de cargas fue  $<0$  el péptido se consideró “ácido”, cuando fue igual a cero se lo consideró “neutro”, y cuando fue  $>1$  el péptido se consideró “básico”.

Luego, todos los péptidos con carácter “básico”, y gran parte de los “ácidos”, se reconstituyeron directamente en agua estéril apirógena a una concentración de 2 mg/mL. A aquellos péptidos de carácter “ácido” que no se solubilizaron directamente en agua, se les adicionó 100  $\mu$ L extra de una solución acuosa de  $\text{NH}_4\text{CO}_3$  100 mM. Por último, los péptidos con carácter “neutro” se reconstituyeron directamente en 100  $\mu$ L de dimetil-sulfóxido (DMSO), y luego se llevaron a la concentración deseada con agua estéril apirógena. En todos los casos, los péptidos solubilizados se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso, en alícuotas de 1,5-2,0 mg/mL.



**Figura 2.1.** Estrategia de solubilización de péptidos utilizada según el carácter calculado del péptido.

## 2.6. Producción y purificación de AgB<sub>1</sub> recombinante eucariota

El AgB<sub>1</sub> recombinante eucariota fue gentilmente cedido por la Dra. Ana María Ferreira (Laboratorio de Inmunología, Facultad de Química/Ciencias - UdelaR), y fue producido y purificado siguiendo un reporte reciente [Folle et al., 2024]. Brevemente, la secuencia EGR\_06805 correspondiente a la subunidad EgAgB8/1 (<https://parasite.wormbase.org>) se optimizó para su expresión en *Drosophila melanogaster* utilizando el *software* GenScript. Posteriormente, se diseñó una construcción conteniendo la secuencia optimizada flanqueada por secuencias compatibles para el uso de cebadores directos e inversos para la hibridación con el vector de expresión. Luego, se clonó en una versión modificada del vector pMT/BiP/V5-His, llamada pDroEx, y los productos de la digestión se transformaron luego en *Escherichia coli* XL1 competente. Los clones positivos se expandieron, los plásmidos (pDroEx-EgAgB8/1) se purificaron y se secuenciaron para su verificación.

A continuación, se generó una línea celular de *D. melanogaster* S2 transformada de forma estable que secreta EgAgB8/1. Para ello, se cultivaron células S2 y se transfectaron con el plásmido pDroEx-EgAgB8/1. Luego, se crecieron las células S2 transfectadas y se indujo la expresión de EgAgB8/1. Posteriormente, el sobrenadante se aclaró mediante centrifugación seguido de filtración y se fraccionó en una columna de afinidad. La fracción eluída se aplicó en una columna de inmovilización específica para EgAgB. Finalmente, se eluyó el rEgAgB8/1 y se mantuvo en alícuotas a -20°C en PBS suplementado con EDTA 5 mM, BHT 20 µM, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 0.1 mg/mL y anfotericina B 250 ng/mL [Folle et al., 2024].

## 2.7. Inmunoensayos en formato ELISA

### 2.7.1. Protocolo general de ELISA

La utilidad de los antígenos a analizar se evaluó mediante inmunoensayos de tipo ELISA siguiendo protocolos previamente reportados por nuestro grupo [Mourglia-Ettlin et al., 2018] con pequeñas modificaciones. En la **Tabla 2.5.** se detallan las soluciones utilizadas en los ensayos de ELISA realizados, y a continuación, se describe el protocolo

general desarrollado; el cual salvo que se indiquen modificaciones puntuales, se aplicó siempre de la misma manera.

Brevemente, a las placas de microtitulación de 96-pocillos (Nunc, Thermo Scientific) se les agregó 100  $\mu\text{L}$ /pocillo de solución sensibilizadora conteniendo una concentración conocida de antígeno, y se incubaron toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Luego, se descartó el contenido de las placas y se añadieron 200  $\mu\text{L}$ /pocillo de solución bloqueante, seguido de una incubación durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. A continuación, se descartó el contenido de las placas y se realizaron tres lavados con solución de lavado. Luego, se dispensaron 100  $\mu\text{L}$ /pocillo de las muestras diluidas en solución de incubación, y se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Nuevamente, se descartó el contenido de las placas y se realizaron cuatro lavados. Posteriormente, se adicionaron 100  $\mu\text{L}$ /pocillo de solución de conjugado y se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente.

Finalizada la etapa de incubación, se descartó el contenido de las placas y se realizaron cinco lavados. El desarrollo de color se realizó utilizando solución de revelado (100  $\mu\text{L}$ /pocillo) y una incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda protegida de la luz. Finalmente, la reacción enzimática se detuvo mediante la adición de 50  $\mu\text{L}$ /pocillo de solución STOP, y se realizó la lectura de absorbancia a 450 nm utilizando un espectrofotómetro para placas.

<b>Tabla 2.5.</b> Componentes generales de los ELISA realizados.	
<b>Solución</b>	<b>Composición</b>
Sensibilizadora	Buffer Carbonato/Bicarbonato de Sodio 100 mM pH 9.6
Bloqueante	BSA (Sigma-Aldrich, US) al 1% (m/v) en PBS 1X
Lavado	Tween-20 al 0.05 % (v/v) en PBS 1X
Incubación	BSA al 1% (m/v) + Tween-20 al 0.05 % (v/v) en PBS 1X.
Conjugado	Anticuerpo antihumano IgG Fc-HRP (Southern Biotechnology Associates, Inc.) con concentración 1/10.000 en solución de incubación
Revelado	Buffer Acetato: TMB: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
STOP	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1M
<i>Abreviaturas:</i> PBS, Suero fosfato salino. BSA, Albúmina sérica bovina. TMB, tetrametilbenzidina.	

### 2.7.2. Checkerboard en formato ELISA

Para identificar aquellos antígenos potencialmente útiles, se realizó un *screening* primario con cada uno de ellos, utilizando un *pool* de muestras de sueros provenientes de pacientes con EQ confirmada por cirugía y uno proveniente de donantes de sangre sanos. El mencionado *screening* siguió una estrategia de *checkerboard* en formato ELISA para detectar la presencia de anticuerpos específicos IgG totales (IgG<sub>T</sub>) o de la subclase 4 (IgG<sub>4</sub>), ensayando simultáneamente distintas concentraciones de antígenos en la sensibilización y diferentes diluciones de los *pools* de sueros (**Figura 2.2.**).

En la **Tabla 2.6.** se detallan los rangos de concentración de antígenos ensayados según cada caso. Las diluciones analizadas para los *pools* de sueros siempre estuvieron en el rango de 1/100 a 1/4.000. Aquellos antígenos que mostraron alguna combinación entre concentración de sensibilización y dilución de muestras que tuviese un cociente de absorbancias entre el *pool* de muestras positivas y el *pool* de muestras negativas >3, se consideraron inmunorreactivos y pasaron luego a diversas etapas de optimización y valoración.

Checkerboard														
		Pool de sueros negativos (1/dilución)						Pool de sueros positivos (1/dilución)						
		100	200	400	800	1600	3200	100	200	400	800	1600	3200	
Concentración de sensibilización (µg/ml)	50,00													A
	25,00													B
	12,50													C
	6,25													D
	3,13													E
	1,56													F
	0,78													G
	0,39													H
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

**Figura 2.2.** Ejemplo del diseño para una estrategia de checkerboard en formato ELISA.

**Tabla 2.6.** Rango de concentraciones ensayadas según antígeno y anticuerpo a detectar.

Antígeno	IgG <sub>T</sub>	IgG <sub>4</sub>
Péptidos de derivados de SM y TM	50.0 - 0.39 µg/mL	
Péptidos derivados de Ag5 y subunidades del AgB		
rAgB <sub>1</sub>	2.0 - 0.63 µg/mL	
p176 - pB1a - pB1b	20.0 - 0.63 µg/mL	

**Abreviaturas:** SM, Secretoma. TM, Transmembranoma. AgB, Antígeno B. Ag5, Antígeno 5. rAgB<sub>1</sub>, Antígeno B1 recombinante eucariota. IgG<sub>T</sub>, Inmunoglobulina G total. IgG<sub>4</sub>, Inmunoglobulina G subclase 4.

## 2.8. Modelado estructural

El modelado tridimensional de la estructura de péptidos y proteínas se realizó utilizando los softwares *PEPFold3* [Lambiabile et al., 2016] y *AlphaFold* [Jumper et al., 2021], respectivamente. En ambos casos se aplicaron los parámetros seleccionados por defecto. Estas actividades se realizaron en colaboración con el Dr. Sebastián Miles del Departamento de Desarrollo Biotecnológico (DDBT) del Instituto de Higiene (Facultad de Medicina, Universidad de la República).

## 2.9. Análisis estadísticos

A partir de los datos obtenidos se generaron estadísticas descriptivas para todas las medidas. Para los análisis de contingencia (asociación entre variables categóricas), se utilizó el test de Fisher, mientras que para el análisis de las variables continuas (diferencias entre grupos) se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (dada la distribución de las mismas). En todos los casos, valores de  $p > 0,05$  se consideraron significativos, utilizando el software *Graph Pad Prism 8* para realizar los análisis.

### **CAPÍTULO 3.**

#### ***Generación y caracterización de una seroteca útil para estudios de inmunodiagnóstico en EQ humana.***

##### **Resultados y discusión.**

A continuación, se presentan los principales resultados obtenidos en relación con la generación de una seroteca de calidad, útil para la realización de la presente tesis (Objetivo específico #1). En este sentido, se describen los distintos grupos conformados, detallando diversos análisis de asociación entre la información clínica recopilada y la caracterización proteica y serológica realizada a las muestras.

**Objetivo específico #1:** *Generar una seroteca de calidad para estudios de serodiagnóstico en hidatidosis humana.*

### **3.1. Descripción clínico-demográfica de la seroteca generada.**

Como se mencionó previamente en **2.1.1.**, las restricciones impuestas a la movilidad entre países por criterios sanitarios en el contexto de la pandemia por COVID-19 nos obligó a ampliar el banco de muestras disponible localmente, mediante diversas colaboraciones nacionales. Por un lado, las muestras de sueros correspondientes a pacientes con EQ y pacientes con otras parasitosis, fueron generosamente cedidas por el Dr. Daniel Da Rosa (Departamento de Parasitología y Micología, Facultad de Medicina, UdelaR), por la Dra. Ana Hernández (Cátedra de Inmunología, Facultad de Química/Ciencias, UdelaR), y por la Dra. Cecilia Sónora (Área Inmunología, Escuela Universitaria de Tecnología Médica, Facultad de Medicina, UdelaR). Por otro lado, los sueros de donantes de sangre sanos correspondieron a muestras gentilmente cedidas por la Dra. Ana María Ferreira (Cátedra de Inmunología, Facultad de Química/Ciencias, UdelaR).

De esta manera, la seroteca de trabajo final se compuso de 286 muestras de suero humano correspondientes a los siguientes tres grupos: 95 muestras de pacientes con EQ confirmada por cirugía (grupo EQ), 96 muestras de donantes de sangre sanos (grupo DS) y 95 muestras de pacientes con otro tipo de parasitosis (grupo OP.). En la Tabla **3.1.** se muestran los resultados de la información clínica recabados para los distintos grupos, observándose una importante disparidad en los mismos, debido, principalmente, a la heterogeneidad de las muestras en términos de fuente, origen y antigüedad.

En el grupo EQ se registró un total de 50 pacientes con algún tipo de información clínica; a saber: edad, sexo, localización del quiste, tratamiento farmacológico y/o tipo de técnica imagenológica utilizada durante el diagnóstico (**Tabla 3.1.**). En este sentido, se destaca que solo se contó con la edad y el sexo para el total de individuos con información clínica, a diferencia de los demás datos demográficos. Así, los 50 pacientes del grupo EQ con algún tipo de información clínica se distribuyeron casi equitativamente en 26 hombres y 24 mujeres, con medianas y rangos de edad muy similares entre sí; a saber: 42 (6-69) años y 46 (17-70) años, respectivamente.

El resto de datos demográficos, no solo fue imposible de recabar para todos los individuos del grupo, sino que la disponibilidad de los mismos no presentó asociaciones entre ellos (**Tabla 3.1.**). Por ejemplo: los individuos con información sobre la localización

del quiste no necesariamente correspondieron a los mismos para los cuales se obtuvo información sobre el tratamiento farmacológico.

Tabla 3.1. Información clínica de la seroteca generada						
	GRUPOS					
	CE <i>Pacientes con CE confirmada</i>		DS <i>Donantes sanos</i>		OP <i>Pacientes con otra parasitosis</i>	
N	Total = 95 Con información= 50		N	96	N	95
Hombres	Proporción	26/50	Sin información	Enfermedad parasitaria	Esquistomiasis (n=26) Enfermedad de chagas (n=23) Toxoplasmosis (n=15) Cisticercosis (n=11) Toxocariasis (n=9) Giardiasis (n=7) Fasciolasis (n=2) Oncocercosis (n=1) Malaria (n=1)	
	Edad (años.)	Mediana: 42 Rango: 6-69				
Mujeres	Proporción	24/50				
	Edad (años)	Mediana: 46 Rango: 17-70				
Localización del quiste	Hígado	16/50				
	Múltiples sitios	12/50				
	Óseo	8/50				
	Pulmonar	6/50				
	Otros	4/50				
	Sin información	4/50				
Tratamiento farmacológico		23/50				
Diagnóstico por técnica imagenológica		32/50				
Información: El grupo “Múltiples sitios” esta conformado por pacientes la siguiente ubicación de quiste: Hepático y pulmonar (n= 5), hepático y peritoneal (n=2), hepático y pleural (n=1), hepático y miembros inferiores (n=1), hepático y óseo (n=1), hepático y pélvico (n=1), coxofemoral y glúteo (n=1). El grupo “Otros” esta conformado por pacientes con la siguiente ubicación de quiste: Peritoneal (n=1), esplénico (n=1), muslo (n=1), mediastino (n=1).						

En este sentido, en relación a la localización anatómica de los quistes, 34 individuos presentaron quistes en un único órgano, 12 individuos lo hicieron en más de un sitio anatómico, y para 4 pacientes no se obtuvo información sobre la localización anatómica de los quistes. Por otro lado, para los pacientes con quistes ubicados en un único órgano, se observó la siguiente distribución: 16 pacientes con quistes hepáticos, 8 pacientes con quistes óseos, 6 pacientes con quistes pulmonares y 4 pacientes presentaron quistes localizados en otros sitios anatómicos (1 quiste peritoneal, 1 quiste esplénico, 1 quiste en muslo y 1 quiste en el mediastino). Por otra parte, para los 12 pacientes que presentaron quistes ubicados en más de un sitio anatómico, la combinación “hígado-pulmón” se observó en 5 pacientes, mientras que las combinaciones “hígado-otros sitios” se describió en 6 pacientes (siendo “otros sitios” el peritoneo, la pleura, los miembros

inferiores, los huesos o la pelvis). Finalmente, para un único paciente se observó la combinación coxofemoral-glúteo.

Por su parte, en relación al tratamiento farmacológico de los individuos, 23 pacientes fueron tratados con albendazol, mientras que no se obtuvo información para los 27 pacientes restantes. En este sentido, un comportamiento similar se observó para la técnica imagenológica utilizada durante el diagnóstico, ya que 32 pacientes fueron diagnosticados mediante alguna técnica imagenológica (ecografía, tomografía computarizada y/o resonancia magnética), mientras que para los 18 pacientes restantes no se pudo obtener información al respecto (**Tabla 3.1.**).

Por otro lado, mientras que para los individuos del grupo DS no se contó con información clínica, para los pacientes del grupo OP solo se contó con el dato clínico referido a la parasitosis cursada. Así, se destaca que 49 pacientes fueron parasitados por helmintos (cisticercosis, esquistosomiasis, fascioliasis, oncocercosis o toxocariasis), mientras que 46 pacientes estuvieron infectados por protozoarios (toxoplasmosis, enfermedad de Chagas, giardiasis o malaria) (**Tabla 3.1.**).

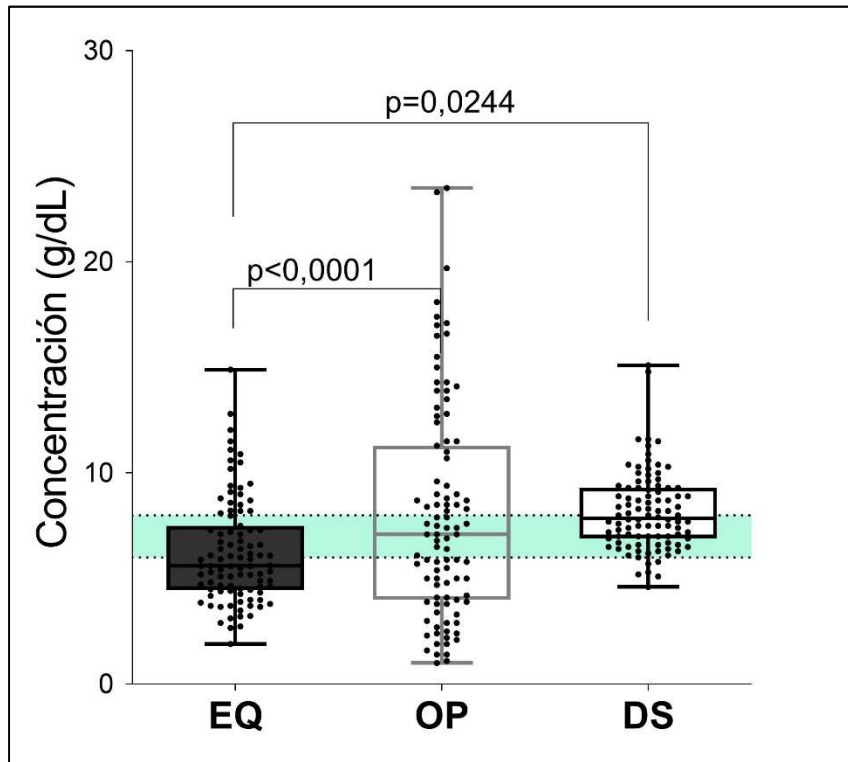
### **3.2. Caracterización de la seroteca generada.**

Como se mencionó previamente, la conformación de la seroteca de trabajo requirió del aporte de distintas fuentes y orígenes de muestras, lo que generó una heterogeneidad no deseada. Asimismo, las distintas fuentes se correspondieron con muestras de diferente antigüedad y forma de conservación (-20°C vs. -80°C). Por ello, para conocer la calidad de las muestras, se realizó en primer lugar una caracterización del contenido proteico de los sueros. Seguidamente, las muestras de la seroteca se caracterizaron a nivel serológico para conocer la utilidad de las mismas en estudios de inmunodiagnóstico para EQ humana.

#### **3.2.1. Perfil proteico de la seroteca generada.**

Para la caracterización proteica de la seroteca, las muestras se analizaron mediante el ensayo colorimétrico del ácido bicinconínico, adaptado para el trabajo en placas de microtitulación. En la **Figura 3.1.** se muestran, en formato de cajas-y-bigotes, los valores de proteinemia obtenidos para los distintos grupos que conformaron la seroteca. Los

resultados obtenidos mostraron que los valores de concentración proteica total en los individuos del grupo EQ fueron significativamente menores respecto a los del grupo DS (Kruskal-Wallis;  $p < 0,0001$ ) y a los del grupo OP (Kruskal-Wallis;  $p = 0,0244$ ).



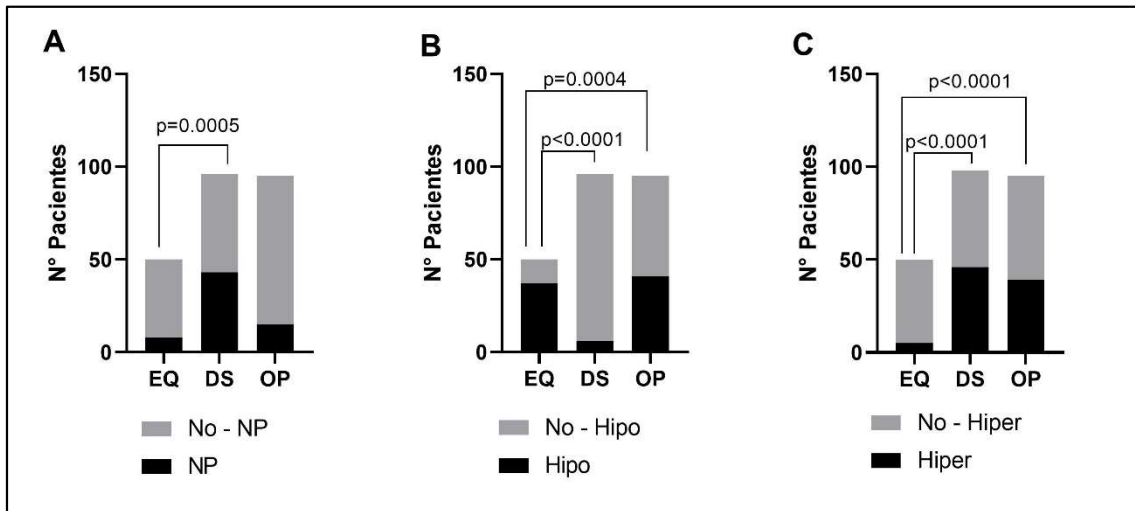
**Figura 3.1. Caracterización proteica de los grupos que conforman la seroteca.** En el gráfico de cajas y bigotes se observa la distribución de la proteinemia (g/dL) para los distintos grupos y la banda de normalidad (6,0-8,0 g/dL).

Los valores de significativamente menores de proteinemia observados en el grupo EQ podrían deberse tanto a efectos particulares de la EQ sobre la proteinemia del paciente, principalmente en aquellos con quistes hepáticos, y/o a distribuciones no-aleatorias de individuos, debido a diferencias en la conservación de las muestras de pacientes hiperproteicos/hipoproteicos en los grupos de trabajo conformados. Por ello, y trabajando con el rango de valores normales de proteinemia 6,0-8,0 g/dL establecido según el suero patrón, se clasificaron todos los sueros en “normoproteicos” (NP) y “no normoproteicos” (no-NP) según sus valores de concentración proteica respecto del rango de normalidad. En este sentido, la proporción de sueros NP sobre el total fue de 21/95 en el grupo EQ, 43/96 en el grupo DS y 15/95 en el grupo OP. Asimismo, la proporción de sueros hipoproteicos sobre el total fue de 52/95 en el grupo EQ, 6/96 en el grupo DS y

41/95 en el grupo OP. Por último, la proporción de suero hiperproteicos sobre el total fue de 22/95 en el grupo EQ, 47/96 en el grupo DS y 39/95 en el grupo OP.

A continuación, para evaluar si los bajos valores de proteinemia observados en el grupo EQ se debía a una menor proporción de individuos NP, a una mayor proporción de individuos hipoproteicos, y/o a una menor cantidad de individuos hiperproteicos, se comparó la distribución de los tres grupos de individuos (NP, hipoproteicos e hiperproteicos) en los grupos DS y OP respecto al grupo EQ. Como se muestra en la **Figura 3.2**, los bajos valores de proteinemia presentes en el grupo EQ en relación al grupo DS se relacionó con: (i) una menor proporción de individuos NP (**Figura 3.2a**), (ii) una mayor proporción de individuos hipoproteicos (**Figura 3.2b**), y (iii) una menor proporción de individuos hiperproteicos (**Figura 3.2c**). Por otro lado, los bajos valores de proteinemia presentes en el grupo EQ en relación al grupo OP se relacionó únicamente con una menor proporción de individuos hiperproteicos en el grupo EQ (**Figura 3.2c**).

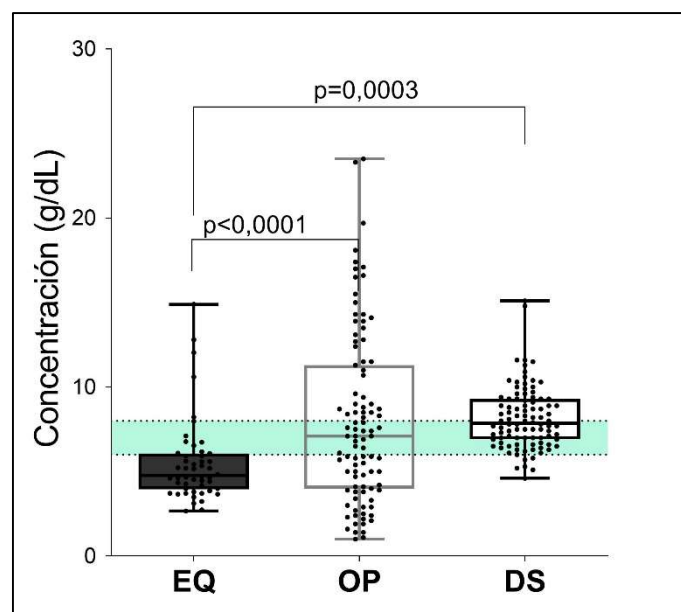
Por lo tanto, los bajos valores de proteinemia observados en el grupo EQ en relación al grupo DS se debió a la combinación de una menor proporción de individuos NP e hiperproteicos y a una mayor relación de individuos hipoproteicos; mientras que respecto al grupo OP, se debió solamente a una menor proporción de individuos hiperproteicos. Lamentablemente, no podemos extraer mayores conclusiones sobre estas diferencias no aleatorias observadas ya que las mismas podrían deberse tanto a efectos particulares de la EQ sobre la proteinemia del paciente, como a diferencias en el estado de conservación de las muestras de pacientes hiperproteicos/hipoproteicos.



**Figura 3.2.** *Análisis de contingencia para la distribución en la concentración proteica de los individuos que conforman la seroteca. En los gráficos se observa la proporción proteica para los individuos de los distintos grupos en relación al grupo EQ. En el gráfico (a) se comparó la proporción de individuos normoproteicos (NP) vs No-Normoproteicos (No-NP), en el gráfico (b) la proporción de individuos Hipoproteicos (Hipo) vs No hipoproteicos (No-Hipo) y en el gráfico (c) la proporción de individuos Hiperproteicos (Hiper) vs No hiperproteicos (No-Hiper).*

### 3.2.1.1. Perfil proteico de la seroteca utilizando solo el subgrupo EQ con información clínica.

Como se mencionó previamente, solo 50 muestras pertenecientes al grupo EQ correspondieron a pacientes con algún tipo de información clínica disponible. Por ello, y para concluir sobre la validez de utilizar el grupo EQ completo o solo dicho subgrupo, se realizó nuevamente el análisis del perfil proteico, pero solo utilizando las 50 muestras de este subconjunto. En la **Figura 3.3.** se muestran, en formato de cajas-y-bigotes, los valores de proteinemia obtenidos para el grupo de pacientes EQ con algún tipo de información clínica y los otros dos grupos que conformaron la seroteca (DS y OP). Los resultados obtenidos mostraron, nuevamente, que los valores de concentración proteica total en el subconjunto de individuos EQ fueron significativamente menores tanto respecto del grupo DS (Kruskal-Wallis;  $p < 0,0001$ ) como del grupo OP (Kruskal-Wallis;  $p = 0,0003$ ).

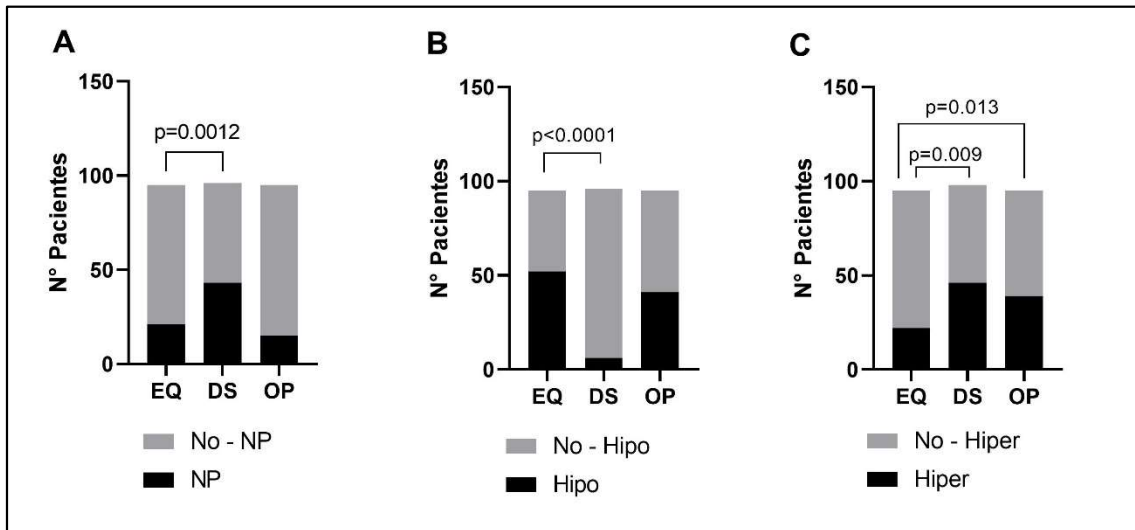


**Figura 3.3.** Caracterización proteica de los grupos que conforman la seroteca utilizando para el grupo de EQ los pacientes que presentan información clínica. En el gráfico de cajas y bigotes se observa la distribución de la proteinemia (g/dL) para los distintos grupos y la banda de normalidad (6,0-8,0 g/dL).

También se realizó la clasificación de todos los sueros en “normoproteicos” (NP), hipoproteicos e hiperproteicos según si su concentración proteica total caía dentro del rango de normalidad, por debajo o por encima, respectivamente. La clasificación determinó que la proporción de sueros NP sobre el total fue de 8/50 en el grupo EQ con algún tipo de información clínica, 43/96 en el grupo DS y 15/95 en el grupo OP. Asimismo, la proporción de sueros hipoproteicos sobre el total fue de 37/50 en el subgrupo de pacientes con EQ, 6/96 en el grupo DS y 41/95 en el grupo OP. Por último, la proporción de suero hiperproteicos sobre el total fue de 5/50 en el subgrupo EQ, 47/96 en el grupo DS y 39/95 en el grupo OP.

A continuación, y de manera análoga a lo realizado con el total de pacientes con EQ, se comparó la distribución de individuos NP, hipoproteicos e hiperproteicos en los grupos DS y OP respecto al grupo EQ con algún tipo de información clínica. Como se muestra en la **Figura 3.4**, los bajos valores de proteinemia en el subgrupo de individuos EQ en relación al grupo DS se relacionó, nuevamente, con: (i) una menor proporción de individuos NP (**Figura 3.4a**), (ii) una mayor proporción de individuos hipoproteicos (**Figura 3.4b**), y (iii) una menor proporción de individuos hiperproteicos (**Figura 3.4c**). Por su parte, los bajos valores de proteinemia en el subgrupo de individuos EQ en relación

al grupo OP se relacionó tanto con una mayor proporción de individuos hipoproteicos como con una menor proporción de individuos hiperproteicos en el subgrupo EQ (**Figura 3.4c**).



**Figura 3.4. Análisis de contingencia para la distribución en la concentración proteica de los individuos que conforman la seroteca.** En los gráficos se observa la proporción proteica de los individuos de los distintos grupos en relación al grupo EQ con información clínica. En el gráfico (a) se comparó la cantidad de individuos normoproteicos (NP) vs No-Normoproteicos (No-NP), en el gráfico (b) la proporción de individuos Hipoproteicos (Hipo) vs No hipoproteicos (No-Hipo) y en el gráfico (c) la proporción de individuos Hiperproteicos (Hiper) vs No hiperproteicos (No-Hiper).

Por lo tanto, la menor concentración proteica total observada en las muestras de suero del subgrupo de pacientes con EQ con algún tipo de información clínica, en relación al grupo DS se debió a las mismas causas que para el grupo completo de EQ; mientras que en relación al grupo OP, se mantuvo lo observado (menor proporción de individuos hiperproteicos), pero también se observó una mayor proporción de individuos hipoproteicos en el subgrupo EQ. En este sentido, si bien no podemos extraer mayores conclusiones sobre estas diferencias no aleatorias observadas, resulta claro que el subgrupo de pacientes EQ con algún tipo de información clínica se comporta de manera muy similar al total de individuos con EQ (con o sin información clínica).

### 3.2.2. Perfil serológico de la seroteca generada.

La caracterización serológica de los sueros que formaron parte de la seroteca en estudio se realizó mediante el uso del *kit* comercial *Hydatidosis ELISA IgG* (Vircell<sup>®</sup>, España). El mismo consiste en una prueba inmunoenzimática indirecta utilizada para determinar la presencia, en suero o plasma, de anticuerpos IgG humanos específicos para antígenos de *E. granulosus* s.l. presentes en el líquido hidático parasitario.

Luego de analizar todas las muestras mediante el *kit* Vircell<sup>®</sup>, se calcularon diversos valores que permitieron determinar distintos parámetros diagnósticos; a saber: verdaderos positivos (número de sueros del grupo EQ con resultado seropositivo, VP), falsos negativos (número de sueros del grupo EQ con resultado seronegativo, FN), falsos positivos (número de sueros del grupo DS con resultado seropositivo, FP), verdaderos negativos (número de sueros del grupo DS con resultado seronegativo, VN), y reactividad contra otras parasitosis (número de sueros del grupo OP con resultado seropositivo, ROP). Una vez determinados dichos valores, se procedió a calcular diversos parámetros diagnósticos de utilidad; a saber: sensibilidad (Se), especificidad (Esp), eficiencia diagnóstica (ED), reactividad cruzada (RC), y grado de indeterminación (Ind). Las fórmulas utilizadas para realizar dichos cálculos fueron:

$$Se (\%) = 100 * [VP / (VP + FN)]$$

$$Esp (\%) = 100 * [VN / (VN + FP)]$$

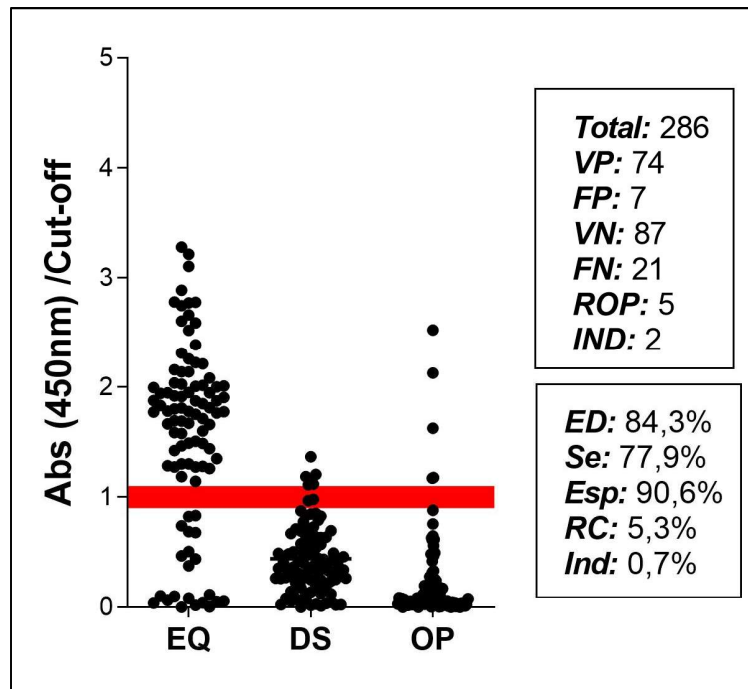
$$ED (\%) = 100 * [(VP + VN) / (VP + VN + FP + FN)]$$

$$RC (\%) = 100 * (ROP / \text{total de sueros OP})$$

$$Ind (\%) = 100 * (\text{sueros indeterminados} / \text{total de sueros})$$

Así, tal y como se muestra en la **Figura 3.5.**, para la seroteca completa compuesta por 286 muestras, los valores obtenidos fueron: VP=74, FP=7, VN=87, FN=21, ROP=5, y 2 sueros indeterminados. Si bien los sueros con resultados indeterminados correspondieron al grupo DS, cabe aclarar que las muestras del grupo EQ no presentaron resultados indeterminados dado que, aquellas que inicialmente lo fueron, se ensayaron por segunda vez, resolviendo así la indeterminación. Por lo tanto, los valores de Ind podrían estar subestimados.

Finalmente, los parámetros diagnósticos calculados fueron: ED=84,3%, Se=77,9%, Esp=90,6%, RC=5,3% e Ind=0,7%; en línea con los valores reportados por el fabricante del *kit* Vircell® (Se=97%, Esp=96%). Estos datos sugirieron entonces, que la seroteca conformada sería útil para utilizar en el desarrollo de nuevas estrategias de inmunodiagnóstico para EQ humana.



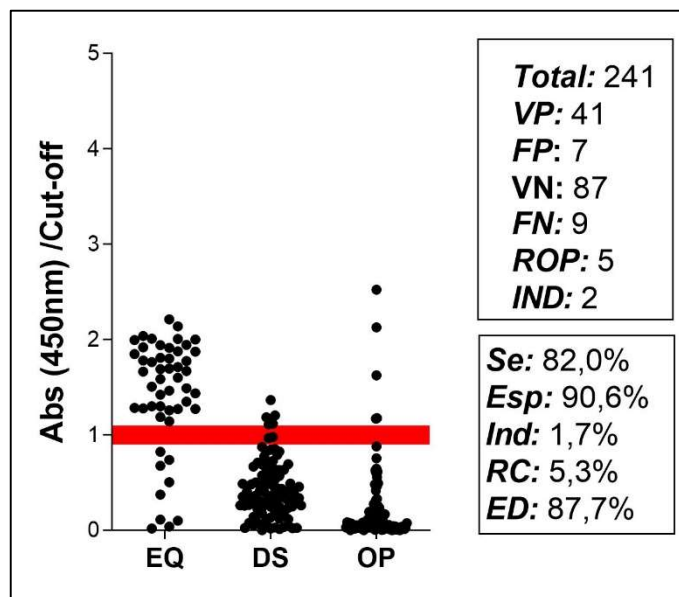
**Figura 3.5. Caracterización serológica de la seroteca completa.** En el gráfico se observa la distribución de los resultados del *kit* Vircell® (Se=97%, Esp=96%), el cual utiliza líquido hidatídico (LH) como fuente antigénica y detecta IgG<sub>T</sub> según cada grupo de trabajo (EQ, DS y OP). La línea roja representa la zona de indeterminación. En el cuadro central se resumen los resultados obtenidos (VP = verdaderos positivos, FP = falsos positivos, VN = verdaderos negativos, FN = falsos negativos, ROP = reactividad de otras parasitosis, IND = indeterminados), mientras que en el cuadro de la derecha se detallan los parámetros diagnósticos calculados (ED = eficiencia diagnóstica, Se = sensibilidad, Esp = especificidad, RC = reactividad cruzada, Ind = indeterminación).

### 3.2.2.1. Perfil serológico de la seroteca utilizando solo el subgrupo EQ con información clínica.

Como se mencionó previamente, solo una fracción de las muestras pertenecientes al grupo EQ correspondieron a pacientes con algún tipo de información clínica disponible. Por ello, de manera análoga a como se procedió con el perfil proteico, y para concluir

sobre la validez de utilizar el grupo EQ completo o solo el subgrupo con algún tipo de información clínica, se procedió a reanalizar el perfil serológico utilizando solo este subgrupo.

Así, el grupo EQ pasaría a estar formado por 50 muestras, haciendo que el total de la seroteca fuese de 241 sueros (**Figura 3.6**). De esta manera, los valores diagnósticos observados pasarían a ser: VP=41, FP=7, VN=87, FN=9, ROP=5 y 2 sueros indeterminados. Por consiguiente, los parámetros diagnósticos calculados correspondientes fueron: ED=87,7%, Se=82,0%, Esp=90,6%, RC=5,3% e Ind=1,7%. Nuevamente, vale aclarar que, por los mismos motivos previamente mencionados, el valor Ind podría estar subestimado. En este sentido, nuevamente, resulta claro que el subgrupo de pacientes EQ con algún tipo de información clínica se comporta de manera muy similar al total de individuos con EQ (con o sin información clínica).



**Figura 3.6. Caracterización serológica utilizando el subgrupo EQ con información clínica, el grupo DS y el grupo OP.** En el gráfico se observa la distribución de los resultados del kit Vircell®, el cual utiliza líquido hidatídico (LH) como fuente antigénica y detecta IgG<sub>T</sub>. La línea roja representa la zona de indeterminación. En el cuadro central se resumen los resultados obtenidos (VP= verdaderos positivos, FP = falsos positivos, VN = verdaderos negativos, FN = falsos negativos, ROP = reactividad de otras parasitosis, IND = indeterminados), mientras que en el cuadro de la derecha se detallan los parámetros diagnósticos calculados (ED = eficiencia diagnóstica, Se = sensibilidad, Esp = especificidad, RC = reactividad cruzada, Ind = indeterminación).

En suma, de la caracterización general del perfil proteico y serológico de la seroteca completa y de la seroteca utilizando exclusivamente el subgrupo de pacientes EQ con algún tipo de información clínica, se desprendió que ambas son razonablemente equivalentes en sus propiedades. De hecho, en términos de desempeño inmunodiagnóstico, si bien el valor de algunos parámetros importantes (Se y ED) varió según se tratase de la seroteca completa o utilizando solo el subgrupo EQ, las variaciones observadas no superaron el 5% aproximadamente; sugiriendo así que ambas opciones serían útiles para el desarrollo de la presente tesis.

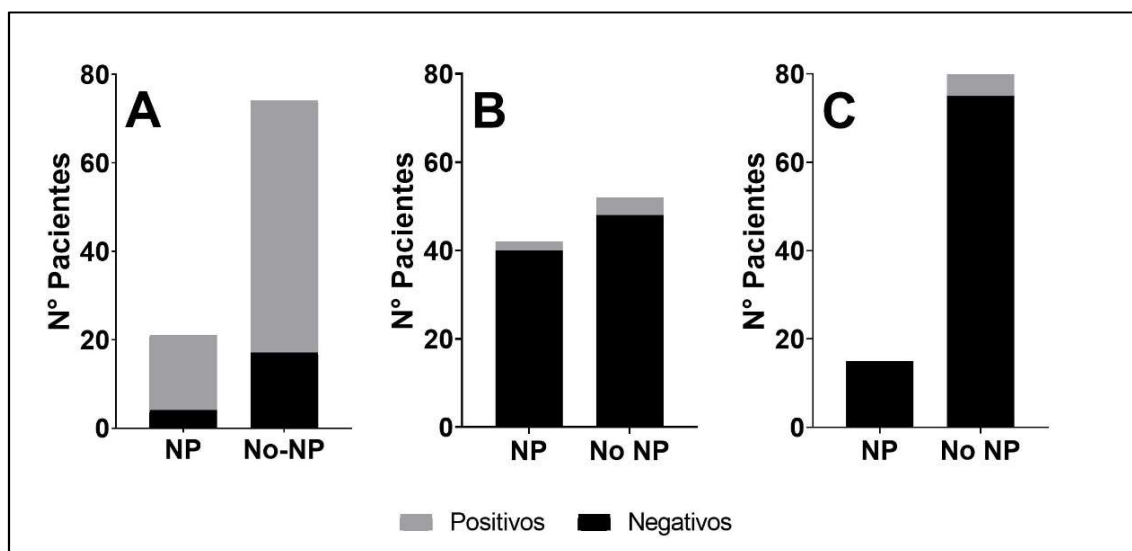
### **3.3. Asociaciones entre datos clínicos y perfiles proteico-serológicos en la seroteca generada.**

Es sabido que los resultados serológicos en EQ humana pueden verse afectados tanto por factores técnicos relacionados con los diversos *kits* diagnósticos existentes, así como también por factores intrínsecos del paciente. Entre estos últimos, destacan el estado inmunológico del individuo, así como la integridad y localización del quiste que porta; entre otros [Carmena et al., 2006]. Por ello, se exploraron posibles asociaciones existentes entre los resultados obtenidos de la caracterización proteica y serológica de las muestras, por un lado, y con los diferentes datos clínicos recolectados de los pacientes con EQ, por otro lado; esto último haciendo uso del subgrupo de individuos con EQ y algún tipo de información clínica.

#### **3.3.1. Evaluación de la asociación proteico-serológica en la seroteca.**

Con el fin de evaluar si los valores de proteinemia en los pacientes incidieron sobre sus resultados serológicos, se realizaron diversos análisis de contingencia relacionando el resultado serológico obtenido mediante el *kit* comercial Vircell® (seropositivos vs. seronegativos) y los valores de proteinemia hallados (NP vs. no-NP). En este sentido, en la **Figura 3.7.** se muestran los análisis realizados para los tres grupos que componen la seroteca (EQ, DS y OP), observándose la ausencia de asociaciones estadísticamente significativas entre las variables estudiadas (Fisher;  $p > 0,05$ ). Estos

análisis sugirieron que el resultado serológico de las muestras, no estaría influido por la concentración proteica total de las muestras.



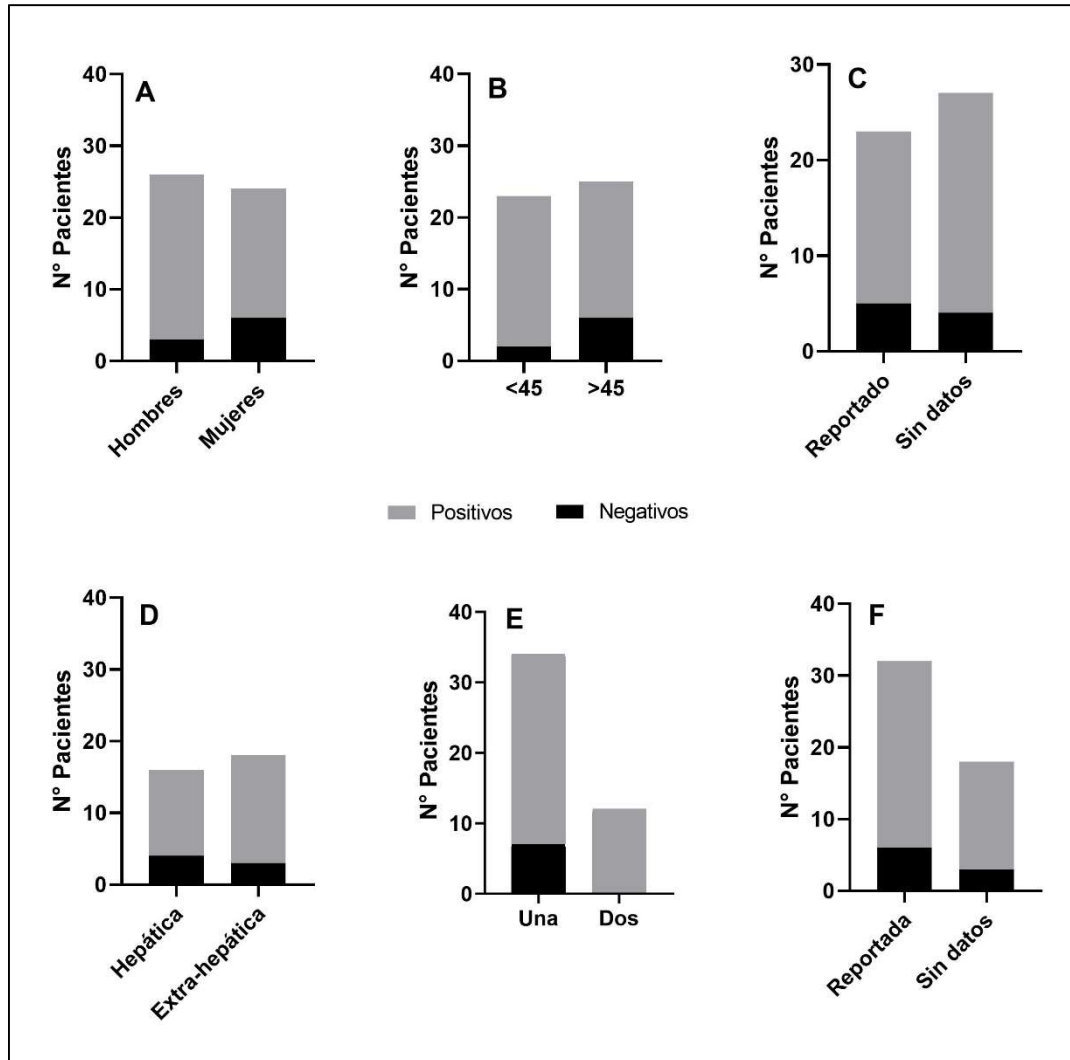
**Figura 3.7. Caracterización proteica de la seroteca completa.** En los gráficos (a), (b) y (c) se muestran los análisis de contingencia mediante test de Fisher para la asociación entre resultado serológico (seropositivo vs. seronegativo) y concentración proteica total (NP vs. no-NP) para los grupos EQ, DS y OP, respectivamente.

### 3.3.2. Evaluación de la asociación clínico-serológica en el subgrupo EQ con información clínica.

Con la finalidad de explorar posibles asociaciones existentes entre la información clínica recabada y los resultados serológicos obtenidos mediante el *kit* comercial Vircell<sup>®</sup>, se realizaron los análisis de contingencia correspondientes. En primer lugar, en relación a los datos de sexo y edad de los pacientes con EQ, no se observaron asociaciones significativas con el resultado serológico (Fisher;  $p > 0,05$ ). En este sentido, es importante mencionar que, el parámetro de edad, se dividió según la mediana poblacional total (45 años) (**Figura 3.8**).

En segundo lugar, en cuanto a la localización de los quistes, un total de 46 pacientes contaron con este dato clínico, y en función del mismo, se realizaron dos análisis de contingencia distintos con el resultado serológico obtenido (**Figura 3.8**). Por un lado, se evaluó el número de localizaciones de quistes (una vs. dos); mientras que, por otro lado, se trabajó únicamente con los pacientes con quistes ubicados en una única

localización, explorando asociaciones según esta fuese hepática o extrahepática. Ambos análisis mostraron la ausencia de asociaciones estadísticamente significativas con los resultados serológicos (Fisher;  $p > 0,05$ ).



**Figura 3.8. Análisis de asociaciones clínico-serológicas en el subgrupo EQ con información clínica.** Los análisis de contingencia se realizaron mediante el test de Fisher agrupando los resultados serológicos según las categorías: (a) sexo, (b) edad, (c) reporte de tratamiento farmacológico, (d) localización hepática o extrahepática del quiste, (e) número de ubicaciones de quistes, y (f) reporte de técnica imagenológica utilizada en el diagnóstico. Las asociaciones se consideraron significativas con  $p < 0,005$ .

Por último, se exploraron las asociaciones existentes tanto entre el resultado serológico obtenido y el reporte -o no- de tratamiento farmacológico (antiparasitario), como entre el resultado serológico obtenido y el reporte -o no- de la técnica

imagenológica utilizada en el diagnóstico (**Figura 3.8**). En el caso del tratamiento farmacológico, el estudio se realizó para 23 pacientes con información y 27 pacientes que no presentaron datos; mientras que, en el caso de la técnica imagenológica diagnóstica, el análisis se realizó sobre 32 pacientes que fueron diagnosticados por algún tipo de técnica imagenológica (ecografía, tomografía computarizada y/o resonancia magnética), contra los 18 pacientes restantes para los cuales no pudo recopilarse información al respecto. Nuevamente, en ambos casos, no se observaron asociaciones estadísticamente significativas con los resultados serológicos (Fisher;  $p > 0,05$ ).

En suma, la realización de las actividades asociadas al Objetivo Específico #1 de la presente tesis permitieron conformar una seroteca compuesta por un importante número de muestras distribuidas en tres grupos de trabajo definidos: EQ, DS y OP. La caracterización proteica de las muestras sugirió un relativo buen estado de conservación general, con concentraciones proteicas totales significativamente menores en las muestras del grupo EQ tanto respecto del grupo DS como OP. Sin embargo, no se encontró una asociación significativa entre esta diferencia y los resultados serológicos obtenidos con el *kit* comercial Vircell®. A su vez, los valores serológicos obtenidos para la seroteca generada, tanto completa como haciendo uso exclusivo del subgrupo EQ con algún tipo de información clínica, concordaron con los reportados por el fabricante. Por último, el perfil serológico del grupo de pacientes con EQ, tanto totales como solo con información clínica, mostró un comportamiento muy similar; no observándose ningún sesgo para con los datos clínicos estudiados.

En conclusión, las diversas caracterizaciones y análisis de contingencia realizados, sugirieron que el trabajo con la seroteca completa o la seroteca utilizando exclusivamente el subgrupo EQ con algún tipo de información clínica, brindaría resultados serológicos similares. En este sentido, se decidió continuar el trabajo de la presente tesis haciendo uso de la seroteca completa, bajo el supuesto de que un mayor número de muestras brindaría mayor fuerza estadística a los resultados obtenidos.

## CAPÍTULO 4.

### *Predicción in silico del secretoma y transmembranoma de Echinococcus granulosus e identificación de péptidos en los mismos con potencial serodiagnóstico.*

#### **Resultados y discusión.**

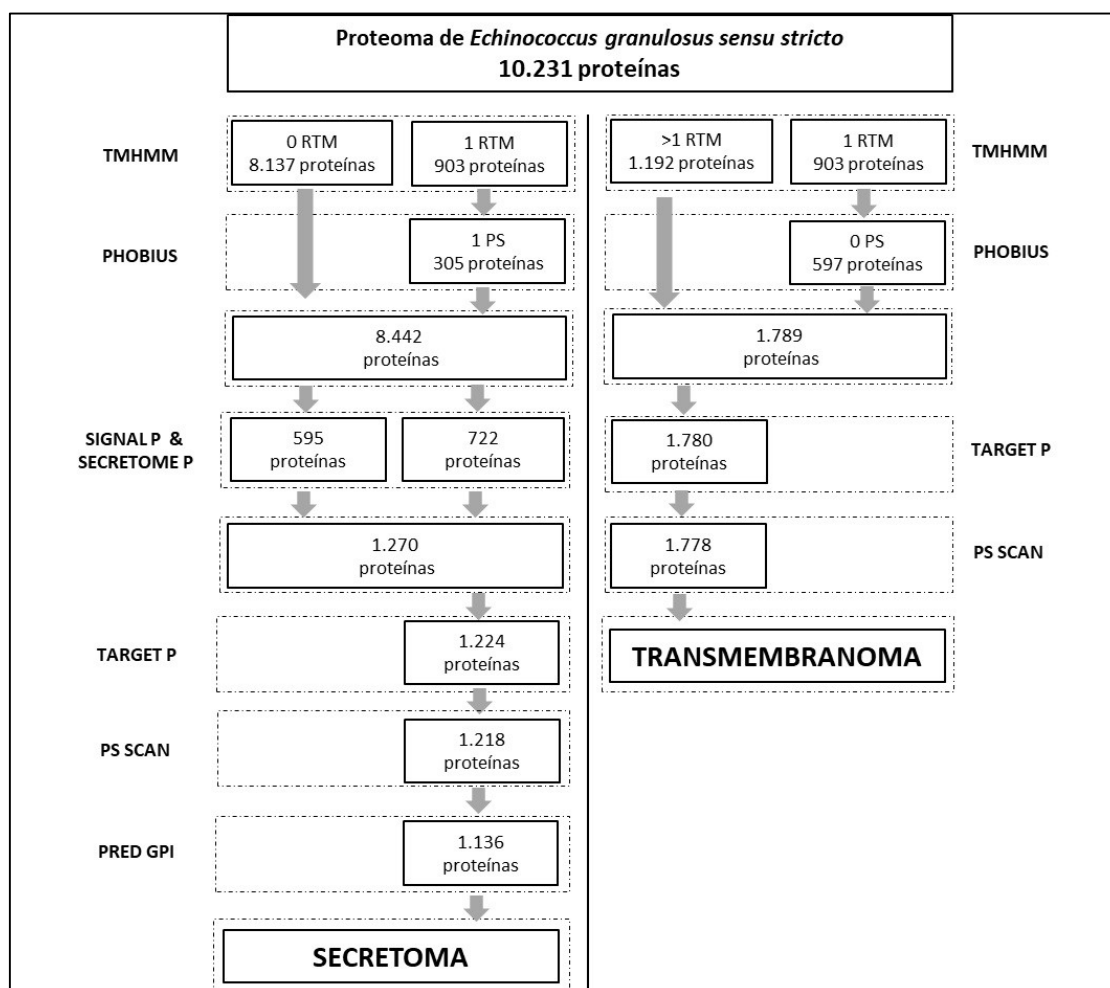
A continuación, se presentan los principales resultados obtenidos en relación con el flujo de trabajo aplicado para el diseño de péptidos con potencial valor inmunodiagnóstico en EQ humana (Objetivo específico #2). En el mismo, se combinaron de manera secuencial distintas herramientas bio- e inmuno-informáticas que permitieron predecir antígenos peptídicos potencialmente capaces de ser reconocidos por anticuerpos de pacientes con EQ.

En este sentido, se realizó en primer lugar la predicción del secretoma (SM) y del transmembranoma (TM) del parásito, ya que las proteínas presentes en ellos serían quienes tendrían, potencialmente, mayor y mejor contacto con el sistema inmune del paciente, y, por lo tanto, podrían desencadenar buenas respuestas de anticuerpos. En segundo lugar, se realizaron estudios inmuno-informáticos sobre las proteínas del SM y TM, para seleccionar aquellas que maximicen la capacidad de ser buenas desencadenantes de respuestas de anticuerpos. Por último, se realizaron predicciones a nivel peptídico para lograr diseñar estructuras definidas y específicas que permitiesen ser reconocidas únicamente por la respuesta humoral del individuo.

**Objetivo específico #2:** *Predecir in silico el secretoma y transmembranoma de Echinococcus granulosus e identificar péptidos en los mismos con potencial serodiagnóstico.*

#### 4.1. Predicción bioinformática del SM y TM de *E. granulosus*.

Con el objetivo de realizar la predicción teórica del SM y del TM parasitario, en primer lugar, se descargó el proteoma completo de *E. granulosus* s.s. (genotipo G1), compuesto por un total de 10.273 secuencias aminoacídicas. Al tratarse de un proteoma no curado, se realizó la depuración de las secuencias proteicas duplicadas, eliminándose 42 secuencias repetidas. Así, el proteoma parasitario de partida finalmente consistió en 10.231 secuencias proteicas únicas, a partir de las cuales, y en forma paralela, se procedió con la predicción teórica del SM y del TM parasitario. El flujo de trabajo aplicado su obtención se basó en un trabajo previamente publicado por nuestro grupo [Miles et al., 2017], con ciertas modificaciones (**Figura 4.1**).



**Figura 4.1.** Flujo de trabajo aplicado para la obtención del SM (panel izquierdo) y TM (panel derecho) de *E. granulosus* partiendo del proteoma parasitario teórico. Se detallan los softwares utilizados en cada predicción y las proteínas que continuaron luego de cada análisis.

#### 4.1.1. Predicción bioinformática del SM parasitario.

Como se esquematiza en la **Figura 4.1.**, la obtención del SM teórico de *E. granulosus* comenzó con la predicción de la presencia de regiones transmembrana (RTM) utilizando el predictor *TMHMM v2.0*. Así, partiendo de las 10.231 proteínas del proteoma teórico, se identificaron 8.137 proteínas carentes de RTM y 903 proteínas con una única RTM. Para estas últimas, el análisis se completó aplicando el *software Phobius* identificando 305 proteínas que presentaron al menos una secuencia de tipo péptido señal (PS). Por lo tanto, se seleccionó un total de 8.442 proteínas a ser estudiadas como potenciales miembros del SM parasitario; las cuales, como se mencionó anteriormente, tendrían una alta probabilidad de interacción con el sistema inmune del hospedero.

A continuación, se realizó el estudio de las posibles vías de secreción -clásica vs. no clásica- en dichas proteínas, utilizando de forma paralela los *softwares SignalP v5.0* y *SecretomeP v1.0*, respectivamente. Las predicciones realizadas determinaron que 595 proteínas serían candidatas a ser secretadas por la vía clásica, mientras que 722 proteínas serían candidatas a ser secretadas por la vía no clásica. Cabe aclarar que 47 proteínas fueron predichas simultáneamente por ambos *softwares*, por lo que el total de proteínas distintas que continuó en el flujo de trabajo fue de 1.270.

La predicción del SM parasitario continuó mediante la aplicación del predictor *TargetP v2.0*, con el cual se identificaron y eliminaron 46 proteínas adicionales que presentaron señales de exportación mitocondrial en su secuencia. Posteriormente, utilizando el *software PS Scan* se identificaron y eliminaron 6 proteínas más que presentaron en su secuencia una señal de exportación al Retículo Endoplasmático (RE). Finalmente, mediante el uso del predictor *PredGPI* se identificaron y descartaron 82 proteínas adicionales que presentaron secuencia de péptido para anclaje a glicosilfosfatidilinositol (GPI).

Así, finalmente el SM teórico para *E. granulosus* s.s. predicho en nuestro trabajo se conformó por un total de 1.136 proteínas parasitarias que se seleccionaron a partir de 10.231 proteínas diferentes, lo que equivale aproximadamente a un 11% del proteoma de partida. Predicciones similares del SM parasitario para otros cestodos filogenéticamente cercanos a *E. granulosus* han sido reportadas para *E. multilocularis* [Wang et al., 2015; Wang et al., 2015; Miles et al., 2017] y *Taenia solium* [Gomez et

al., 2015; Miles et al., 2017], incluyendo aproximadamente entre el 6% y el 10% del total de proteínas parasitarias.

Por su parte, para *E. granulosus* se ha predicho el perfil de proteínas secretadas partiendo del transcriptoma de protoscolecas [Pan et al., 2014; Pan et al., 2014], y, como mencionamos, el SM parasitario partiendo del proteoma teórico completo [Miles et al., 2017]. La predicción del SM de *E. granulosus* en la presente tesis se basó en este último trabajo, en el cual, partiendo de 10.274 proteínas diferentes se predijo un SM de 1.396 proteínas; aproximadamente un 14% del proteoma completo [Miles et al., 2017]. Así, los resultados obtenidos en la presente tesis estarían en línea con dichos valores, ya que las diferencias observadas entre ambos SM predichos podrían deberse a actualizaciones en la base de datos de partida, y al hecho que, en el presente trabajo, se realizó la depuración de secuencias repetidas y se utilizaron versiones más actualizadas de ciertos predictores. De esta forma, el porcentaje de proteínas del SM respecto del proteoma completo predicho en la presente tesis (11%), estaría más próximo a los reportes para *E. multilocularis* [Wang et al., 2015; Wang et al., 2015; Miles et al., 2017] y *T. solium* [Gomez et al., 2015; Miles et al., 2017] (6-10%) que lo reportado por Miles y colaboradores para *E. granulosus* (14%) [Miles et al., 2017].

#### 4.1.2. Predicción bioinformática del TM parasitario.

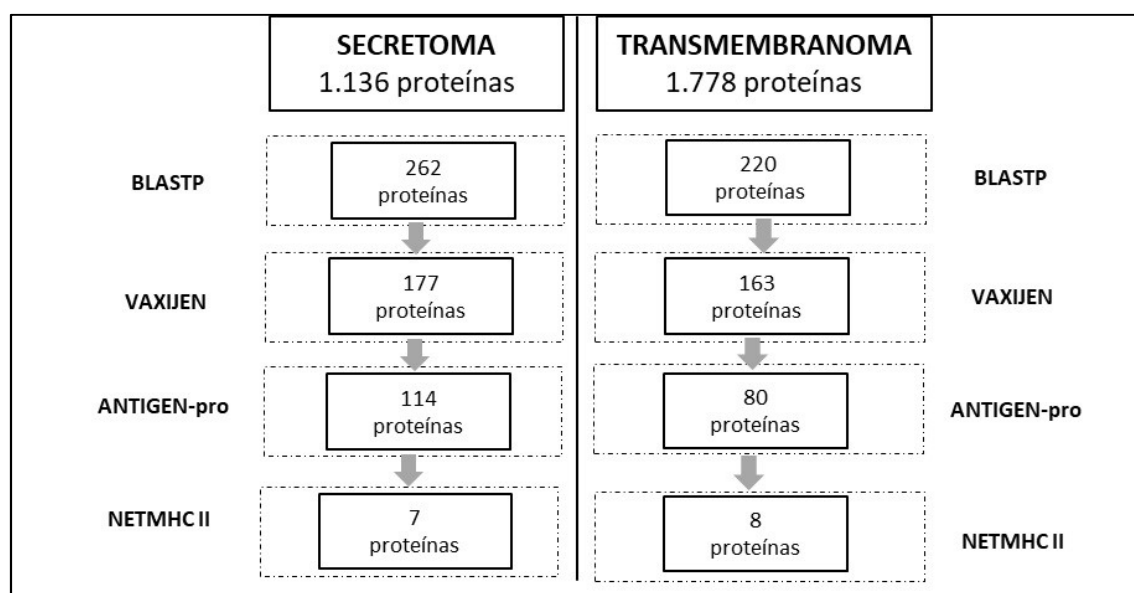
De manera análoga a la predicción del SM parasitario, la obtención del TM teórico de *E. granulosus* comenzó con el estudio de la presencia de RTM presentes en las proteínas del proteoma utilizando el predictor *TMHMM v2.0*. De este modo, de las 10.231 proteínas iniciales se seleccionaron 1.192 proteínas que presentaron más de una RTM y 903 proteínas que presentaron una única RTM. Para estas últimas, el análisis se completó aplicando el predictor *Phobius*, con el cual se identificaron 597 proteínas carentes de secuencia de PS. Por tanto, se seleccionó un total de 1.789 proteínas diferentes a ser estudiadas como posibles candidatos a conformar el TM parasitario.

Luego, la predicción del TM continuó con el estudio de la presencia de señal de exportación mitocondrial en las proteínas candidatas mediante el uso del *software TargetP v2.0*, identificando y descartando 9 proteínas. Posteriormente, utilizando el *software PS Scan* se predijeron y eliminaron 2 proteínas adicionales que presentaron señal de exportación al RE en su secuencia.

Así, el TM teórico para *E. granulosus* predicho en la presente tesis se conformó, finalmente, por un total de 1.778 proteínas parasitarias, equivalentes aproximadamente al 17% del proteoma completo. Cabe destacar que dicha predicción no ha sido reportada hasta el momento para ningún parásito cestodo, incluyendo *E. granulosus*, por lo que no se pudo realizar comparaciones con resultados previos y/o relacionados.

#### 4.2. Selección inmuno-informática de proteínas presentes en el SM y TM parasitario con potencial valor serodiagnóstico en EQ humana.

Luego de predecir el SM y el TM parasitario, se aplicaron secuencialmente diferentes *softwares* que permitiesen seleccionar aquellas proteínas con una alta posibilidad de ser reconocidas por el hospedero, a la vez que tuviesen una baja probabilidad de interactuar con anticuerpos generados en respuesta a otros organismos distintos a *E. granulosus*. En la **Figura 4.2.** se esquematiza el flujo de trabajo correspondiente.



**Figura 4.2.** Flujo de trabajo aplicado a partir de las proteínas provenientes del SM (panel izquierdo) y TM (panel derecho) de *E. granulosus* para la selección de proteínas con potencial valor inmunodiagnóstico. Se detallan los softwares utilizados en cada predicción y las proteínas que continuaron luego de cada análisis.

#### 4.2.1. Selección de proteínas altamente antigénicas.

Con el objetivo de seleccionar aquellas proteínas parasitarias con una alta probabilidad de ser reconocidas por anticuerpos del hospedero (proteínas altamente antigénicas), se realizó inicialmente un análisis de homología con todas las proteínas del SM y TM buscando eliminar aquellas con secuencias similares presentes en otros organismos. Así, se realizó una comparación de homología mediante *BlastP* contra todas las secuencias proteicas presentes en la base de datos de NCBI, a excepción de aquellas presentes en los filos nematodos y platelmintos (en este último caso incluyendo las clases Trematodo y Cestodo). El *score* de homología de identidad aminoacídica aplicado fue  $< 25\%$  respecto al conjunto de proteínas de la base de datos, por lo que de las 1.136 proteínas del SM y de las 1.778 proteínas del TM, se seleccionaron 262 y 220 proteínas, respectivamente, por presentar baja homología.

Luego, se evaluó la antigenicidad de dichas proteínas, de manera tal que se seleccionasen solo aquellas con altos valores teóricos. Para ello, se realizaron predicciones secuenciales de antigenicidad utilizando dos *softwares* distintos. En primer lugar, se utilizó el predictor *VaxiJen v2.0*, mediante el cual se determinó que de las 262 proteínas seleccionadas del SM y de las 220 seleccionadas del TM, un total de 177 y 163 proteínas, respectivamente, superaron el *score* de antigenicidad establecido. En segundo lugar, y partiendo de este subconjunto de proteínas, se aplicó el *software ANTIGEN-pro*, determinando que de las 177 proteínas antigénicas del SM identificadas mediante *VaxiJen v2.0* y de las 163 proteínas seleccionadas del TM, un total de 114 y 80 proteínas, respectivamente, superaron el *score* de antigenicidad establecido.

En suma, de las 1.136 proteínas que conformaron el SM parasitario, se seleccionaron 114 con escasa homología frente a proteínas de otros organismos y muy altos valores teóricos de antigenicidad; mientras que, de las 1.778 proteínas del TM parasitario finalmente se seleccionaron 80 proteínas con similares características. La baja homología junto a los altos valores de antigenicidad teórica, sugerirían que estas proteínas serían muy buenos candidatos para desencadenar respuestas de anticuerpos específicas en individuos con EQ.

#### 4.2.2. Selección de proteínas antigénicas capaces de ser presentadas en moléculas MHC-II humanas.

Entre los diversos factores que favorecen el buen desarrollo de la respuesta de anticuerpos contra un organismo externo se encuentra la elevada antigenicidad de sus proteínas, así como la capacidad de las mismas para ser presentadas en moléculas del MHC-II del hospedero. Este hecho, si bien no es indispensable para desencadenar una correcta respuesta de anticuerpos, en caso de ocurrir, es capaz de potencial la calidad y magnitud de la misma.

Por ello, se realizaron predicciones relacionadas con la probabilidad de presentación en moléculas del MHC-II humano (moléculas HLA) por parte de las proteínas del SM y TM parasitario seleccionadas por su alta antigenicidad. Este análisis se realizó mediante el *software NetMHC-II v2.3*, utilizando en la predicción 54 moléculas de HLA presentes en la base de datos del predictor (20 HLA-DQ, 25 HLA-DR y 9 HLA-DP). El estudio para las 114 proteínas provenientes del SM seleccionadas determinó que 7 de ellas serían capaces de unirse al menos al 85% de las moléculas de HLA estudiadas (46 de 54); mientras que, del estudio para las 80 proteínas provenientes del TM, se determinó que 8 proteínas serían capaces de unirse al menos al 80 % de las moléculas de HLA disponibles en la base de datos del predictor (49 de 54). Estas altas tasas de cobertura teórica sugerirían que dichas proteínas serían potencialmente relevantes desde una perspectiva poblacional, ya que distintas combinaciones de moléculas HLA en los individuos permitirían la presentación de las moléculas parasitarias en estudio.

En la **Tabla 4.1.** se describen las 7 proteínas identificadas del SM y las 8 del TM, las cuales presentaron amplios rangos de tamaño (desde 301 aminoácidos hasta 1.054). Utilizando el servidor *web.expasy.org* se calcularon sus valores teóricos de pI y peso molecular, los cuales comprendieron valores desde 4,54 hasta 9,93 y desde 33.507,80 hasta 113.190,27 g/mol, respectivamente.

Región	Número de Acceso	Nombre	Largo (a.a.)	pI	Masa molecular (KDa)
SM	EgrG_001168500	<i>Hypothetical protein</i>	301	8,8	33,5
	EgrG_000052100	<i>Hypothetical protein</i>	640	6,6	69,4
	EgrG_000601800	<i>Apple</i>	646	5,2	70,4
	EgrG_000080900	<i>Chorion class high cysteine protein 12</i>	687	5,7	74,4
	EgrG_000349800	<i>Hypothetical protein</i>	695	8,8	74,4
	EgrG_001024500	<i>Hypothetical protein</i>	869	5,6	92,8
	EgrG_001199600	<i>Hypothetical protein</i>	889	8,1	102,0
TM	EgrG_001057800	<i>DNA methylase N 6 adenine specific</i>	1.054	9,3	113,2
	EgrG_001129450	<i>Expressed protein</i>	1.047	6,7	111,5
	EgrG_000055300	<i>Uncharacterized protein</i>	644	9,9	70,7
	EgrG_000103600	<i>Uncharacterized protein</i>	1.010	6,6	101,0
	EgrG_001032800	<i>Uncharacterized protein</i>	709	6,6	79,9
	EgrG_001115500	<i>Protein tweety homolog</i>	761	4,5	83,0
	EgrG_000951600	<i>Hypothetical protein</i>	338	9,3	38,3
	EgrG_000236600	<i>Ras guanine Nucleotide exchange factor</i>	833	8,8	92,1

**Tabla 4.1.** Proteínas presentes en el SM y TM parasitario con potencial valor serodiagnóstico en EQ humana identificadas mediante estudios bio- e inmunoinformáticos.

Como se observa en la **Tabla 4.1.**, la gran mayoría de las proteínas, tanto provenientes del SM como del TM, correspondieron al tipo “proteína hipotética” o “proteína no caracterizada” en la base de datos de NCBI, por lo que se desconoce tanto su función en la fisiología parasitaria como su utilidad real para el uso inmunodiagnóstico. Sin embargo, al realizar un análisis de homología mediante *BlastP* con dichas proteínas contra todas las proteínas existentes en los filos nematodos y platelmintos, se observó que dos de ellas presentaron cierto grado de homología con otras proteínas existentes en la base de datos.

Por un lado, dentro de las proteínas del SM, la proteína >EgrG\_000052100 mostró valores importantes de homología con la proteína “*Chorion class high cysteine protein 12*” (CDS39563.2) de *E. multilocularis* (cobertura: 100% e identidad: 95,3%), sugiriendo que dicha proteína hipotética podría cumplir funciones comunes en parásitos del género *Echinococcus* spp. Por otro lado, dentro de las proteínas del TM, la proteína >EgrG\_001032800 mostró valores relativos de homología con la proteína “*Blue light receptor*” (XP\_051075289.1) del trematodo *Schistosoma haematobium*

(cobertura: 46% e identidad: 21,4%), sugiriendo que cierto(s) dominio(s) presente(s) en la proteína hipotética de *E. granulosus* podría(n) ser relevante(s) en proteínas de otros helmintos parásitos.

### **4.3. Selección inmuno-informática de péptidos con potencial valor serodiagnóstico en EQ humana presentes en proteínas de interés del SM y TM parasitario.**

El fenómeno por el cual un anticuerpo del hospedero reconoce proteínas antigénicas de organismos externos ocurre mediante su interacción con porciones estructurales específicas presentes en la proteína denominados epítopes B. Este reconocimiento puede ocurrir tanto con secuencias lineales de aminoácidos como con motivos conformacionales presentes en la proteína, conociéndose dichos epítopes B como lineales o conformacionales, respectivamente. Desde el punto de vista del inmunodiagnóstico, el uso de péptidos correspondientes a epítopes B lineales (EBL) conlleva múltiples ventajas, ya que permitirían reducir las posibles interacciones cruzadas al trabajar con estructuras moleculares definidas, relativamente sencillas y de fácil producción.

Por ello, a partir de las proteínas identificadas en el SM y TM parasitario con potencial valor serodiagnóstico en EQ humana (**Tabla 4.1.**), se analizó la presencia de EBL con potencial valor inmunodiagnóstico siguiendo el flujo de trabajo esquematizado en la **Figura 4.3.** Para ello, en primer lugar, se realizó el análisis de EBL constituidos por al menos 7 aminoácidos consecutivos, mediante el uso del predictor *BepiPred v2.0*, identificándose 96 EBL en las 8 proteínas del SM y 143 EBL en las proteínas del TM.

Luego, se realizó la selección de EBL “limpios” (EBLL) identificando aquellas secuencias peptídicas libres de potenciales modificaciones postraduccionales (PTM) y mapeándolas sobre los EBL predichos. El uso de péptidos sintéticos correspondientes a EBLL en técnicas de inmunodiagnóstico favorecería su reconocimiento por anticuerpos a la vez que simplificaría su proceso de producción. Por ello, se realizó la predicción de diferentes PTM potencialmente presentes en las proteínas seleccionadas (**Tabla 4.2.**), y las mismas se mapearon luego sobre sus secuencias aminoacídicas, descartando aquellos EBL predichos que contuviesen al menos una posible PTM.

SUBCONJUNTO	PROTEÍNA	EBL ( <i>Bepipred</i> )	EBLL (PTMs)	EBLL ( <i>BlastP</i> )
SECRETOMA	EgrG_001168500	8	4	4
	EgrG_000052100	16	6	2
	EgrG_000601800	17	4	2
	EgrG_000080900	17	5	4
	EgrG_000349800	10	1	1
	EgrG_001024500	4	2	2
	EgrG_001199600	24	13	12
	<b>TOTAL</b>	<b>96</b>	<b>35</b>	<b>27</b>
TRANSMEMBRANOMA	EgrG_001057800	21	9	6
	EgrG_001129450	19	5	4
	EgrG_000055300	16	7	5
	EgrG_000103600	23	8	7
	EgrG_000951600	5	1	1
	EgrG_001032800	17	4	2
	EgrG_001115500	18	8	7
	EgrG_000236600	24	11	7
	<b>TOTAL</b>	<b>143</b>	<b>53</b>	<b>39</b>

**Figura 4.3.** Flujo de trabajo aplicado a partir de la selección de proteínas provenientes del SM (arriba) y TM (abajo) de *E. granulosus* para la obtención de EBLL. Se detallan los softwares utilizados en cada predicción y los péptidos que continuaron luego de cada análisis.

Cabe mencionar que el análisis de PTM en las proteínas se realizó utilizando los *softwares* conocidos por el grupo de trabajo, sin evidencia existente en ese momento de que las PTM analizadas estuviesen efectivamente presentes -o no- en proteínas de *E. granulosus*. En este sentido, un estudio posterior realizado por nuestro grupo sugirió un listado de 22 posibles PTM diferentes con alta probabilidad de estar presente en el parásito [Miles et al., 2022]. Por ello, en la **Tabla 4.2** se detallan las PTM analizadas en el flujo de trabajo utilizado en la presente tesis y la frecuencia con que se predijeron en cada una de las proteínas de interés. En dicha tabla, se destacan en color verde las PTM sugeridas con alta probabilidad de ser encontradas en *E. granulosus* por Miles y colaboradores [Miles et al., 2022], mientras que las señaladas en color rojo no fueron identificadas en dicho reporte.

PROTEÍNA		N-glicosilación	Glicosilación	O-GalNAc-glicosilación	C-manosilación	Farnesilación Miristoilación Geranyl-geranilación	S-nitrosilación	Tyr-sulfatación	Metilación	Lys-acetilación	Palmitoilación	Sumoilación	APC/C	Acetilación N-terminal
SECRETOMA	EgrG_001168500	0	3	14	0	0	2	2	1	1	0	0	0	1
	EgrG_000052100	6	12	32	1	0	3	3	0	7	3	0	0	2
	EgrG_000601800	3	1	34	0	1	2	0	2	3	1	3	1	0
	EgrG_000080900	6	1	37	0	1	0	4	0	10	2	0	0	3
	EgrG_000349800	1	8	56	0	0	1	3	0	4	0	0	0	3
	EgrG_001024500	2	19	225	1	0	1	5	0	7	1	1	0	0
	EgrG_001199600	3	8	9	0	0	2	0	0	7	1	2	0	0
TRANSMEMBRANOMA	EgrG_001057800	9	21	130	0	0	3	2	0	2	1	2	1	3
	EgrG_001129450	13	16	87	0	0	1	1	0	3	1	2	1	1
	EgrG_000055300	4	12	45	0	0	1	3	0	1	4	1	1	1
	EgrG_000103600	5	11	18	1	0	3	0	1	2	4	2	0	2
	EgrG_000951600	4	7	3	0	0	1	2	0	2	3	1	0	1
	EgrG_001032800	9	15	39	1	0	2	1	0	6	6	1	0	3
	EgrG_001115500	8	12	10	0	0	0	2	0	7	10	1	0	1
	EgrG_000236600	2	9	19	0	0	0	3	0	7	0	4	1	0

**Tabla 4.2.** Predicción de las diferentes PTM para las 7 proteínas del secretoma y 8 del transmembranoma. En color verde se resaltan las PTM que fueron encontradas en Miles et al. (2022) para *Echinococcus granulosus*, mientras que en color rojo se resaltan las predicciones que no fueron descritas en dicho estudio.

Así, de los 96 EBL provenientes de proteínas del SM se identificaron 35 como EBL, mientras que de los 143 EBL identificados en proteínas del TM se seleccionaron 53 EBL, totalizando 88 EBL entre las proteínas seleccionadas del SM y del TM (**Figura 4.3.**).

Como se mencionó previamente, al momento de realizar el análisis de PTM no se disponía de evidencia experimental relacionada con las PTM efectivamente presentes en proteínas de *E. granulosus*. Por ello, en la **Tabla 4.3.** se comparan las

PTM analizadas en el flujo de trabajo utilizado en la presente tesis y las PTM descritas en Miles y colaboradores [Miles et al., 2022]. En dicha tabla se observa que son varias las PTM descritas que no se analizaron en la presente tesis y que, por lo tanto, sería de gran valor poder realizar su predicción. En sentido inverso, también se observa que algunas de las PTM analizadas no fueron descritas en Miles y colaboradores [Miles et al., 2022], por lo que se podría haber descartado potenciales EBLL de forma no deseada; limitando en parte los resultados obtenidos en las siguientes etapas de la presente tesis. Por ejemplo, se destaca que las glicosilaciones *O*-GalNAc-glicosilación, *N*-glicosilación y *O*-glicosilación presentaron altas frecuencias en diferentes sitios de las proteínas de interés, siendo responsables del descarte de un gran número de EBL; sin embargo, entre dichas glicosilaciones, únicamente *O*-GalNAc-glicosilación fue descrita con alta confianza a nivel experimental [Miles et al., 2022].

Por último, y con el objetivo de aumentar la potencial especificidad de interacción anticuerpos-péptidos, se descartaron aquellos péptidos con posibilidad de ser reconocidos mediante interacciones cruzadas. Para ello, se realizó un análisis de homología para los 88 EBLL identificados frente a la base de datos de NCBI. En este estudio se seleccionaron solo aquellos EBLL que no mostrasen, simultáneamente, 100% de identidad aminoacídica y 100% de cobertura total con cualquier otro péptido/proteína presente en la base de datos; nuevamente permitiendo la excepción los filos Nematodo y Platelmino. Los resultados obtenidos de este análisis permitieron identificar, finalmente, 66 EBLL de interés: 27 y 39 EBLL partiendo de las proteínas presentes en el SM y en el TM, respectivamente. En este punto es importante mencionar que si bien para la proteína con número de acceso EgrG\_000951600 se identificó un único EBLL, el mismo se descartó por presentar 100% de identidad aminoacídica y de cobertura con otra proteína existente de *Mycoplasma struthionis* (WP\_124724636).

PTM	Tesis	Miles <i>et al.</i> (2022)
Acetilación	✓	✓
Ácido $\gamma$ -carboxiglutámico	✗	✓
Ácido sulfénico de cistina (-SO <sub>2</sub> H)	✗	✓
Ácido sulfénico de cistina (-SOH)	✗	✓
ADP-ribosilación	✗	✓
Amidación	✗	✓
APC/C	✓	✗
C-manosilación	✓	✗
Deamidación	✗	✓
Deamidación seguida de metilación	✗	✓
Dihidroxilación	✗	✓
Dimetilación	✗	✓
Formilación	✗	✓
Fosforilación	✗	✓
Glicosilación	✓	✗
Glutathionilación	✗	✓
Lys-acetilación	✓	✗
Metilación	✓	✓
N-glicosilación	✓	✗
N-miristoilación	✓	✓
n-Octanoato	✗	✓
O-GalNAc-glicosilación	✓	✓
Palmitoilación	✓	✓
Persulfuro de cistina	✗	✓
S-farnesilación	✓	✓
S-geranil-geranilación	✓	✓
S-nitrosilación	✓	✓
Sumoilación	✓	✗
Trimetilación	✗	✓
Tyr-sulfatación	✓	✓
Hidroxilación	✗	✓

**Tabla 4.3.** Comparación de las PTMs utilizadas en el work-flow y las descritas en Miles et al. (2022). El tick verde confirma la presencia de dicha PTM en la columna mientras que la cruz roja hace referencia a la ausencia de la PTM.

Finalmente, en la **Tabla 4.4.** se describen los 27 EBLL identificados para las proteínas del SM, los cuales mostraron largos de 7-35 aminoácidos en sus secuencias. Cabe destacar que, para simplificar los estudios posteriores, de aquí en adelante se aplicó un código interno a cada EBLL del SM utilizando la siguiente nomenclatura: “JS” haciendo referencia al origen de la proteína (*Javier Secretoma*: SM predicho), “P#” haciendo mención al número asignado a la proteína parental del péptido, y un dígito final que discrimina entre distintos EBLL pertenecientes a una misma proteína.

Número de acceso	#	Nombre	Largo (a.a.)	Secuencia (N→C)
EgrG_001168500	1	JS.P1.1	13	KVNAMRDYNSGSG
		JS.P1.2	18	DDVEKHAMDKLEQTTNAL
		JS.P1.3	19	SRIDPERKFSFDDYRAMSI
		JS.P1.4	25	RPISFKILSIDSHINRLYETKNTEG
EgrG_000052100	2	JS.P2.1	7	FYDFQQC
		JS.P2.2	12	GYGAYASSMDAY
EgrG_000601800	3	JS.P3.1	12	NTATSDLHSVNS
		JS.P3.2	18	RANEFRLERHISLEQCRE
EgrG_000080900	4	JS.P4.1	11	LPNTAKYLADM
		JS.P4.2	13	GYGAYASSTDAYT
		JS.P4.3	14	SRVCHSGANTGYGC
		JS.P4.4	15	CKNGKCSDFYDFQQC
EgrG_000349800	5	JS.P5.1	9	APLTQPLDI
EgrG_001024500	6	JS.P6.1	10	LTDESVDVEM
		JS.P6.2	11	HCRGRESRRPK
EgrG_001199600	7	JS.P7.1	9	YFMPTGIKW
		JS.P7.2	9	RVSVKKAPA
		JS.P7.3	11	GTTGNGLNLHD
		JS.P7.4	12	FRKDDLPEYEMV
		JS.P7.5	14	TYERRHVVDDECED
		JS.P7.6	19	INFELEYLEMSGEVGPNNY
		JS.P7.7	19	WREMETCDDLHTVDSVYNV
		JS.P7.8	22	EGHVSSQYMVHLQPPHKRVLTH
		JS.P7.9	28	SYTPESGYEVNKKNIDSSAKLRGRSNDY
		JS.P7.10	30	PPPIEMTVDDITVPTVEDESILQNRELQIF
		JS.P7.11	30	EWNTGLTMSLEEMIGMNAVTEIDTDEVHAV
		JS.P7.12	35	QQRGLSTSIPIVQKAPLLPHFNKDLSQLVTEGRRN

**Tabla 4.4.** Descripción de los 27 EBLL identificados en la selección de proteínas del SM parasitario. Se detalla el número de acceso de la proteína de origen, el código del péptido, el número de aminoácidos que lo componen y su secuencia aminoacídica.

Por su parte, en la **Tabla 4.5.** se describen los 39 EBLL identificados para las proteínas del TM, los cuales mostraron largos de 9-51 aminoácidos en sus secuencias. Los mismos códigos de simplificación descritos para la **Tabla 4.2.** aplican en este caso, con la salvedad que "JT" hace referencia al origen de la proteína como el TM teórico (*Javier Transmembranoma*).

Número de acceso	#	Nombre	Largo (a.a.)	Secuencia (N→C)
EgrG_00105780	1	JT.P1.1	9	EAQQLTSE
		JT.P1.2	12	GIMRLDLTETRN
		JT.P1.3	12	ASAEKLRQHVVQ
		JT.P1.4	13	NLNHRASRGISST
		JT.P1.5	16	EKCERLSNLDLRDQPQM
		JT.P1.6	23	VNDPPFGIFSRLPTVAATVGDPM
EgrG_001129450	2	JT.P2.1	14	TLPWKSKPQGGVAG
		JT.P2.2	16	ADRLAEGFTETPDVNQ
		JT.P2.3	17	VAATSTSLHLSDFEPLK
		JT.P2.4	20	HHRRQWIPDPPPGGCMTREE
EgrG_000055300	3	JT.P3.1	10	FKSHFVQTSG
		JT.P3.2	12	TSSNPTGSKRVR
		JT.P3.3	13	RPPFPGLDKPEV
		JT.P3.4	18	NIRLPAEFADRNVNGDSS
		JT.P3.5	40	EKEGYLRFEIHEIRNPHFRQLLENPVEMDFLKKKTSLYPI
EgrG_000103600	4	JT.P4.1	9	KDSQPLAYK
		JT.P4.2	9	IGHGPMINA
		JT.P4.3	12	KIAGSQSVGRLI
		JT.P4.4	15	QVTELYNTYTQPSP
		JT.P4.5	20	IALWPGQPLCAPKSSFLPD
		JT.P4.6	31	WLGPTVRRWHFENFNIRLQSDRIRRNINFPV
		JT.P4.7	37	QNDPGVPDQSFQWEQEAIQNFRRTGPTSIGSFYGR
EgrG_001032800	5	JT.P5.1	14	TPDFETRRANVALP
		JT.P5.2	31	LEMCEHAAGGGDHVSGHFDNLNVDEESLAL
EgrG_001115500	6	JT.P6.1	9	RRNRHLNRV
		JT.P6.2	12	EAHEAYSAVTGA
		JT.P6.3	18	PTNSQDPQFLAEGGPN
		JT.P6.4	22	EQWGSILGDTGGNGDSSLNASP
		JT.P6.5	34	RSEPLSLPILEAMPESHGGGVAGVNNANAHPNRE
		JT.P6.6	47	EKELNLQILSTVDELWPRAETQSQELVQIRNAIEPITQVSQGAE
		JT.P6.7	51	MSAEIIIIIIIIIIEDSSDDDDSESESEDESTSSSSVSVSESATSDEEDDSDE
EgrG_000236600	7	JT.P7.1	15	IFQMGAPGVQQPVYV
		JT.P7.2	15	VRIHQPDADMKNYHQ
		JT.P7.3	16	NAMVQPQRQPGEHAA
		JT.P7.4	18	QQDPFHLLQKRTAQQQHH
		JT.P7.5	24	SQGMLQPQSQAQTAYMTDAGHGM
		JT.P7.6	26	QQQQQQQQMIVTSEQAHQPPADPFQA
		JT.P7.7	29	GAVSEEAPQKLLAQKRVAAQRFVPPGIR
		JT.P7.8	32	DFMVHSQVEWSGEGNSFYTRDEVTAFRKTAST

**Tabla 4.5.** Descripción de los 39 EBLL identificados en la selección de proteínas del TM parasitario. Se detalla el número de acceso de la proteína de origen, el código del péptido, el número de aminoácidos que lo componen y su secuencia aminoacídica.

En suma, partiendo del proteoma teórico de *E. granulosus*, se realizó la predicción bioinformática de su SM (1.136 proteínas) y de su TM (1.778 proteínas) teóricos, lo que permitió enfocar el trabajo sobre el conjunto de proteínas parasitarias que tendría mayor y mejor contacto con el sistema inmune del paciente, pudiendo potencialmente desencadenar buenas respuestas de anticuerpos. A su vez, y mediante diversas estrategias de análisis immuno-informático, se identificaron 7 proteínas del SM y 8 del TM con valor teórico para su uso en inmunodiagnóstico de EQ humana, ya que: (i) exhibieron muy bajos niveles de conservación con organismos distintos de los helmintos, (ii) presentaron altos valores de antigenicidad teórica, y (iii) serían potencialmente presentadas por diversas moléculas de MHC-II humanas. Estas características facilitarían, y promoverían, el desarrollo de respuestas de anticuerpos específicas contra dichas proteínas en individuos con EQ, lo cual les asignaría un valor relevante para el desarrollo de nuevos ensayos inmunodiagnósticos. Por último, dentro de dichas proteínas se identificaron 66 EBLL, los cuales, en formato de péptidos sintéticos, podrían constituir candidatos de interés para la producción de antígenos definidos con potencial utilidad en el inmunodiagnóstico de la EQ humana.

## CAPÍTULO 5.

### *Evaluación del potencial serodiagnóstico de los péptidos sintéticos identificados a partir del SM y TM de *E. granulosus*.*

#### **Resultados y discusión**

A continuación, se presentan los principales resultados obtenidos relacionados con la evaluación experimental del potencial valor serodiagnóstico en EQ humana por parte de los péptidos sintéticos identificados derivados del SM y TM predichos para *E. granulosus* (Objetivo específico #3).

En el capítulo anterior, se describió el flujo de trabajo que permitió la identificación de 27 y 39 EBLL provenientes de proteínas del SM y del TM parasitario, respectivamente. Sin embargo, el listado de péptidos a sintetizar comercialmente se seleccionó en base a restricciones de tamaño estipuladas por el fabricante, tomando además como referencia al péptido p176 por ser, hasta el momento, el péptido sintético reportado con mejor eficacia diagnóstica en EQ humana [González-Sapienza et al., 2000]. Dicho péptido, derivado de la secuencia correspondiente a la porción N-terminal del AgB1 de *E. granulosus*, tiene un largo de 38 aminoácidos. Por ello, se sintetizaron los 27 EBLL identificados a partir del SM parasitario predicho, cuyas secuencias oscilaron entre 7 y 35 aminoácidos (Tabla 4.2.), y 27 EBLL diseñados a partir del TM, con secuencias en el rango 10-29 aminoácidos (Tabla 4.3.). Así, de los 66 EBLL identificados, se sintetizó comercialmente un total de 54. Además, se solicitó la síntesis comercial del péptido p176 para utilizarlo como referencia en la optimización de las condiciones de los ensayos.

**Objetivo específico #3.** *Evaluar el potencial serodiagnóstico de los péptidos sintéticos identificados a partir del secretoma y transmembranoma de *Echinococcus granulosus*.*

## 5.1. Caracterización fisicoquímica de los péptidos sintéticos.

Una vez sintetizados comercialmente los péptidos seleccionados, se realizó su caracterización fisicoquímica para optimizar el algoritmo empírico de su solubilización, así como para luego, poder correlacionar dichas características con la posible utilidad serodiagnóstica de los péptidos.

### 5.1.1. Análisis de las propiedades fisicoquímicas de los péptidos sintéticos.

Los péptidos sintetizados se caracterizaron en términos del largo de su secuencia (número de aminoácidos), y de su punto isoeléctrico (pI) y masa molecular (g/mol) teóricas; estos últimos calculados haciendo uso del servidor *web.expasy.org*. Además, se determinó el porcentaje de aminoácidos constituyentes pertenecientes a las clases polares cargados positivamente (R=arginina, K=lisina y H=histidina), polares cargados negativamente (D=ácido aspártico y E=ácido glutámico), polares neutros (S=serina, T=treonina, C=cisteína, P=prolina, N=asparagina y Q=glutamina,) e hidrofóbicos (F=fenilalanina, I=isoleucina, L=leucina, M=metionina, V=valina, W=triptófano, Y=tirosina, A=alanina y G=glicina).

En la **Tabla 5.1.** se detallan las características analizadas para los péptidos sintetizados comercialmente derivados del SM parasitario. En la misma se observa que las secuencias peptídicas comprendieron largos desde los 7 hasta los 35 aminoácidos, destacándose que el largo más frecuente se correspondió con péptidos de 9, 11, 12 y 19 aminoácidos; tres péptidos distintos para cada uno de dichos tamaños. Asimismo, el rango de masas moleculares correspondientes osciló desde 950,0 g/mol hasta 3.900,5 g/mol. Por su parte, en términos de pI, la mayoría de los péptidos sintéticos derivados del SM parasitario (17/27) presentaron valores  $pI < 7$ , mientras que el resto (10/27) mostraron valores  $pI > 7$ . Por último, el rango de valores de composición porcentual de ciertos tipos de aminoácidos mostró ser altamente variable entre los distintos péptidos sintéticos derivados del SM parasitario: aminoácidos polares cargados (7,7-64,3%), aminoácidos polares neutros (8,3-58,3%) y aminoácidos hidrofóbicos (9,1-75,0%); un dato relevante a la hora de proceder con su solubilización.

Péptido	Largo (a.a.)	pI	Masa molecular teórica (g/mol)	Composición de a.a. (%)		
				Polares cargados	Polares neutros	Hidrofóbicos
JS.P1.1	8	9,7	1.398,5	23,1	30,8	46,2
JS.P1.2	18	4,4	2.058,3	44,4	22,2	33,3
JS.P1.3	19	6,7	2.333,6	42,1	21,1	36,8
JS.P1.4	25	9,6	2.932,3	32,0	32,0	36,0
JS.P2.1	7	3,1	950,0	14,3	42,9	42,9
JS.P2.2	12	3,1	1.255,3	8,3	16,7	75,0
JS.P3.1	12	5,0	1.245,3	16,7	58,3	25,0
JS.P3.2	18	7,1	2.286,6	50,0	22,2	27,8
JS.P4.1	11	6,7	1.236,5	18,2	27,3	54,5
JS.P4.2	13	3,1	1.326,3	7,7	30,8	61,5
JS.P4.3	14	8,3	1.411,5	14,3	42,9	42,9
JS.P4.4	15	6,0	1.786,0	26,7	46,7	26,7
JS.P5.1	9	3,1	967,1	11,1	44,4	44,4
JS.P6.1	10	2,9	1.095,1	40,0	20,0	40,0
JS.P6.2	11	12,0	1.381,6	63,6	27,3	9,1
JS.P7.1	9	9,7	1.142,4	11,1	22,2	66,7
JS.P7.2	9	11,7	955,2	33,3	22,2	44,4
JS.P7.3	11	5,0	1.098,1	18,2	36,4	45,5
JS.P7.4	12	4,1	1.451,7	50,0	8,3	41,7
JS.P7.5	14	4,2	1.779,9	64,3	14,3	21,4
JS.P7.6	19	3,0	2.218,4	21,1	26,3	52,6
JS.P7.7	19	3,9	2.312,5	36,8	26,3	36,8
JS.P7.8	22	9,7	2.581,0	31,8	31,8	36,4
JS.P7.9	28	9,3	3.179,4	32,1	35,7	32,1
JS.P7.10	30	3,4	3.439,9	26,7	36,7	36,7
JS.P7.11	30	3,4	3.336,7	26,7	23,3	50,0
JS.P7.12	35	10,6	3.900,5	20,0	42,9	37,1

**Tabla 5.1.** *Características fisicoquímicas de los 27 péptidos sintéticos obtenidos a partir del SM parasitario. Se detalla el nombre del péptido, el largo de su secuencia, su punto isoeléctrico y masa molecular teórica, y su composición porcentual de aminoácidos polares cargados, polares neutros e hidrofóbicos.*

Por otra parte, en la **Tabla 5.2.** se detallan las características analizadas para los péptidos sintetizados comercialmente derivados del TM parasitario. En este caso se observa que las secuencias peptídicas comprendieron largos desde los 10 hasta los 35 aminoácidos, destacándose que, de manera parcialmente análoga a los péptidos del SM, el largo más frecuente correspondió a péptidos de 12 aminoácidos; cinco péptidos distintos con dicho tamaño. Asimismo, el rango de masas moleculares correspondientes fue más acotado que el observado para los péptidos sintéticos derivados del SM, oscilando en este caso entre 1.137,3 g/mol y 3.145,7 g/mol. Además, en términos de pI, la distribución de péptidos sintéticos ácidos y básicos fue más homogénea en este caso, ya que 13/27 péptidos presentaron valores ácidos, mientras 14/27 péptidos mostraron valores básicos. Por último, y a diferencia de lo observado para los péptidos sintéticos derivados del SM parasitario, el rango de valores de composición porcentual de ciertos tipos de aminoácidos mostró ser levemente menos variable entre los péptidos sintéticos derivados del TM: aminoácidos polares cargados (0,0-43,8%), aminoácidos polares neutros (16,7-61,5%) y aminoácidos hidrofóbicos (16,7-66,7%).

Por último, el péptido sintético de referencia p176 presentó un largo de 38 aminoácidos con una masa molecular teórica de 4.380,1 g/mol y un valor de pI de 5,0 (ácido). Asimismo, su composición porcentual de aminoácidos mostró una distribución relativamente equitativa: 34,2% de residuos polares cargados, 26,3% de residuos polares neutros y 39,5% de residuos hidrofóbicos. La secuencia aminoacídica de p176 se muestra a continuación:

**NH<sub>2</sub>-DDGLTSTSR SVMKMFGEVKYFFERDPLGQKVVDLLKEL-COOH**

Péptido	Largo (a.a.)	pI	Masa molecular teórica (g/mol)	Composición de a.a. (%)		
				Polares cargados	Polares neutros	Hidrofóbicos
JT.P1.2	12	7,0	1.418,6	33,3	25,0	41,7
JT.P1.3	12	10,0	1.394,6	33,3	33,3	33,3
JT.P1.4	13	12,5	1.412,5	23,1	46,2	30,8
JT.P1.5	16	4,6	1.962,2	43,8	37,5	18,8
JT.P1.6	23	3,9	2.401,8	13,0	34,8	52,2
JT.P2.1	14	10,6	1.425,7	14,3	35,7	50,0
JT.P2.2	16	3,6	1.762,9	31,3	31,3	37,5
JT.P2.3	17	5,2	1.816,0	23,5	35,3	41,2
JT.P2.4	20	7,3	2.399,7	40,0	35,0	25,0
JT.P3.1	10	10,0	1.137,3	20,0	40,0	40,0
JT.P3.2	12	12,5	1.289,4	25,0	58,3	16,7
JT.P3.3	13	7,0	1.408,6	30,8	30,8	38,5
JT.P3.4	18	4,3	1.960,1	27,8	27,8	44,4
JT.P4.3	12	11,5	1.228,5	16,7	25,0	58,3
JT.P4.4	15	3,3	1.753,9	6,7	60,0	33,3
JT.P4.5	20	6,1	2.153,6	10,0	40,0	50,0
JT.P5.1	14	7,0	1.586,8	28,6	35,7	35,7
JT.P6.2	12	4,3	1.205,3	25,0	16,7	58,3
JT.P6.3	18	3,0	1.829,9	11,1	55,6	33,3
JT.P6.4	22	2,9	2.188,3	13,6	36,4	50,0
JT.P7.1	15	5,9	1.591,9	0,0	33,3	66,7
JT.P7.2	15	7,9	1.852,1	40,0	26,7	33,3
JT.P7.3	16	7,8	1.761,9	18,8	43,8	37,5
JT.P7.4	18	10,0	2.231,5	27,8	50,0	22,2
JT.P7.5	24	4,7	2.539,8	8,3	45,8	45,8
JT.P7.6	26	4,1	2.992,2	11,5	61,5	26,9
JT.P7.7	29	11,4	3.145,7	24,1	27,6	48,3

**Tabla 5.2.** *Características fisicoquímicas de los 27 péptidos sintéticos obtenidos a partir del TM parasitario. Se detalla el nombre del péptido, el largo de su secuencia, su punto isoeléctrico y masa molecular teórica, y su composición porcentual de aminoácidos polares cargados, polares neutros e hidrofóbicos.*

### 5.1.2. Solubilización de los péptidos sintéticos.

Los péptidos descritos en la **Tabla 5.1.** y **Tabla 5.2.** se sintetizaron a nivel comercial y se adquirieron en forma liofilizada (pureza >85,0%), por lo que se debió solubilizarlos para su uso siguiendo la estrategia descrita en el **ítem 2.5.** en base a las propiedades fisicoquímicas propias de cada uno.

En la **Tabla 5.3.** se detallan las principales características relevantes para la solubilización de los péptidos sintéticos derivados del SM parasitario obtenidos comercialmente. En particular, destaca el alto grado de pureza de los péptidos, alcanzando incluso valores del 100,0 % (péptido JS.P7.4). Asimismo, se observó que los valores de masa molecular experimentalmente reportada por el fabricante fueron muy similares a los previamente calculados de manera teórica (**Tabla 5.1.**).

Para el proceso de solubilización, el principal criterio aplicado fue la carga neta del péptido, asignada según se describió detalladamente en el **ítem 2.5.**, permitiendo clasificar los péptidos en básicos (carga neta >0), ácidos (carga neta <0) y neutros (carga neta =0). En este sentido, los 27 péptidos sintéticos obtenidos del SM parasitario se distribuyeron en 10 básicos, 12 ácidos y 5 neutros. Por ello, y siguiendo la estrategia descrita en el **ítem 2.5.**, los péptidos ácidos y básicos se disolvieron, inicialmente, en agua estéril; requiriendo 5 péptidos ácidos el agregado adicional de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (**Tabla 5.3.**). Es interesante destacar que, coincidentemente, dichos péptidos exhibieron, a su vez, una baja composición porcentual de aminoácidos polares cargados o bien, una alta composición porcentual de aminoácidos polares neutros y/o hidrofóbicos (**Tabla 5.1.**). Por su parte, los péptidos neutros se solubilizaron directamente en DMSO y, luego, se llevaron a volumen final con agua estéril. Finalmente, la mayoría de los péptidos sintéticos derivados del SM parasitarios se almacenaron a 2,0 mg/mL en alícuotas *stock*; a diferencia de JS.P2.1 (1,61 mg/mL), JS.P2.2 (1,61 mg/mL), JS.P7.P5 (1,71 mg/mL), JS.P7.P6 (1,63 mg/mL) y JS.P7.P7 (1,72 mg/mL).

<b>Péptido</b>	<b>Pureza (%)</b>	<b>Masa molecular experimental (g/mol)</b>	<b>Carga neta</b>	<b>Carácter</b>	<b>Solubilizado en (H<sub>2</sub>O:X)</b>	<b>Concentración de X en stock</b>
JS.P1.1	94,5	1.399,1	+1	Básico	-	-
JS.P1.2	91,2	2.059,4	-2	Ácido	-	-
JS.P1.3	92,6	2.335,3	0	Neutro	DMSO	24% (v/v)
JS.P1.4	95,9	2.932,8	+2	Básico	-	-
JS.P2.1	91,0	950,8	-1	Ácido	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	19 mM
JS.P2.2	94,1	1.278,6	-1	Ácido	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	20 mM
JS.P3.1	90,2	1.247,1	0	Neutro	DMSO	22% (v/v)
JS.P3.2	97,8	2.287,0	+1	Básico	-	-
JS.P4.1	98,1	1.238,5	0	Neutro	DMSO	16% (v/v)
JS.P4.2	86,7	1.327,3	-1	Ácido	-	-
JS.P4.3	97,1	1.412,4	+2	Básico	-	-
JS.P4.4	93,2	1.786,8	0	Neutro	DMSO	23% (v/v)
JS.P5.1	99,3	968,9	-1	Ácido	-	-
JS.P6.1	97,7	1.096,0	-4	Ácido	-	-
JS.P6.2	96,2	1.383,0	+5	Básico	-	-
JS.P7.1	99,1	1.143,0	+1	Básico	-	-
JS.P7.2	98,9	956,5	+3	Básico	-	-
JS.P7.3	92,3	1.099,9	0	Neutro	DMSO	20% (v/v)
JS.P7.4	100,0	1.543,1	-2	Ácido	-	-
JS.P7.5	93,6	1.780,2	-3	Ácido	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	14 mM
JS.P7.6	90,9	2.219,9	-4	Ácido	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	19 mM
JS.P7.7	89,4	2.313,6	-3	Ácido	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	17 mM
JS.P7.8	95,9	2.581,8	+5	Básico	-	-
JS.P7.9	85,5	3.180,3	+1	Básico	-	-
JS.P7.10	87,8	3.440,9	-6	Ácido	-	-
JS.P7.11	87,8	3.337,6	-6	Ácido	-	-
JS.P7.12	92,8	3.901,3	+3	Básico	-	-

**Tabla 5.3.** *Información experimental y teórica relacionada con la solubilización de los péptidos sintéticos derivados del SM parasitario.*

Por su parte, en la **Tabla 5.4.** se detallan las principales características relevantes para la solubilización de los péptidos sintéticos derivados del TM parasitario obtenidos comercialmente. Nuevamente, se destaca el alto grado de pureza de los péptidos, alcanzando niveles del 99,5% (péptido JT.P7.4); así como la concordancia entre los valores de masa molecular experimentalmente reportada por el fabricante y los valores previamente calculados de manera teórica (**Tabla 5.2.**).

Por otro lado, los 27 péptidos sintéticos obtenidos del TM parasitario se distribuyeron en 9 ácidos, 11 básicos y 7 neutros; y luego de seguir la misma estrategia de solubilización que para los péptidos sintéticos derivados del SM parasitario, solamente 2 péptidos ácidos requirieron del agregado adicional de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (**Tabla 5.4.**). En este caso, ambos péptidos se caracterizaron por exhibir una baja composición porcentual de aminoácidos polares cargados junto con una alta composición de aminoácidos polares neutros (**Tabla 5.2.**). Finalmente, la mayoría de los péptidos sintéticos derivados del TM parasitarios se almacenaron a 2,0 mg/mL en alícuotas *stock*; a diferencia de JT.P4.4 (1,65 mg/mL) y JT.P7.6 (1,69 mg/mL).

Por último, el péptido p176 se sintetizó con una pureza del 92,8%, mostrando un valor experimental de masa molecular de 4.380,7 g/mol. Por otro lado, su carga neta fue de -1 brindándole un carácter ácido, el cual fue compatible con una solubilización directa en agua estéril sin requerimientos adicionales de  $\text{NH}_4\text{CO}_3$ .

<b>Péptido</b>	<b>Pureza (%)</b>	<b>Masa molecular experimental (g/mol)</b>	<b>Carga neta</b>	<b>Carácter</b>	<b>Solubilizado en (H<sub>2</sub>O:X)</b>	<b>Concentración de X en stock</b>
JT.P1.2	96,0	1.419,7	0	Neutro	DMSO	22% (v/v)
JT.P1.3	99,3	1.395,3	+2	Básico	-	-
JT.P1.4	93,6	1.413,7	+3	Básico	-	-
JT.P1.5	96,2	1.962,2	-1	Ácido	-	-
JT.P1.6	87,8	2.402,0	-1	Ácido	-	-
JT.P2.1	87,9	1.427,4	+2	Básico	-	-
JT.P2.2	86,9	1.763,6	-3	Ácido	-	-
JT.P2.3	90,0	1.817,0	0	Neutro	DMSO	22% (v/v)
JT.P2.4	90,1	2.400,0	+2	Básico	-	-
JT.P3.1	92,7	1.138,5	+2	Básico	-	-
JT.P3.2	96,5	1.290,5	+3	Básico	-	-
JT.P3.3	99,4	1.410,6	0	Neutro	DMSO	22% (v/v)
JT.P3.4	87,9	1.961,7	-1	Ácido	-	-
JT.P4.3	98,1	1.230,5	+2	Básico	-	-
JT.P4.4	96,3	1.754,1	-1	Ácido	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	18 mM
JT.P4.5	94,5	2.154,3	0	Neutro	DMSO	20% (v/v)
JT.P5.1	97,8	1.588,7	0	Neutro	DMSO	15% (v/v)
JT.P6.2	92,8	1.205,7	-1	Ácido	-	-
JT.P6.3	91,5	1.831,1	-2	Ácido	-	-
JT.P6.4	86,3	2.189,1	-3	Ácido	-	-
JT.P7.1	99,0	1.592,1	0	Neutro	DMSO	19% (v/v)
JT.P7.2	96,3	1.852,9	+2	Básico	-	-
JT.P7.3	86,1	1.762,3	+1	Básico	-	-
JT.P7.4	99,5	2.231,6	+3	Básico	-	-
JT.P7.5	91,4	2.541,1	0	Neutro	DMSO	16% (v/v)
JT.P7.6	92,1	2.992,4	-1	Ácido	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	15 mM
JT.P7.7	98,1	3.145,8	+3	Básico	-	-

**Tabla 5.4.** Información experimental y teórica relacionada con la solubilización de los péptidos sintéticos derivados del TM parasitario.

## 5.2. Estudio del valor serodiagnóstico de los péptidos sintéticos en EQ humana.

El valor en serodiagnóstico de los péptidos sintéticos solubilizados se llevó a cabo mediante inmunoensayos del tipo ELISA indirecto, sensibilizando las placas con los péptidos sintéticos y determinando la presencia de anticuerpos humanos específicos del isotipo IgG. Para ello, y con el objetivo de identificar aquellos péptidos con un valor potencial para serodiagnóstico, en primer lugar, se realizó un estudio de *screening* con todos los péptidos sintéticos solubilizados. El mismo siguió una estrategia de *checkerboard* en formato ELISA, variando simultáneamente las concentraciones de sensibilización y las diluciones de muestra, para así obtener las condiciones experimentales de partida para los péptidos sintéticos más promisorios. Luego, para estos péptidos se optimizaron distintas condiciones del ensayo (incubación, revelado, etc.), y, finalmente, se evaluó su desempeño serodiagnóstico utilizando la seroteca previamente descrita.

### 5.2.1. *Screening* de los péptidos sintéticos mediante estrategia de *checkerboard*.

Para el *screening* primario realizado, se utilizó una mezcla (*pool*) compuesta por 95 muestras de suero provenientes de pacientes con EQ (*pool* positivo) y una mezcla compuesta por 88 muestras de suero provenientes de donantes sanos (*pool* negativo); en ambos casos realizadas con 1  $\mu$ L de suero de cada individuo. El *pool* positivo se generó con muestras de suero de pacientes con EQ confirmada por cirugía, mientras que para el *pool* negativo se utilizaron muestras de suero de individuos residentes en zona endémica para *E. granulosus* (Caraguatá, Tacuarembó) con resultados serológicos reportados negativos y estudio ecográfico abdominal no compatible para EQ. Estas últimas muestras se eligieron bajo el supuesto de que su uso haría más estricto el análisis de *screening*, ya que podrían contener anticuerpos específicos contra otros helmintos parásitos que suelen coexistir ambientalmente con *E. granulosus* y pueden generar reacciones cruzadas antígeno-anticuerpo. Las muestras de Caraguatá (Tacuarembó) fueron gentilmente cedidas por la Dra. Ana Hernández (Laboratorio de Inmunología, Facultad de Química/Facultad de Ciencias, Universidad de la República), correspondientes a un trabajo previamente publicado

por la investigadora [Hernández et al., 2005].

Como se mencionó previamente, el *screening* primario siguió una estrategia de *checkerboard* en formato ELISA indirecto para detectar la presencia de anticuerpos IgG específicos, variando simultáneamente las concentraciones de sensibilización (rango: 0,39-50,00 µg/mL) y las diluciones de muestra (rango: 1/100-1/3.200). De esta forma, establecimos que, aquellas combinaciones experimentales de concentración de antígeno y dilución de muestra, para cada péptido, que presentasen un valor  $>3$  (umbral) en el cociente entre la absorbancia del *pool* positivo (“señal”) y el *pool* negativo (“ruido”), cociente denominado p/n, continuarían con las siguientes etapas de optimización. El valor de dicho umbral se correspondió con una aproximación al poder de discriminación mínimo buscado entre muestras seropositivas y seronegativas.

Así, de los 54 péptidos sintéticos ensayados por *checkerboard*, 6 de ellos exhibieron al menos una combinación de concentración de antígeno y dilución de muestra que superó el umbral preestablecido: 5 péptidos derivados del SM (**Tabla 5.5.**) y 2 péptidos derivados del TM (**Tabla 5.6.**). En este sentido es interesante destacar que, tres de dichos péptidos (JS.P7.8, JS.P7.9 y JS.P7.12) derivaron de la misma proteína del SM parasitario, JS.P7, una proteína identificada como “hipotética” (**Tabla 4.1.**). Este hecho sugeriría que JS.P7 merecería ser estudiada en mayor detalle como un posible blanco para inmunodiagnóstico de EQ humana, más allá de los resultados obtenidos en la presente tesis con los péptidos sintéticos derivados de su secuencia.

<b>Péptido</b>	<b>p/n máximo</b>	<b>Concentración de Sensibilización (µg/mL)</b>	<b>Dilución de la muestra (1/dilución)</b>
JS.P1.2	3,66	3,13	800
JS.P1.1	1,45	1,56	3.200
JS.P1.3	1,55	1,56	800
JS.P1.4	1,94	6,25	1.600
JS.P2.1	1,33	12,50	1.600
JS.P2.2	1,75	0,78	1.600
JS.P3.1	2,39	0,39	800
JS.P3.2	2,10	25,00	800
JS.P4.1	2,22	1,56	3.200
JS.P4.2	2,24	3,13	3.200
JS.P4.3	1,43	6,25	3.200
JS.P4.4	1,79	50,00	800
JS.P5.1	2,59	12,50	3.200
JS.P6.1	2,63	3,13	3.200
JS.P6.2	2,78	0,78	3.200
JS.P7.1	1,97	50,00	400
JS.P7.2	1,01	0,39	200
JS.P7.3	1,33	50,00	3.200
JS.P7.4	1,13	0,39	400
JS.P7.5	1,34	25,00	1.600
JS.P7.6	1,83	12,50	3.200
JS.P7.7	1,57	12,50	3.200
JS.P7.8	9,29	0,78	800
JS.P7.9	5,93	25,00	1.600
JS.P7.10	1,84	25,00	1.600
JS.P7.11	1,65	25,00	1.600
JS.P7.12	5,30	12,50	800

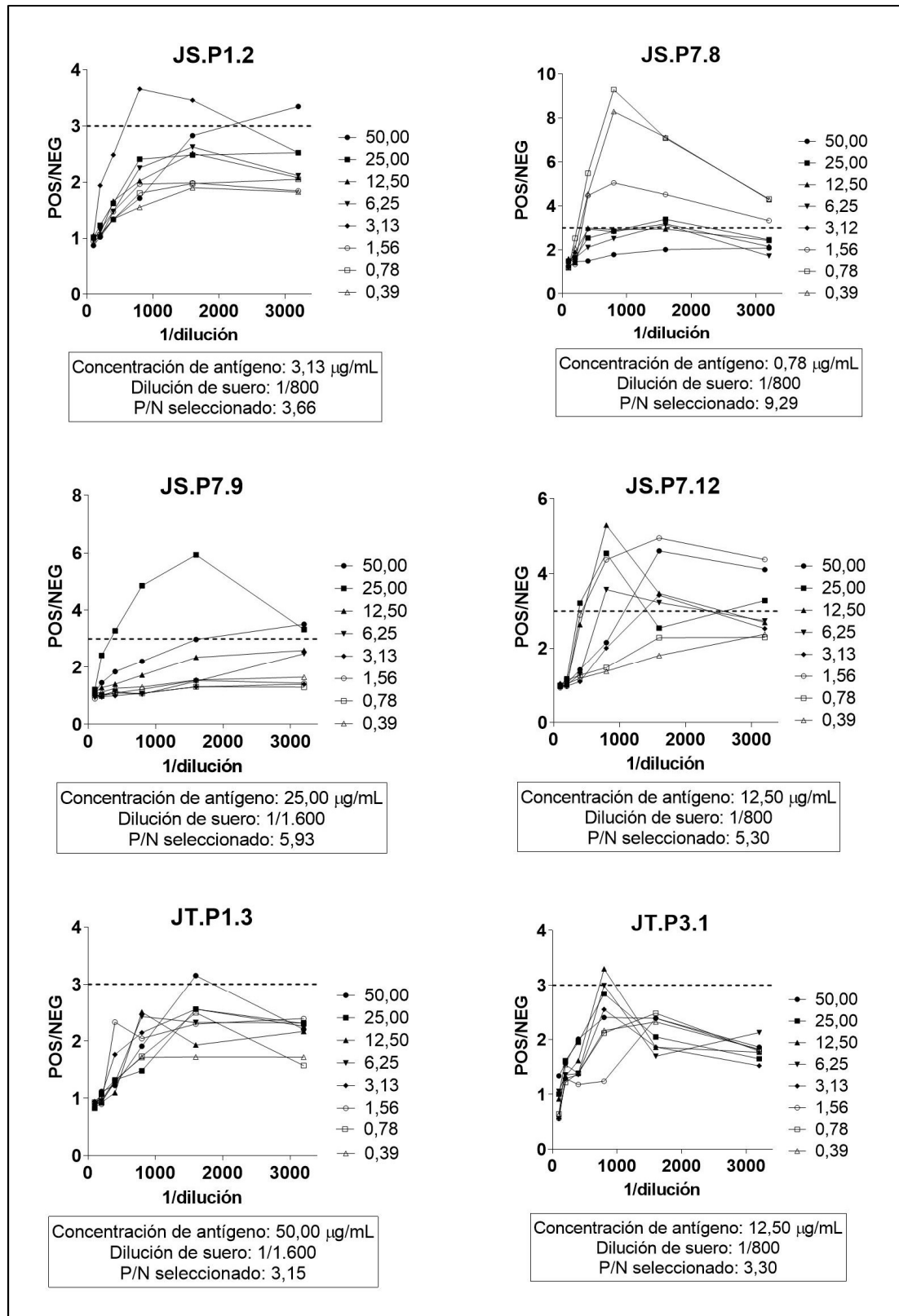
**Tabla 5.5.** *Resumen de los resultados obtenidos del estudio de checkerboard para los péptidos sintéticos derivados del SM parasitario. Se indica el máximo valor p/n alcanzado para cada péptido, y la combinación de concentración de sensibilización y dilución de muestras correspondiente.*

<b>Péptido</b>	<b>p/n máximo</b>	<b>Concentración de Sensibilización (µg/mL)</b>	<b>Dilución de la muestra (1/dilución)</b>
JT.P1.2	1,01	25,00	200
JT.P1.3	3,15	50,00	1.600
JT.P1.4	1,23	50,00	3.200
JT.P1.5	1,72	12,50	3.200
JT.P1.6	2,18	12,50	1.600
JT.P2.1	1,47	50,00	1.600
JT.P2.2	1,36	6,25	1.600
JT.P2.3	1,44	6,25	1.600
JT.P2.4	1,91	6,25	3.200
JT.P3.1	3,30	12,50	800
JT.P3.2	2,59	25,00	1.600
JT.P3.3	2,66	25,00	3.200
JT.P3.4	2,66	50,00	3.200
JT.P4.3	1,69	6,25	400
JT.P4.4	2,21	50,00	800
JT.P4.5	1,71	6,25	800
JT.P5.1	2,59	12,50	3.200
JT.P6.2	2,78	0,78	3.200
JT.P6.3	1,97	6,25	3.200
JT.P6.4	2,56	0,39	1.600
JT.P7.1	2,06	50,00	400
JT.P7.2	1,79	50,00	1.600
JT.P7.3	1,33	50,00	3.200
JT.P7.4	1,13	0,39	800
JT.P7.5	0,94	0,78	1.600
JT.P7.6	1,27	0,78	3.200
JT.P7.7	1,09	50,00	3.200

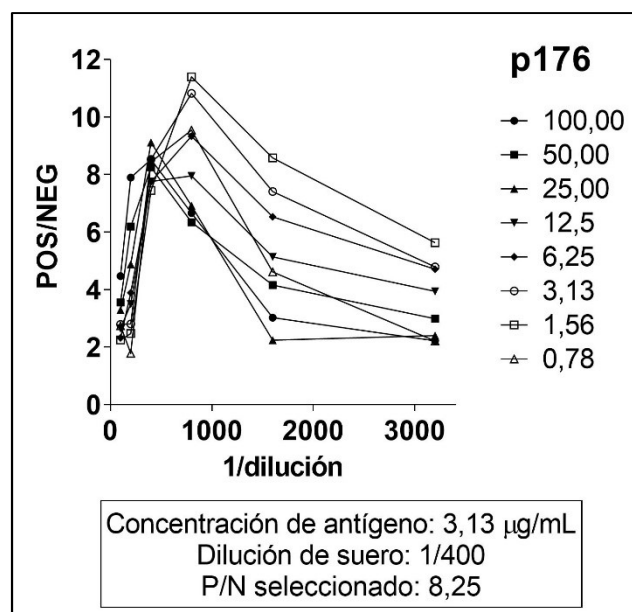
**Tabla 5.6.** *Resumen de los resultados obtenidos del estudio de checkerboard para los péptidos sintéticos derivados del TM parasitario. Se indica el máximo valor p/n alcanzado para cada péptido, y la combinación de concentración de sensibilización y dilución de muestras correspondiente.*

En la **Figura 5.1.** se detallan los valores p/n para los 6 péptidos sintéticos que exhibieron al menos una combinación que superó el umbral en el estudio de *checkerboard*. Allí, se muestra la variación en los valores p/n como función de las diluciones ensayadas para las muestras de suero, según cada concentración de antígeno utilizada en la sensibilización. En este sentido, se destaca que, debido a limitaciones en la disponibilidad de reactivos, los péptidos JS.P7.9 y JT.P1.3 no se incluyeron en las etapas posteriores de optimización ya que, si bien superaron el umbral en el estudio de *checkerboard*, solo lo hicieron a concentraciones de sensibilización >20 µg/mL (**Tabla 5.5., Tabla 5.6. y Figura 5.1.**).

Por su parte, en la **Figura 5.2.** se muestran los resultados del estudio de *checkerboard* obtenidos para el péptido sintético p176, donde se observa que los valores p/n fueron consistentemente superiores a los observados para cualquiera de los péptidos sintéticos derivados del SM y del TM (**Figura 5.1.**). En este sentido, cabe aclarar que si bien el valor p/n máximo obtenido para el péptido p176 fue de 11,39 (a una concentración de antígeno de 1,56 µg/mL y una dilución de muestras de 1/800), la combinación seleccionada para realizar los estudios posteriores de optimización fue de 3 µg/mL para la sensibilización y de 1/400 para la dilución de muestras. Esta decisión se tomó por ser estas últimas condiciones más similares a las reportadas previamente para dicho péptido: 5 µg/mL y 1/400 [[Gonzalez-Sapienza et al., 2000](#)]. Asimismo, en la combinación seleccionada, el valor p/n para p176 fue de 8,25; ampliamente superior al umbral preestablecido (**Figura 5.2.**).



**Figura 5.1.** Resultados de checkerboard para los 6 péptidos sintéticos que superaron el umbral establecido al menos en una de las condiciones ensayadas. Se grafican los valores p/n obtenidos como función de las distintas diluciones de suero para cada una de las concentraciones de sensibilización. En el recuadro que muestran las condiciones de partida seleccionadas para realizar la optimización de cada inmunoensayo.



**Figura 5.2.** Resultados de checkerboard para el péptido sintético p176. Se grafican los valores p/n obtenidos como función de las distintas diluciones de suero para cada una de las concentraciones de sensibilización. En el recuadro que muestran las condiciones de partida seleccionadas para realizar la optimización del inmunoensayo.

### 5.3. Optimización del ELISA para los péptidos sintéticos seleccionados por checkerboard.

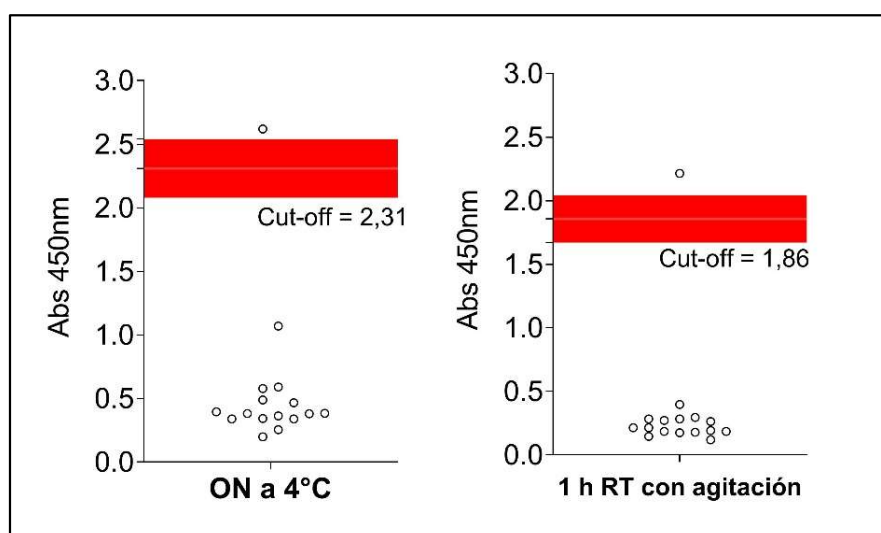
Para la etapa de optimización de los inmunoensayos en formato ELISA se trabajó, principalmente, con el péptido sintético p176 como antígeno de referencia, ya que el estudio de *checkerboard* evidenció su excelente capacidad para discriminar el *pool* de muestras positivas respecto del *pool* de muestras negativas (**Figura 5.2.**). Además, para estos estudios de optimización se utilizaron dos subpoblaciones de muestras de suero: (i) “población positiva representativa” (compuesta por 16 muestras de suero de pacientes con EQ confirmada por cirugía) y (ii) “población negativa representativa” (compuesta por 16 muestras de suero del grupo de individuos residentes en Caraguatá-Tacuarembó).

Así, en primer lugar, se probaron diferentes condiciones generales relacionadas con la incubación de las muestras (tiempos, temperaturas y utilidad de incorporación de un agente caotrópico), utilizando el péptido sintético p176 como antígeno. Luego, y partiendo de estos resultados, se ensayaron mejoras específicas en los pasos de cada inmunoensayo utilizando los péptidos sintéticos seleccionados.

### 5.3.1. Optimización del ELISA: Incubación de las muestras.

En primer lugar, se ensayaron diferentes condiciones relacionadas con la incubación de las muestras: (i) tiempos (*overnight*, O.N. vs. 1 h), (ii) temperaturas (4°C vs. temperatura ambiente, TA), y (iii) utilidad de incorporación de un agente caotrópico (urea 1 M); utilizando el péptido sintético p176 como antígeno siguiendo las condiciones seleccionadas previamente (concentración de antígeno: 3 µg/mL y dilución de muestras: 1/400). Las incubaciones con tiempos reducidos (1 hora) y a mayores temperaturas (TA) buscaron minimizar las interacciones inespecíficas presentes en el ensayo, de forma tal que los valores de *cut-off* fuesen lo más bajo posibles. Por otra parte, la utilización de un agente caotrópico como la urea, se evaluó para debilitar las uniones antígeno-anticuerpo de baja afinidad, ya que los agentes caotrópicos desestabilizan las interacciones existentes del tipo enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals.

Así se ensayaron en primer lugar las siguientes condiciones de incubación de las muestras: (i) O.N. a 4°C sin agitación y (ii) 1 h a TA con agitación. Estas condiciones se ensayaron inicialmente sobre las muestras de suero de “población negativa representativa” diluidas 1/400. Como se observa en la **Figura 5.3**, la incubación de las muestras durante 1 h a TA con agitación disminuyó el valor de *cut-off* del ensayo en relación con los resultados obtenidos mediante incubación O.N. a 4°C.

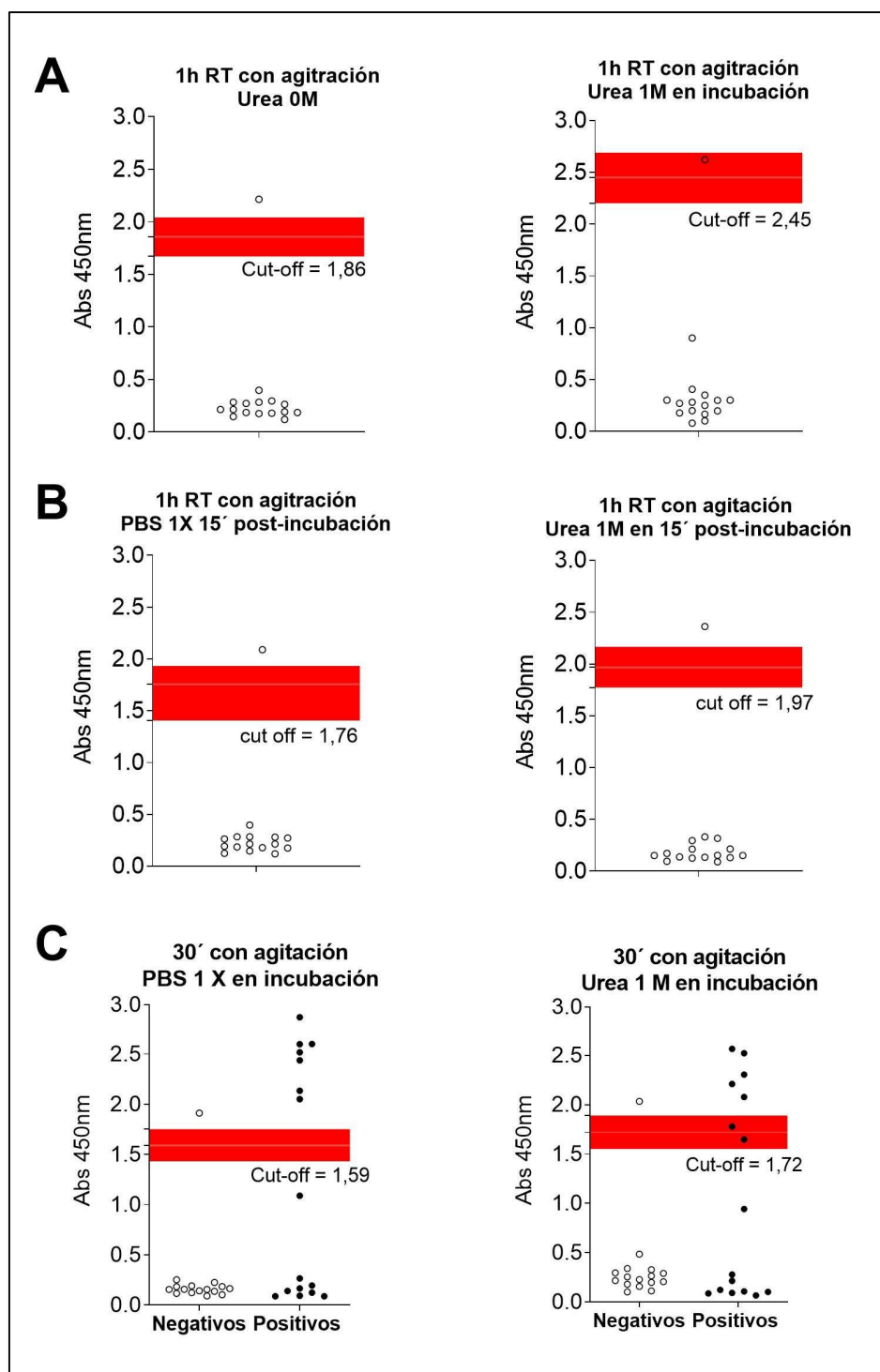


**Figura 5.3.** Optimización de las condiciones de incubación de las muestras de suero en el ensayo de ELISA utilizando el péptido sintético p176 como sistema modelo y los 16 sueros de la población representativa negativa. Evaluación de la temperatura y el tiempo de incubación sobre el valor de *cut-off* del ensayo.

A continuación, se evaluaron las siguientes condiciones: (iii) 1 h a TA con agitación en presencia de urea 1 M, (iv) 1 h a TA con agitación seguida de una incubación durante 15 min en presencia de urea 1M, y (v) incubación de las muestras durante 30 min en presencia de urea 1 M. Entre los resultados obtenidos, se observó que tanto la incorporación de urea 1 M en la solución de incubación (**Figura 5.4a**) como el agregado de un paso adicional de incubación durante 15 min en presencia de urea 1 M en PBS (**Figura 5.4b**), no resultaron de utilidad para nuestros objetivos, ya que aumentaron la reactividad de las muestras de suero de la “población negativa representativa”.

El hecho que la incubación en presencia de urea 1 M aumentase la reactividad de las muestras de suero de la “población negativa representativa”, en principio, afectaría negativamente el poder de discriminación del inmunoensayo; salvo que se observase un efecto similar, pero de mayor intensidad, sobre las muestras de suero de la “población positiva representativa”. Por ello, y utilizando ambas “poblaciones representativas” diluidas 1/400, se ensayó la incorporación de urea 1 M durante la incubación de las muestras durante 30 min a TA con agitación (**Figura 5.4c**). En esa ocasión, los resultados obtenidos mostraron que la presencia de urea 1 M durante la incubación (30 min, TA) nuevamente afectó negativamente el valor de *cut-off* del ensayo, sin una compensación importante sobre la reactividad de las muestras de suero de la “población positiva representativa”. Así, la presencia de urea 1 M durante la etapa de incubación de las muestras, disminuyó la sensibilidad del inmunoensayo; y por ello, su uso se excluyó de las etapas posteriores de optimización.

En suma, los estudios de puesta a punto del inmunoensayo en formato ELISA realizados sobre la etapa de incubación de las muestras, permitieron seleccionar las siguientes condiciones para continuar con el proceso de optimización: 1 h de incubación de las muestras a TA con agitación, en ausencia de agente caotrópico (urea 1M).



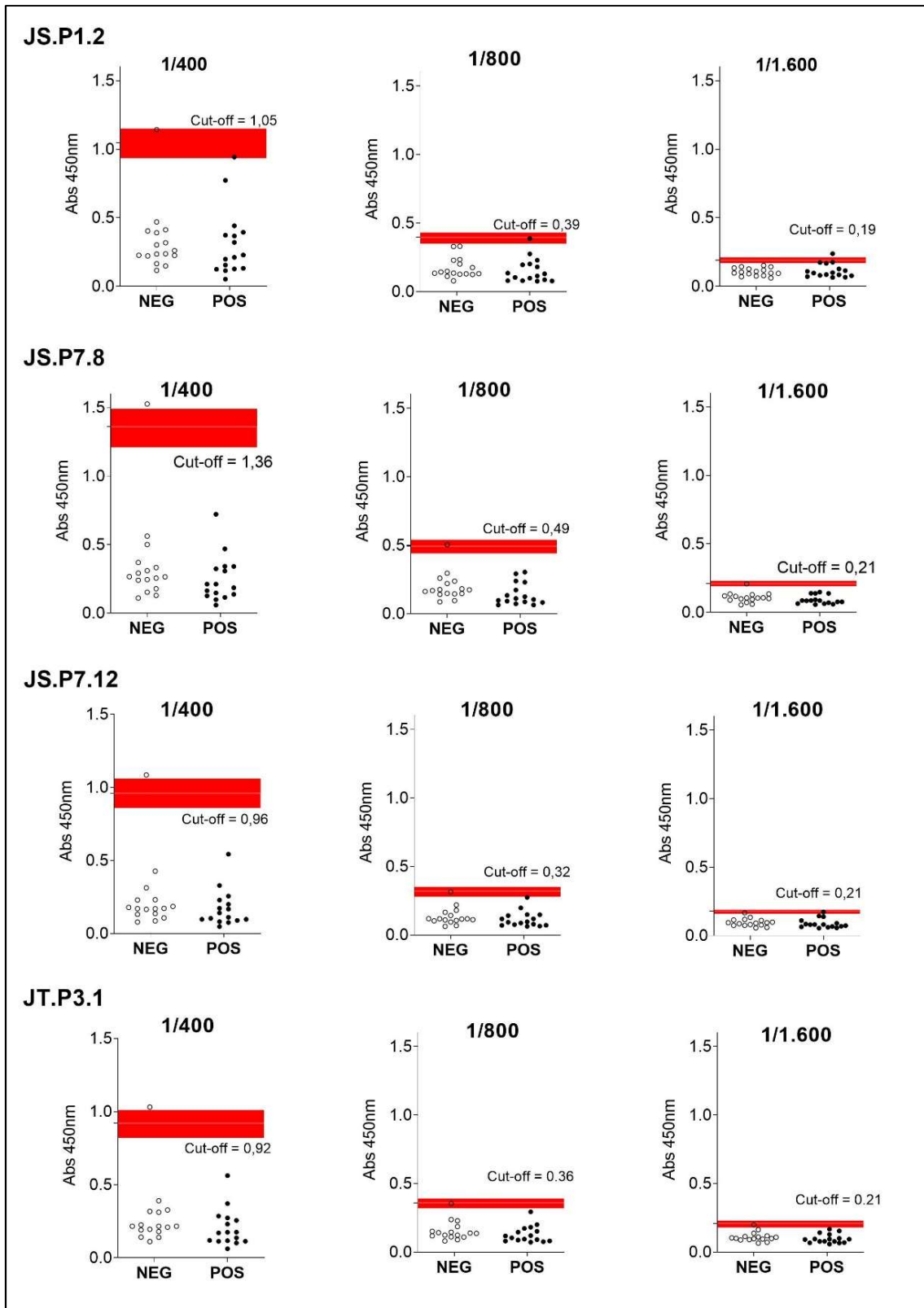
**Figura 5.4.** Optimización de las condiciones de incubación de las muestras de suero en el ensayo de ELISA utilizando el péptido sintético p176 como sistema modelo. En las figuras (a) y (b) se utilizaron los 16 sueros de la población representativa negativa, mientras que en la figura (c) se utilizaron también los 16 sueros representativos positivos. Así, en la figura (a) se evaluó la adición urea 1 M en el momento de la incubación de las muestras, en la figura (b) se evaluó la capacidad de añadir urea 1 M luego de la incubación de las muestras con PBS 1x durante 1 hora por un periodo de 15 minutos, mientras que en la figura (c) se evaluó la incorporación de urea 1 M durante 30 minutos en el momento de la incubación.

### 5.3.2. Optimización del ELISA: Dilución de muestras.

Luego de optimizar las condiciones del inmunoensayo en formato ELISA sobre la etapa de incubación de las muestras, se ensayaron diferentes diluciones de las muestras en el paso de incubación de las mismas. El objetivo de este estudio fue determinar la dilución óptima de las muestras de suero a utilizar para cada uno de los péptidos sintéticos seleccionados. Para ello, se trabajó nuevamente con ambas selecciones de sueros representativos: “población positiva representativa” y “población negativa representativa”, utilizando las condiciones de incubación previamente determinadas (1 h de incubación a TA con agitación y sin agente caotrópico).

En este caso, se trabajó con todos los péptidos sintéticos seleccionados del *screening* por *checkerboard*; es decir, aquellos que mostraron al menos una combinación entre concentración de sensibilización y dilución de la muestra con valor  $p/n > 3$ , y cuyas concentraciones de sensibilización correspondientes fuesen  $< 20 \mu\text{g/mL}$ . A su vez, para aquellos péptidos que presentaron valores  $p/n > 3$  en más de una combinación, se seleccionó aquella que exhibió el mayor valor  $p/n$  (**Figura 5.1**). Así, se trabajó con cuatro péptidos sintéticos: tres derivados del SM parasitario (JS.P1.2, JS.P7.8 y JS.P7.12) (**Tabla 5.5**) y uno derivado del TM parasitario (JT.P3.1) (**Tabla 5.6**).

En la **Figura 5.5**, se muestran los resultados obtenidos del análisis para los cuatro péptidos sintéticos provenientes del SM y del TM parasitario que alcanzaron esta etapa del trabajo. En todos los casos, la dilución de muestra de suero utilizada como referencia se correspondió con la seleccionada del estudio de *screening* mediante *checkerboard* (**Figura 5.1**) y, a partir de ella, se ensayaron dos diluciones seriadas adicionales: una mayor y otra menor. Dado que para los cuatro péptidos sintéticos la dilución de muestra de referencia se correspondió a 1/800, en todos los casos se ensayaron las diluciones 1/400, 1/800 y 1/1.600.



**Figura 5.5.** Estudio de tres diluciones seriadas de suero para los distintos péptidos seleccionados (1/400, 1/800 y 1/1.600). Para este ensayo se trabajó con los 16 sueros representativos de zona endémica y los 16 sueros positivos con EQ.

A diferencia de lo observado en las etapas previas de trabajo con el uso de *pooles*, los resultados obtenidos no lograron discriminar eficientemente entre las muestras de suero de la “población positiva representativa” y la “población negativa representativa”, en ninguna de las tres diluciones ensayadas para los cuatro péptidos sintéticos en estudio (**Figura 5.5**). Sin embargo, y dado que la reactividad observada para las muestras de suero de la “población positiva representativa” fue mayor al trabajar con la dilución 1/400, se seleccionó dicha condición para utilizar en los siguientes pasos de optimización del inmunoensayo.

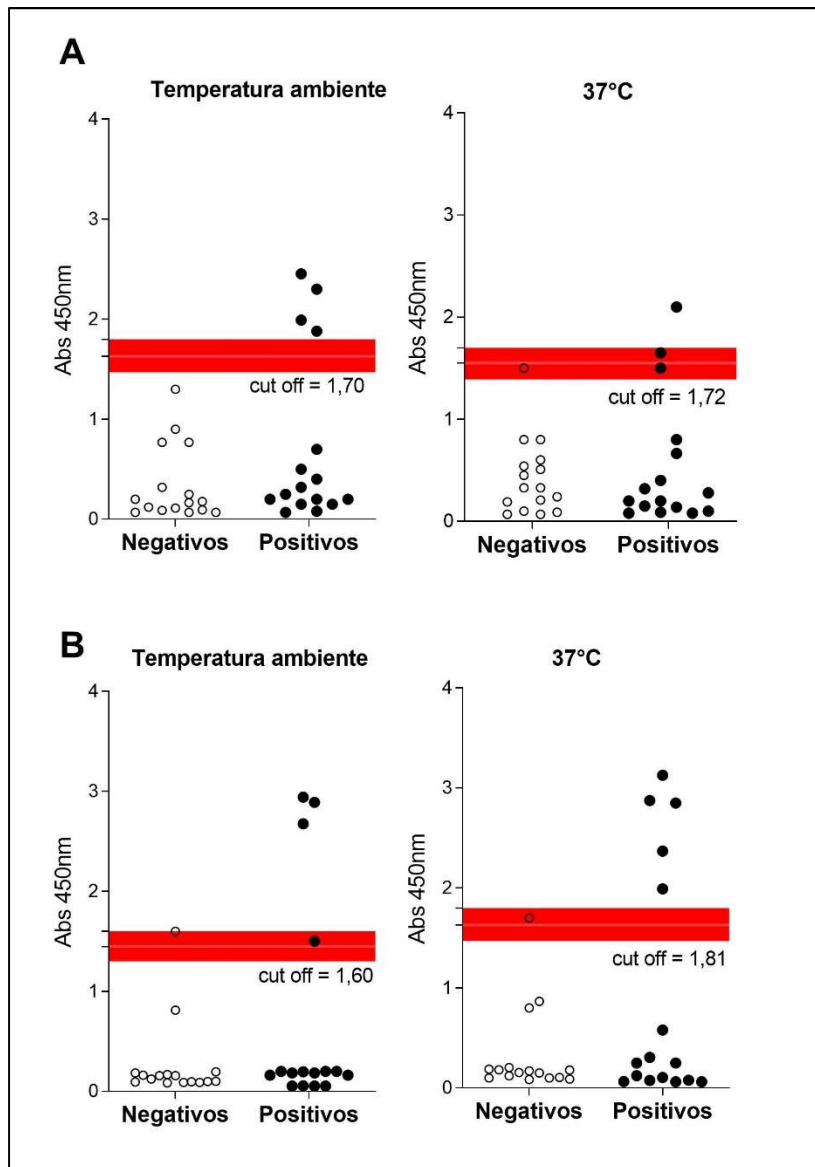
### **5.3.3. Optimización del ELISA: Revelado.**

Por último, y utilizando nuevamente el péptido sintético p176 como antígeno de referencia (concentración de sensibilización: 3 µg/mL), se ensayaron diferentes condiciones relacionadas con la temperatura en las etapas finales del inmunoensayo en formato ELISA, tanto asociada con la incubación del conjugado enzimático, como con el revelado. El objetivo de estas optimizaciones fue determinar las mejores condiciones de temperatura que permitiesen discriminar entre muestras positivas y negativas para EQ. Para ello, se utilizaron las muestras de suero de la “población positiva representativa” y de la “población negativa representativa” diluidas 1/400 e incubadas durante 1 h a TA con agitación y sin agente caotrópico (**Figura 5.6**).

En primer lugar, se optimizó la etapa de incubación del conjugado enzimático durante 1 h ensayando dos temperaturas: TA vs. 37°C. Cabe destacar que la etapa de revelado en ambos casos se realizó durante 10 min a TA. Como se observa en la **Figura 5.6a**, la incubación del conjugado enzimático a TA permitió detectar una mayor cantidad de muestras de suero de la “población positiva representativa” en relación con la incubación realizada a 37°C.

En segundo lugar, se optimizó la etapa de revelado durante 10 min ensayando, nuevamente, dos temperaturas: TA vs. 37°C. En ambos ensayos, la incubación del conjugado enzimático durante 1 h se realizó a TA. En este caso, los resultados reportados en la **Figura 5.6b** muestran que el revelado del inmunoensayo durante 10 min a 37°C aumentó la detección de muestras de suero de la “población positiva representativa” en relación con el ensayo de revelado realizado a TA.

En suma, los estudios de puesta a punto del inmunoensayo en formato ELISA realizados sobre sus etapas finales, permitieron seleccionar la incubación del conjugado enzimático durante 1 h a TA como la situación óptima. Asimismo, los estudios realizados sobre la etapa final de revelado, permitieron seleccionar los parámetros de 10 min a 37°C como los más adecuados para los inmunoensayos en desarrollo.



**Figura 5.6.** Estudio de condiciones de temperatura de conjugado y revelado para el péptido p176. En la **Figura (a)** se observan las distintas temperaturas ensayadas para el tiempo de conjugado aplicado durante 1 hora (temperatura ambiente vs 37°C). Por su parte en la **Figura (b)** se detallan las distintas temperaturas ensayadas para el tiempo de revelado aplicado durante 10 minutos (temperatura ambiente vs 37°C). Para este ensayo se trabajó con los 16 sueros representativos de zona endémica y los 16 sueros positivos con EQ.

#### 5.4. Evaluación del desempeño diagnóstico de los péptidos sintéticos seleccionados.

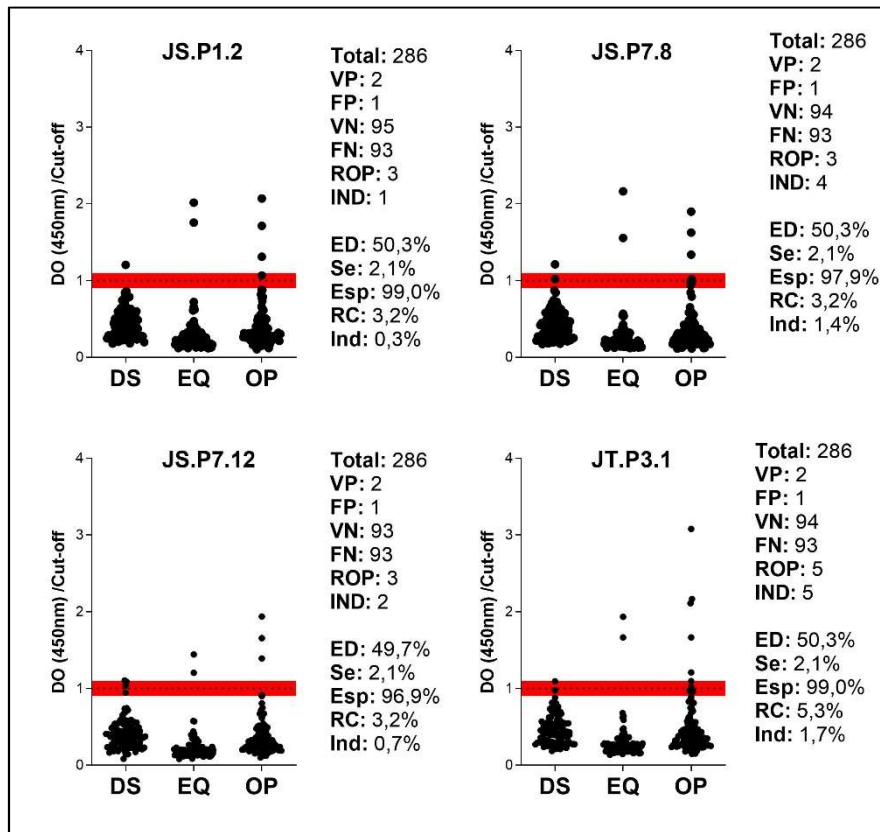
La evaluación del desempeño diagnóstico de los cuatro péptidos sintéticos seleccionados por haber superado las distintas etapas del flujo de trabajo propuesto, se realizó utilizando la seroteca completa descrita en la sección 2.1.1. y aplicando las condiciones experimentales optimizadas en el presente capítulo; a saber:

- La sensibilización de las placas se realizó O.N. a 4°C (sin agitación) utilizando los péptidos diluidos en *buffer* carbonato/bicarbonato pH = 9,6 en las siguientes concentraciones: JS.P1.2 = 3 µg/mL, JS.P7.8 = 1 µg/mL, JS.P7.12 y JT.P3.1 = 12 µg/mL.
- La incubación de las muestras, en todos los casos, se realizó a dilución 1/400 (en ausencia de agente caotrópico) durante 1 h a TA con agitación continua.
- El conjugado enzimático (diluido 1/10.000 según recomendaciones del fabricante) se incubó durante 1 h a TA, mientras que el revelado se desarrolló durante 10 min a 37°C; en ambos casos sin agitación.

En la **Figura 5.7.** se muestran los resultados obtenidos para el desempeño inmunodiagnóstico en EQ humana por parte de los cuatro péptidos sintéticos seleccionados. En este sentido, los valores de especificidad diagnóstica para los cuatro péptidos sintéticos estuvieron en el rango 96,9-99,0%, mientras que los valores de reactividad cruzada oscilaron en el rango 3,2-5,3%. Ambos rangos de valores fueron comparables tanto con los reportados por el fabricante del *kit* comercial Vircell® (especificidad = 96,9% y reactividad cruzada = 0,0%), como con los obtenidos en la caracterización de la seroteca conformada en la presente tesis (ítem 3.2.2., especificidad = 90,6% y reactividad cruzada = 5,3%).

Por su parte, los porcentajes de indeterminación variaron desde 0,3% a 1,7% según el péptido utilizado; también en línea con los valores obtenidos en la caracterización de la seroteca utilizada (ítem 3.2.2., indeterminación = 0,7%). Cabe aclarar que el valor de indeterminación no pudo compararse con los datos del *kit* comercial ya que dichos datos fueron excluidos de los cálculos finales reportados por el fabricante.

Por último, los cuatro péptidos sintéticos seleccionados mostraron un muy mal desempeño en términos de sensibilidad diagnóstica: 2,1% en todos los casos (**Figura 5.7.**); un valor largamente distante tanto del 97,0% reportado por el fabricante del *kit* comercial, como del obtenido en la caracterización de la seroteca utilizada (ítem 3.2.2., sensibilidad = 77,9%).



**Figura 5.7.** Evaluación del desempeño diagnóstica en EQ humana para los péptidos sintéticos que superaron el flujo de trabajo aplicado a la optimización de los inmunoensayos. Este análisis se realizó con la seroteca completa descrita en 2.1. DS; donantes sanos, EQ; pacientes con EQ, OP; pacientes con otras parasitosis. Para cada péptido se muestra la distribución de los resultados por grupo y los valores de los distintos parámetros diagnósticos.

En suma, el desempeño inmunodiagnóstico en EQ humana por parte de los cuatro péptidos sintéticos seleccionados, y utilizando la seroteca completa (descrita y caracterizada en el **Capítulo 3** de la presente tesis), fue muy bueno en términos de especificidad, reactividad cruzada e indeterminación, pero pésimo en términos de sensibilidad. Así, el valor de eficiencia diagnóstica para cualquiera de los cuatro péptidos sintéticos osciló entre 49,7% y 50,3% (**Figura 5.7.**); valores muy inferiores al 84,3% determinado para el *kit* comercial Vircell® utilizando la misma seroteca (ítem 3.2.2.).

## CAPÍTULO 6.

### ***Péptidos derivados de antígenos comúnmente utilizados en serología para EQ: Identificación in silico y evaluación experimental de su valor inmunodiagnóstico.***

#### **Resultados y discusión**

A continuación, se presentan los principales resultados obtenidos relacionados tanto con la identificación *in silico* de péptidos derivados de la secuencia de los antígenos parasitarios comúnmente utilizados en inmunodiagnóstico para EQ humana (AgB y Ag5), así como con la evaluación experimental de su valor serodiagnóstico (Objetivo específico #4).

Los antígenos AgB y Ag5 son las principales proteínas parasitarias utilizadas en inmunodiagnóstico de EQ humana. Sin embargo, la estrategia inmuno-bio-informática desarrollada y aplicada en la presente tesis no permitió identificar péptidos potencialmente útiles en serodiagnóstico a partir de sus secuencias. En cuanto a las distintas subunidades del AgB (familia proteica de codificación multigénica: AgB<sub>1</sub>, AgB<sub>2</sub>, AgB<sub>3</sub>, AgB<sub>4</sub> y AgB<sub>5</sub>), las mismas se identificaron efectivamente dentro del SM parasitario predicho en el **Capítulo 4**, ya que presentaron una única RTM (*TMHMM v2.0*) con presencia de péptido señal (*Phobius*) y de secreción por vía clásica (*SignalP v5.0*). A su vez, no presentaron señal de exportación al RE (*PScan*), ni señales de exportación mitocondrial (*TargetP v2.0*) ni de anclaje GPI (*PredGPI*). Sin embargo, al momento de realizar la predicción de antigenicidad mediante el uso del software *AntigenPro*, ninguna de las subunidades del AgB superó el *score* establecido como umbral, por lo que se eliminaron en dicho punto del flujo de trabajo inmuno-bio-informático. Por su parte, el Ag5 no se identificó dentro del SM o TM parasitario predicho en el **Capítulo 4**. En este sentido, si bien el Ag5 presentó una única RTM (*TMHMM v2.0*), una secuencia de péptido señal (*Phobius*) y una exportación por vía clásica (*SignalP v5.0*), también presentó una señal de exportación al RE (*PScan*); motivo por el cual no se incluyó dentro del SM parasitario predicho.

En base a lo mencionado anteriormente, en el presente capítulo se describen los resultados obtenidos al aplicar diversas predicciones *in silico* sobre la secuencia de las distintas subunidades del AgB y del Ag5. Para ello, partiendo de sus secuencias

aminoacídicas se realizó -únicamente- la predicción de EBL mediante el uso del software *Bepipred v2.0* y se eliminaron aquellos con 100% de homología e identidad contra cualquier secuencia aminoacídica presente en la base de datos NCBI; excluyendo los filos Nematodo y Platelmino. Una vez identificados y seleccionados los EBL de interés, los péptidos correspondientes se sintetizaron a nivel comercial y se realizó la evaluación de su potencial uso serodiagnóstico en EQ humana siguiendo la estrategia desarrollada en el **Capítulo 5**. Por otro lado, se realizó además un estudio sistemático del desempeño inmunodiagnóstico del AgB<sub>1</sub> producido de manera recombinante en sistema eucariota y de diversos péptidos sintéticos (previamente reportados o diseñados en la presente tesis) derivados de su secuencia aminoacídica.

***Objetivo específico #4.** Identificar in silico péptidos derivados de antígenos comúnmente utilizados en serología para EQ y evaluar su potencial diagnóstico.*

## 6.1. Identificación *in silico* de péptidos con potencial valor serodiagnóstico derivados de los antígenos parasitarios Ag5 y AgB.

En primer lugar, se localizaron las secuencias del Ag5 y de las distintas subunidades del AgB dentro del proteoma parasitario utilizado en el desarrollo de esta tesis. Para ello, se identificaron las secuencias de los antígenos de interés en bibliografía [Muzulin et al., 2008], y con ellas se realizó un análisis de homología mediante *BlastP* contra las 10.273 proteínas del proteoma parasitario completo (Capítulo 4). Los resultados correspondientes se reportan en la **Tabla 6.1.**, donde se detalla el largo de las secuencias (en aminoácidos) y sus códigos de acceso obtenidos mediante bibliografía en NCBI, así como también, el número de acceso y el largo de las secuencias (en aminoácidos) para las proteínas identificadas en el proteoma. Asimismo, se detalla el porcentaje de identidad y de cobertura obtenido entre ambas secuencias. En este sentido, cabe destacar que ambos parámetros fueron del 100% para 5 de las 6 proteínas en estudio; mientras que para AgB<sub>3</sub> el porcentaje de identidad fue del 100% pero el de cobertura fue del 92% respecto de la secuencia homóloga presente en el proteoma del parásito. Este hecho podría deberse a que las subunidades del AgB, además de corresponder a una familia proteica de codificación multigénica, presentan niveles importantes de polimorfismo poblacional [Muzulin et al., 2008], por lo que las secuencias analizadas del AgB<sub>3</sub> podrían corresponderse con distintos polimorfismos naturales.

Proteína	Largo (NCBI)	ID secuencia (NCBI)	Número Acceso (proteoma)	Largo (Proteoma)	Identidad (%)	Cobertura (%)
Ag5	484	XP_024351500.1	EgrG_000184900	484	100	100
AgB <sub>1</sub>	85	XP_024349594.1	EgrG_000381200	85	100	100
AgB <sub>2</sub>	90	AAC37265.1	EgrG_000381100	90	100	100
AgB <sub>3</sub>	81	AAW78432.1	EgrG_000381600	88	100	92
AgB <sub>4</sub>	90	CDS24103.1	EgrG_000381400	90	100	100
AgB <sub>5</sub>	68	CDS24106.1	EgrG_000381700	68	100	100

**Tabla 6.1.** Resumen de las principales características del *Blastp* realizado para las subunidades del AgB y el Ag5 entre las proteínas seleccionadas por bibliografía y las *matcheadas* en el proteoma.

Luego, se realizó la predicción de EBL utilizando el software *Bepipred v2.0* sobre las secuencias aminoacídicas del Ag5 y de las subunidades del AgB presentes en el proteoma parasitario utilizado en la presente tesis. A continuación, se analizó la homología de los EBL predichos mediante *BlastP* nuevamente descartando aquellos que presentasen un porcentaje de identidad del 100% contra cualquier proteína presente en la base de datos de NCBI; con la excepción de los filos Nematodo y Platelmino. En la **Tabla 6.2.** se detalla el número total de EBL predichos para cada proteína, así como el número de estos que continuó el estudio. En este sentido, destacamos que, si bien en la secuencia de AgB<sub>5</sub> se predijo un único EBL, el mismo se descartó en los pasos siguientes del trabajo ya que presentó un 100% de identidad y cobertura con la secuencia de una proteína de *Plasmodium yoelii* (XP\_726173.3). Por su parte cabe recordar que, al momento de realizar las actividades del presente capítulo de la tesis, nuestro grupo ya había publicado un trabajo experimental de identificación proteómica de PTM presentes en proteínas de *E. granulosus* s.l. [Miles et al., 2017]. Por ello, se decidió no realizar análisis teóricos de posibles sitios para PTM como en capítulos anteriores dado que el panel aplicado o bien predecía diversas PTM que no fueron identificadas experimentalmente, o bien no predecía otras que sí fueron descriptas (**Tabla 4.3.**).

Proteína	EBL	EBL (*ID & COB)
AgB <sub>1</sub>	2	2
AgB <sub>2</sub>	3	3
AgB <sub>3</sub>	2	2
AgB <sub>4</sub>	3	3
AgB <sub>5</sub>	1	0
Ag5	6	5
<b>Total</b>	<b>17</b>	<b>15</b>

**Tabla 6.2.** Número de péptidos predichos para las subunidades del AgB y para el Ag5. Se detallan la cantidad de péptidos predichos en *Bepipred*, y los que continúan luego del análisis de homología por *Blastp*.

Los 15 EBL seleccionados se describen en la **Tabla 6.3.**, donde se detalla el número de acceso de la proteína que dio origen a cada uno, así como el nombre asignado a cada EBL, su largo (en aminoácidos) y su secuencia. Nuevamente, se utilizaron códigos de simplificación para los péptidos seleccionados. En el caso de los péptidos provenientes del AgB los mismos se identificaron como B# (siendo # un número del 1 al 5, según la subunidad antigénica correspondiente), más una letra final que distingue los distintos EBL provenientes de cada subunidad. Por su parte, los péptidos provenientes del Ag5 se identificaron con el número 5 seguido de una letra de diferenciación entre EBL distintos (A, B, C, D o E).

Como se observa en la **Tabla 6.3.**, la mayoría de los EBL seleccionados se correspondió con péptidos relativamente cortos, con largos que oscilaron entre 9-16 aminoácidos; a excepción de los péptidos correspondientes a los EBL 5.A y 5.C que presentaron largos de 21 y 25 aminoácidos, respectivamente. En suma, se identificaron 15 EBL de interés a partir de la secuencia de las principales proteínas antigénicas utilizadas en inmunodiagnóstico de EQ humana (Ag5 y subunidades del AgB).

<b>Número de acceso</b>	<b>Proteína</b>	<b>Péptido</b>	<b>Largo (a.a.)</b>	<b>Secuencia peptídica (N-C)</b>
EgrG_000381200	AgB <sub>1</sub>	B1.A	11	GLTSTSRVMK
		B1.B	11	YFFERDPLGQK
EgrG_000381100	AgB <sub>2</sub>	B2.A	16	EPKAHMGQVVKKRWGE
		B2.B	13	KKYVKNLVEEKDD
		B2.C	10	DFFRNDPLGQ
EgrG_000381600	AgB <sub>3</sub>	B3.A	15	DDDDEVTKTKKGVMK
		B3.B	11	HFFQSDPLGKK
EgrG_000381400	AgB <sub>4</sub>	B4.A	12	AEPERCKCLIMR
		B4.B	10	VKDLLEEDE
		B4.C	9	FFRSPLGQ
EgrG_000381700	Ag5	5.A	21	ELVKAQRESHGGFYFYDSNGA
		5.B	17	AANYNASEGLTRLKSEN
		5.C	25	KPIFGSSNALPFGIPAPLNTDEMKP
		5.D	11	EGTRTRNEQES
		5.E	10	PDWVAQRVDS

**Tabla 6.3.** *Secuencias de los péptidos diseñados. Se detalla el número de acceso de la proteína de la cual se sintetizó, el nombre de la proteína, el código del péptido, el largo y su secuencia aminoacídica.*

## **6.2. Caracterización de los péptidos seleccionados derivados del Ag5 y AgB.**

De igual manera a como se describió en la **sección 5.1.** de la presente tesis, los EBL seleccionados se sintetizaron a nivel comercial y se caracterizaron en términos de sus propiedades físicoquímicas para, por un lado, optimizar el algoritmo empírico de solubilización, así como para luego, poder correlacionar dichas características con la posible utilidad serodiagnóstica de cada péptido.

### 6.2.1. Análisis de las propiedades fisicoquímicas de los péptidos seleccionados.

Siguiendo el mismo esquema de análisis aplicado previamente, los péptidos seleccionados se caracterizaron en términos de punto isoeléctrico (pI) y masa molecular (g/mol) teóricas (calculados utilizando el software *web.expasy.org*), y de porcentaje de aminoácidos constituyentes: polares (cargados vs. neutros) e hidrofóbicos. Los resultados de dichos análisis para los péptidos derivados del AgB y del Ag5 se detallan en la **Tabla 6.4.**, donde se observa que el rango de sus masas moleculares teóricas osciló desde 1.066,2 g/mol hasta 2.642,1 g/mol. Por su parte, en términos de pI, la mayoría de los péptidos seleccionados (11/15) presentaron valores <7, mientras que el resto (4/15) mostró valores de pI >7. Por último, el rango de valores de composición porcentual de ciertos tipos de aminoácidos mostró ser altamente variable entre los distintos péptidos sintéticos: aminoácidos polares cargados (16,0-70,0%), aminoácidos polares neutros (0,0-58,8%) y aminoácidos hidrofóbicos (0,0-36,4%); un dato relevante a la hora de proceder con su solubilización.

Péptido	pI	Masa molecular teórica (g/mol)	Composición de a.a. (%)		
			Polares cargados	Polares neutros	Hidrofóbicos
B1,A	11,0	1.166,4	18,2	54,5	27,3
B1,B	6,1	1.399,6	36,4	27,3	36,4
B2,A	9,7	1.880,2	43,8	31,3	25,0
B2,B	6,2	1.607,8	61,5	7,7	30,8
B2,C	4,2	1.208,3	30,0	40,0	30,0
B3,A	4,8	1.708,9	60,0	20,0	20,0
B3,B	8,6	1.303,5	36,4	36,4	27,3
B4,A	8,1	1.448,8	41,7	33,3	25,0
B4,B	3,8	1.218,3	70,0	0,0	30,0
B4,C	5,8	1.066,2	22,2	44,4	33,3
5,A	5,5	2.375,5	28,6	42,9	28,6
5,B	6,2	1.838,0	23,5	58,8	17,6
5,C	6,1	2.642,1	16,0	56,0	28,0
5,D	4,8	1.306,3	45,5	54,5	0,0
5,E	4,2	1.172,3	30,0	40,0	30,0

**Tabla 6.4.** Características fisicoquímicas de los 15 péptidos sintéticos obtenidos a partir de los principales antígenos utilizados en el diagnóstico de EQ. Se detalla el nombre del péptido, su punto isoeléctrico, masa molecular teórica, y su composición porcentual de aminoácidos polares cargados, polares neutros e hidrofóbicos.

### **6.2.2. Solubilización de los péptidos sintéticos derivados del Ag5 y AgB.**

Los péptidos seleccionados se sintetizaron a nivel comercial y se adquirieron en forma liofilizada (pureza >85,0%), por lo que se debió solubilizarlos siguiendo la estrategia previamente descrita en la **sección 2.5.**, basada en las propiedades fisicoquímicas de cada uno.

En la **Tabla 6.5.** se detallan las principales características relevantes para la solubilización de los péptidos sintéticos, resultante -principalmente- de su clasificación según carga eléctrica neta (determinada según se describió en la **sección 5.1.2.**): 4/15 péptidos básicos, 5/15 péptidos ácidos y 6/15 péptidos neutros. Así, y siguiendo la estrategia descrita en la **sección 2.5.**, los péptidos ácidos y básicos se solubilizaron, inicialmente, en agua estéril sin necesidad del agregado adicional de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Por su parte, los péptidos neutros se solubilizaron directamente en 100  $\mu\text{L}$  de DMSO y, luego, se llevaron a volumen final con agua estéril. La concentración *stock* final fue de 2,0 mg/mL para todos los péptidos.

<b>Péptido</b>	<b>Pureza (%)</b>	<b>Masa molecular experimental (g/mol)</b>	<b>Carga neta</b>	<b>Carácter</b>	<b>Solubilizado en (H<sub>2</sub>O:X)</b>
B1,A	93,64	1.666,3	2	Básico	-
B1,B	97,79	1.399,5	0	Neutro	DMSO 23% (v/v)
B2,A	94,17	1.880,2	3	Básico	-
B2,B	89,82	1.607,8	0	Neutro	DMSO 22% (v/v)
B2,C	97,95	1.208,3	-1	Ácido	-
B3,A	91,87	1.708,9	-1	Ácido	-
B3,B	88,81	1.303,5	2	Básico	-
B4,A	96,72	1.448,8	1	Básico	-
B4,B	95,85	1.218,3	-5	Ácido	-
B4,C	97,77	1.066,2	0	Neutro	DMSO 18% (v/v)
5,A	86,42	2.375,5	0	Neutro	DMSO 23% (v/v)
5,B	85,14	1.837,9	0	Neutro	DMSO 21% (v/v)
5,C	87,12	2.642,0	0	Neutro	DMSO 11% (v/v)
5,D	88,31	1.306,3	-1	Ácido	-
5,E	92,1	1.172,2	-1	Ácido	-

**Tabla 6.5.** Información experimental y teórica relacionada con la solubilización de los péptidos sintéticos derivados del AgB y Ag5. Se detalla la pureza de los péptidos sintetizados, la masa molecular, la carga total calculada, el carácter calculado y si se añadió DMSO al momento de la solubilización.

### 6.3. Evaluación del valor serodiagnóstico de los péptidos sintéticos derivados del Ag5 y AgB.

Con el objetivo de identificar aquellos péptidos potencialmente útiles para técnicas de serodiagnóstico de EQ humana, se siguió la estrategia previamente descrita en el **Capítulo 5** para los péptidos sintéticos derivados del SM y TM parasitario. Así, en primer lugar, se realizó un estudio de *screening* con todos los péptidos sintéticos solubilizados siguiendo una estrategia de *checkerboard*. Para ello, se utilizaron las mismas mezclas (o *pool*) de muestras de sueros provenientes de pacientes con EQ (*pool* positivo) y de donantes sanos (*pool* negativo), previamente descritas en el **Capítulo 5**. En el *screening* primario mediante *checkerboard* en formato ELISA, se varió simultáneamente la concentración de sensibilización (0,39-50,00 µg/mL) y la dilución de muestras (1/100-1/3.200). De esta forma, y siguiendo nuestras propias estrategias previamente descritas, establecimos que aquellas combinaciones experimentales de concentración de antígeno y dilución de muestra -para cada péptido- que presentasen al menos un valor de cociente entre la absorbancia del *pool* positivo y el *pool* negativo (p/n) mayor a 3 (umbral), continuarían con las siguientes etapas de optimización. En la **Tabla 6.6.** y en la **Tabla 6.7.** se resumen las combinaciones, para cada péptido, que mostraron los mejores valores de cociente p/n; tanto para la detección de anticuerpos específicos del isotipo IgG<sub>T</sub> como de la subclase IgG<sub>4</sub>, respectivamente.

Péptido	p/n máximo	Concentración de Sensibilización (µg/mL)	Dilución de la muestra (1/dilución)
B1.A	1,26	0,39	400
B1.B	1,86	50,00	3.200
B2.A	1,29	0,78	3.200
B2.B	1,06	25,00	3.200
B2.C	1,38	6,25	400
B3.A	1,22	6,25	3.200
B3.B	1,23	0,78	1.600
B4.A	1,36	0,78	3.200
B4.B	1,54	25,00	800
B4.C	1,30	25,00	1.600
5.A	1,34	0,39	1.600
5.B	1,31	1,56	3.200
5.C	1,42	25,00	3.200
5.D	1,72	6,25	3.200
5.E	1,97	25,00	800

**Tabla 6.6.** Resumen de los resultados obtenidos del estudio de checkerboard para los péptidos sintéticos derivados del AgB y Ag5. Se indica el máximo valor p/n alcanzado para cada péptido, y la combinación de concentración de sensibilización y dilución de muestras correspondiente para IgGt.

Péptido	p/n máximo	Concentración de Sensibilización (µg/mL)	Dilución de la muestra (1/dilución)
B1.A	1,31	6,25	100
B1.B	1,25	1,56	3.200
B2.A	1,21	0,78	400
B2.B	1,10	3,13	3.200
B2.C	2,08	12,50	100
B3.A	1,58	0,78	1.600
B3.B	1,34	0,78	100
B4.A	1,33	0,78	200
B4.B	1,27	1,56	100
B4.C	1,16	6,25	1.600
5.A	1,51	50,00	800
5.B	1,21	12,50	200
5.C	1,31	0,78	100
5.D	1,60	50,00	100
5.E	1,40	50,00	100

**Tabla 6.7.** Resumen de los resultados obtenidos del estudio de checkerboard para los péptidos sintéticos derivados del AgB y Ag5. Se indica el máximo valor p/n alcanzado para cada péptido, y la combinación de concentración de sensibilización y dilución de muestras correspondiente para IgG<sub>4</sub>.

Como se observa en ambas tablas (**Tabla 6.6.** y **Tabla 6.7.**), ninguno de los 15 péptidos evaluados mostró una combinación que superase el umbral establecido, ni para la detección de IgG<sub>T</sub> ni para la de IgG<sub>4</sub>. Por lo tanto, lamentablemente, ninguno de los 15 péptidos ensayados derivados del Ag5 y de las subunidades del AgB continuó siendo analizado; dada la evidencia previamente obtenida al respecto en el **Capítulo 5** de la presente tesis.

#### **6.4. Estudio comparativo del desempeño serodiagnóstico del AgB<sub>1</sub> recombinante y de péptidos sintéticos derivados de su secuencia.**

El presente capítulo de la tesis buscaba mejorar los resultados del pobre desempeño serodiagnóstico de los péptidos sintéticos evaluados en el **Capítulo 5**. Para ello, se identificaron EBL presentes en las principales proteínas parasitarias utilizadas en inmunodiagnóstico de EQ humana. Sin embargo, los resultados experimentales obtenidos no fueron promisorios, ya que en las etapas de *screening* por estrategia de *checkerboard*, ninguno de los péptidos ensayados fue reconocido de manera diferencial entre el *pool* de sueros seropositivos y el *pool* de sueros seronegativos, y, por lo tanto, no se continuó con la evaluación de su desempeño en ensayos de serodiagnóstico para EQ humana.

Por ello, a continuación se presentan los resultados relacionados con el análisis comparativo del desempeño inmunodiagnóstico por parte del AgB<sub>1</sub> recombinante (rAgB<sub>1</sub>) producido en sistema eucariota [Folle et al., 2024] y de los péptidos sintéticos derivados de su secuencia utilizados en la presente tesis (p176, B1.A y B1.B). El rAgB<sub>1</sub> fue gentilmente cedido por la Dra. Ana María Ferreira y la Dra. Maite Folle del Laboratorio de Inmunología (Facultad de Química y Facultad de Ciencias, UdelaR). Así, se exploraron distintos fenómenos relacionados con la buena inmunoreactividad reportada previamente para otras formas recombinantes del AgB<sub>1</sub> [Carmena et al., 2006; Ito et al., 2014] y el péptido sintético p176 [González-Sapienza et al., 2000]; contrastándolo con los péptidos B1.A y B1.B seleccionados previamente en este capítulo. De esta manera, se analizaron distintos factores que pudiesen explicar el pobre desempeño de los péptidos sintéticos derivados del AgB<sub>1</sub>; de forma tal que, a futuro, los mismos pudiesen ser modificados para alcanzar el éxito deseado.

En EQ humana, el desempeño serodiagnóstico por parte de formas recombinantes del AgB<sub>1</sub> -expresadas y producidas en microorganismos procarionas- ha sido testado

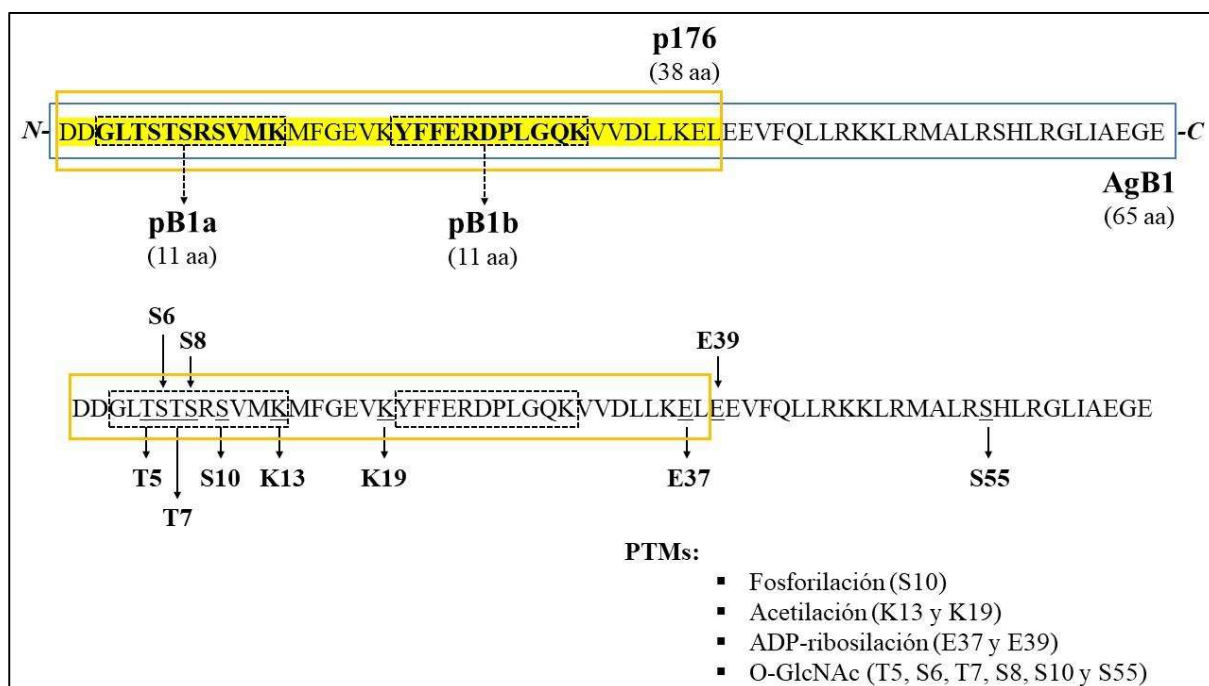
previamente [Carmena et al., 2006; Ito et al., 2014]. Sin embargo, no existen reportes hasta el momento de la producción recombinante del AgB<sub>1</sub> en sistemas eucariotas, por lo que el estudio serológico realizado en la presente tesis fue el primero de este tipo. Asimismo, el estudio sistemático (utilizando las mismas muestras de suero, los mismos reactivos y aplicando idénticos procedimientos experimentales) desarrollado aquí sobre dicho antígeno y sobre péptidos sintéticos derivados de su secuencia, también resultó ser el primero de su tipo. Por ello, los resultados obtenidos al respecto forman parte de un manuscrito próximo a ser enviado por nuestro grupo a la revista *Tropical Medicine and International Health* para su evaluación editorial. Finalmente, y para mantener la misma nomenclatura que se utiliza en dicho manuscrito, los péptidos B1.A y B1.B pasaron a denominarse pB1a y pB1b, respectivamente.

#### **6.4.1. Caracterización *in silico* de rAgB<sub>1</sub> y de los péptidos sintéticos derivados de su secuencia.**

Como se comentó previamente, la secuencia completa del AgB<sub>1</sub> se compone de 85 aminoácidos (Tabla 6.1.). Sin embargo, el AgB<sub>1</sub> recombinante utilizado (rAgB<sub>1</sub>, producido en sistema eucariota) se compuso de 65 aminoácidos, ya que sus primeros 20 residuos aminoacídicos presentes en el extremo N-terminal corresponden al “péptido señal” (no sintetizado). A su vez, todos los péptidos utilizados en este capítulo (p176, pB1a y pB1b) se encontraron dentro de dicha secuencia. Así, en la Figura 6.1. se observa que el péptido p176 se corresponde con los 38 aminoácidos de la región N-terminal de rAgB<sub>1</sub>, mientras que los péptidos pB1a y pB1b (11 aminoácidos cada uno) se localizan ambos dentro de la secuencia de p176; ubicándose pB1a hacia su porción N-terminal, mientras que pB1b se encuentra cercano a su región C-terminal.

Por otro lado, y dado que en los reportes preexistentes donde siempre utilizaron sistemas procariotas para la producción de rAgB<sub>1</sub>, se analizó *in silico* la posibilidad de que el rAgB<sub>1</sub> aquí utilizado presentase diversas PTM. Así, mediante la aplicación de diversos *softwares* sobre la secuencia del rAgB<sub>1</sub> [Kiemer et al., 2004; Steentoft C et al., 2013] se encontró en la misma: (i) un sitio potencial para fosforilación (S10), (ii) dos sitios potenciales para acetilación (K13 y K19), (iii) dos sitios potenciales para ADP-ribosilación (E37 y E39), y (iv) seis sitios potenciales de O-GlcNAc (T5, S6, T7, S8, S10 y S55) (Figura 6.1.). A su vez, resulta interesante destacar que la secuencia de rAgB<sub>1</sub> no

presenta residuos de Asparagina (código de una letra: N), por lo que no tendría sitios potenciales para N-glicosilación; un tipo de glicosilación reportada experimentalmente en otras proteínas de *E. granulosus* s.l. [Álvarez-Errico et al., 2001].

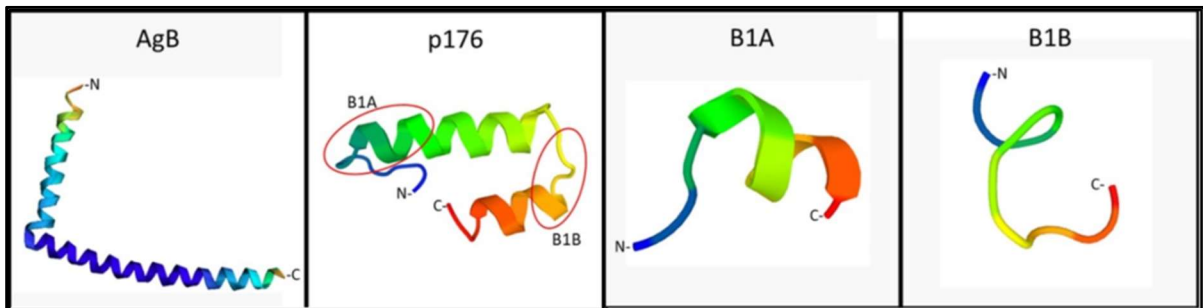


**Figura 6.1.** En la parte superior de la figura se observa la secuencia de AgB<sub>1</sub> de 65 aminoácidos y se enmarcan los distintos péptidos de trabajo; p176, pB1a y pB1b. En la parte inferior se detallan las modificaciones postraduccionales ensayadas y el residuo aminoacídico en que se efectuó la predicción.

Los resultados resumidos en la **Figura 6.1.** resultaron de gran interés ya que, de haberse aplicado aquí el mismo criterio de selección para EBLL utilizado previamente (**Capítulo 4**), solo el péptido pB1b hubiese sido seleccionado, descartando incluso a p176 que, aunque presenta 10 sitios potenciales para PTMs, es hasta el momento el péptido sintético con mejor desempeño inmunodiagnóstico reportado. Este hecho, desde ya, plantea autocríticas a discutir más adelante, sobre la aplicación del filtrado de EBLL en el flujo de trabajo bio-inmuno-informático desarrollado y aplicado en los capítulos precedentes.

Por otro lado, y en colaboración con el Dr. Sebastián Miles (Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, UdelaR), se completó la caracterización estructural de rAgB<sub>1</sub> y de los péptidos derivados de su secuencia mediante el modelado tridimensional de sus estructural, utilizando para ello los *softwares AlphaFold2* y

PEPfold3, respectivamente (**Figura 6.2.**). En línea con la información disponible según bibliografía, el rAgB<sub>1</sub> mostró una estructura enriquecida en  $\alpha$ -hélices [González-Sapienza et al., 2003], exhibiendo dos  $\alpha$ -hélices largas con falta de continuidad entorno a P26 (un residuo de prolina ubicado en posición 26). Por su parte, el modelo tridimensional para la estructura de p176 fue muy similar a la porción N-terminal de rAgB<sub>1</sub>; mostrando nuevamente una estructura menos organizada centrada en P26. Asimismo, el modelo de pB1a también mostró una estructura tridimensional rica en  $\alpha$ -hélice, similar a lo que ocurre tanto en rAgB<sub>1</sub> como en p176. Sin embargo, la estructura modelada para pB1b mostró ser mayoritariamente desorganizada, probablemente debido a la presencia de P26 en medio de su secuencia (**Figura 6.2.**). Por lo tanto, dado que P26 divide estructuralmente a todas las estructuras que lo contienen (rAgB<sub>1</sub>, p176 y pB1b), se podría proponer la generación de un nuevo péptido compuesto por los 25 aminoácidos ubicados en la región N-terminal de rAgB<sub>1</sub> (llamémoslo p25) que pudiese ser de utilidad en inmunodiagnóstico para EQ humana. Así, p25 concentraría *a priori* la inmunodominancia de rAgB<sub>1</sub>, a la vez que aumentaría su tamaño molecular respecto a pB1a, y, por tanto, podría favorecer su interacción con la placa de ELISA durante el paso de sensibilización.



**Figura 6.2.** Se detallan los modelados tridimensionales para los distintos antígenos de trabajo: rAgB<sub>1</sub>, p176, B1a y B1b.

Por último, en la **Tabla 6.7.** se resumen las características fisicoquímicas analizadas tanto para rAgB<sub>1</sub> como para los tres péptidos sintéticos derivados de su secuencia. Allí, se observa que, a excepción de pB1a (pI = 11,0), los valores de pI para rAgB<sub>1</sub>, p176 y pB1b oscilaron en el rango 5,0-8,3. Este hecho sería de relevancia práctica ya que en el paso de sensibilización del ELISA previamente desarrollado se utiliza buffer bicarbonato pH = 9,6; haciendo que todos los antígenos presenten carga eléctrica neta distinta de 0. De hecho, rAgB<sub>1</sub>, p176 y pB1b presentarían cargas eléctricas netas positivas,

mientras que pB1a presentaría una carga eléctrica neta negativa. Por otro lado, en la **Tabla 6.7.** también se observa que rAgB<sub>1</sub> presenta una composición aminoacídica equilibrada, al igual que p176 y pB1b. Sin embargo, pB1a presenta una baja proporción de aminoácidos polares cargados, a la vez que una mayor proporción de aminoácidos polares neutros e hidrofóbicos; fenómenos que favorecerían teóricamente su acople a la placa en el paso de sensibilización del ELISA.

Antígeno	Largo (a.a.)	pI	Masa molecular teórica (g/mol)	Composición de a.a. (%)		
				Polares cargados	Polares neutros	Hidrofóbicos
rAgB <sub>1</sub>	65	8,3	7.555,8	36,1	24,6	39,3
p176	38	5,0	4.380,1	34,2	26,3	39,5
pB1a	11	11,0	1.166,4	18,2	54,5	27,3
pB1b	11	6,1	1.399,6	36,4	27,3	36,4

**Tabla 6.7.** Análisis de las principales características fisicoquímicas del rAgB<sub>1</sub> y de los péptidos; p176, pB1a y pB1b. Se detallan los largos de sus secuencias, pI, peso molecular y la distribución de la composición aminoacídica.

En suma, basándonos en las grandes diferencias observadas, teóricamente, entre pB1a y pB1b, tanto en términos de potenciales sitios de PTMs (**Figura 6.1.**), estructuras tridimensionales (**Figura 6.2.**) y características fisicoquímicas (**Tabla 6.7.**), se esperaría que sus desempeños inmunodiagnósticos fuesen significativamente diferentes.

#### **6.4.2. Evaluación comparativa del valor inmunodiagnóstico de rAgB<sub>1</sub> y de los péptidos sintéticos derivados de su secuencia.**

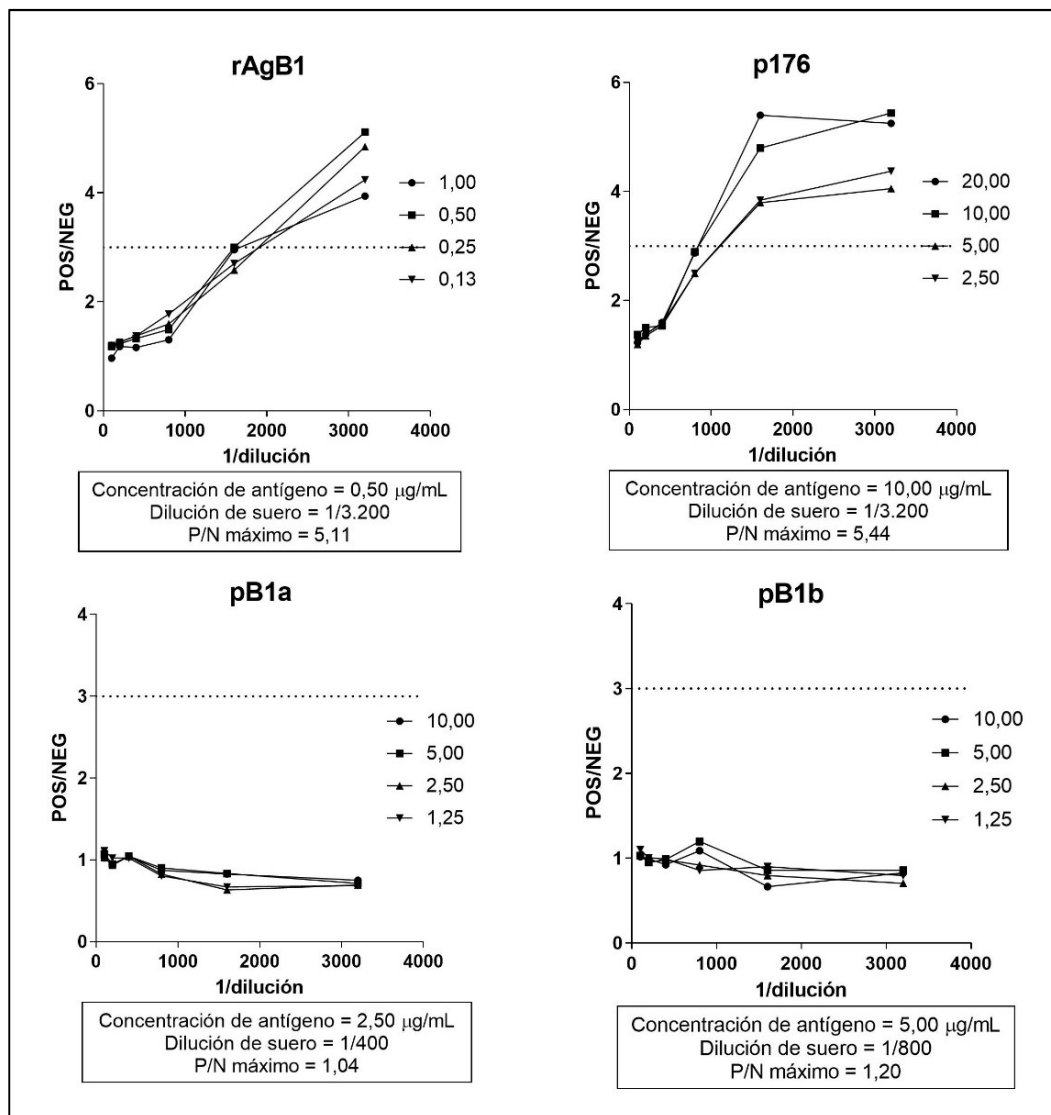
El valor serodiagnóstico de rAgB<sub>1</sub> y de los péptidos sintéticos solubilizados se llevó a cabo mediante inmunoensayos del tipo ELISA indirecto, sensibilizando placas de microtitulación con los diferentes antígenos y determinando la presencia de anticuerpos humanos específicos en las muestras de suero; tanto del isotipo IgG (IgG<sub>T</sub>) como de la subclase IgG<sub>4</sub>. Esta subclase de IgG se incluyó dentro de los estudios a realizar ya que, se sabe, es muy relevante en la respuesta inmune antiparasitaria humana [Nutman, 2015; Aalberse & Schuurman, 2002]. Así, de manera análoga a lo realizado en el **Capítulo 5** se utilizó nuevamente una estrategia de *checkerboard* variando simultáneamente las concentraciones de sensibilización y las diluciones de muestra, para explorar las condiciones experimentales de partida que resultasen en una buena discriminación entre muestras seropositivas y seronegativas. Luego, se procedió a evaluar el desempeño serodiagnóstico de cada antígeno utilizando la colección de muestras de suero generada y descrita en el **Capítulo 3** de la presente tesis.

##### **6.4.2.1. Comparación del valor inmunodiagnóstico de rAgB<sub>1</sub> y de los péptidos sintéticos derivados de su secuencia: *Screening* mediante estrategia de *checkerboard*.**

Para el *screening* primario se siguió la misma estrategia reportada en el **Capítulo 5**, utilizando nuevamente una mezcla (*pool*) de muestras de suero provenientes de pacientes con EQ confirmada por cirugía (*pool* positivo) y una compuesta por muestras de suero provenientes de donantes sanos (*pool* negativo) provenientes de zona endémica para *E. granulosus* s.l. (Caraguatá, Tacuarembó). Por su parte, si bien se realizó la misma estrategia de *checkerboard* para los cuatro antígenos en estudio utilizando un rango de diluciones de muestras 1/100-1/3.200, las concentraciones utilizadas para la etapa de sensibilización difirieron entre los péptidos y rAgB<sub>1</sub>. Así, para el *screening* de IgG<sub>T</sub> de los antígenos utilizados se ensayaron los siguientes rangos de concentraciones para sensibilización: rAgB<sub>1</sub> (0,13-1,00 µg/mL), p176 (2,50-20,0 µg/mL), pB1a y pB1b (1,25-10,0 µg/mL). Por su parte, el *screening* para IgG<sub>4</sub> utilizó los mismos intervalos de concentración a excepción de p176, para el cual se ensayó el rango 0,63-5,0 µg/mL.

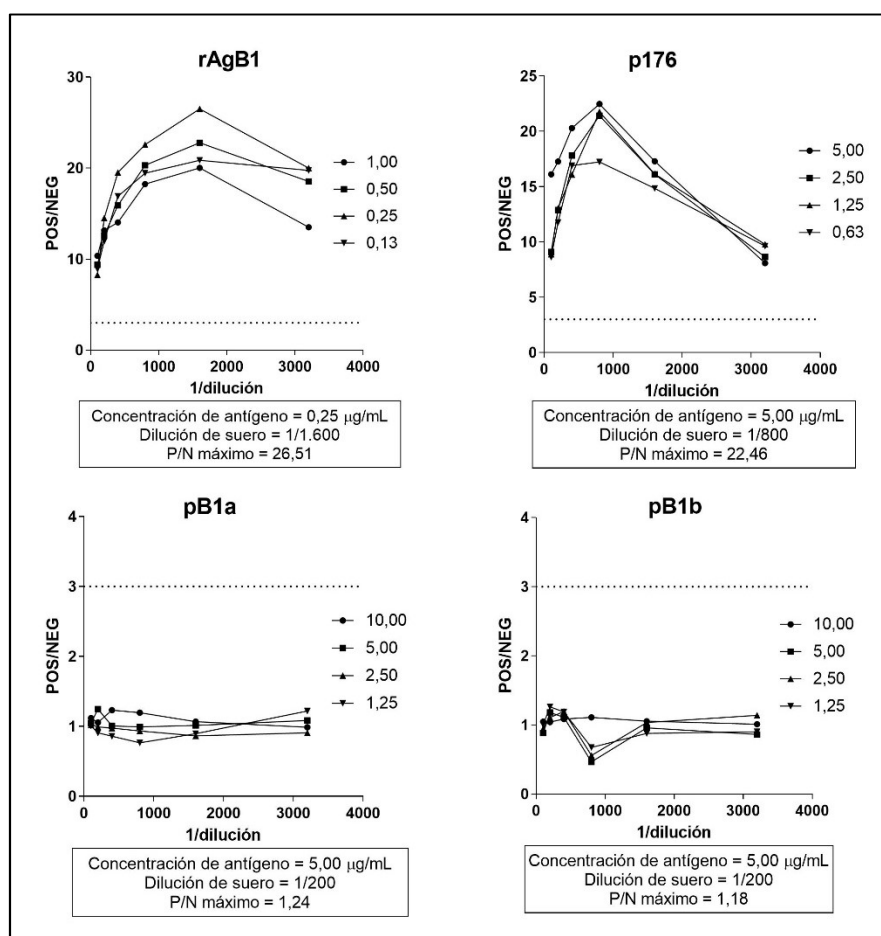
El estudio de *checkerboard* realizado para IgG<sub>T</sub> específicas contra rAgB<sub>1</sub> mostró un comportamiento creciente en los valores p/n como función directa de la concentración

de sensibilización; no observándose la característica curva en forma de campana que debería obtenerse al diluir las muestras (**Figura 6.3.**). En este sentido, si bien rAgB<sub>1</sub> mostró una serie de combinaciones con valores p/n >3, el rango de diluciones de muestras debería haberse ampliado hasta observar dicha curva. Lamentablemente, esto no pudo realizarse debido a limitaciones en la disponibilidad de rAgB<sub>1</sub>. Por su parte, mientras que el péptido p176 exhibió la curva típicamente esperada en una estrategia de *checkerboard* mostrando una serie de combinaciones con valores p/n >3, esto no ocurrió para los péptidos pB1a y pB1b; mostrando comportamientos consistentes con los observados previamente en el presente capítulo.



**Figura 6.3.** Checkerboard ensayado para los diferentes antígenos utilizados para *IgGt*. Se detalla la concentración de antígeno y dilución de suero que presentaron mayores valores de p/n.

Por otro lado, en la **Figura 6.4.** se muestran los resultados obtenidos del ensayo de *checkerboard* para la detección de anticuerpos IgG<sub>4</sub> específicos. En este caso, tanto para rAgB<sub>1</sub> como para p176 se observaron las características curvas en formato campana; con valores p/n máximos mayores a los obtenidos para IgG<sub>T</sub>. Así, mientras que para rAgB<sub>1</sub> el valor p/n máximo para IgG<sub>T</sub> fue de 5,1, para IgG<sub>4</sub> el mismo fue de 26,5. Asimismo, mientras que para p176 el valor p/n máximo para IgG<sub>T</sub> fue de 5,4, el mismo ascendió a 22,5 al detectar IgG<sub>4</sub> específicas. Ambas situaciones sugerían entonces que la detección de anticuerpos IgG<sub>4</sub> específicos lograría, *a priori*, una mejor discriminación entre muestras seropositivas y seronegativas respecto de la detección de anticuerpos IgG<sub>T</sub> específicos. Nuevamente, para los péptidos pB1a y pB1b, no se observaron combinaciones de concentración de sensibilizante y dilución de muestra que exhibieran valores p/n mayores al umbral establecido al detectar anticuerpos IgG<sub>4</sub> específicos.



**Figura 6.4.** Checkerboard ensayado para los diferentes antígenos utilizados para IgG<sub>4</sub>. Se detalla la concentración de antígeno y dilución de suero que presentaron mayores valores de p/n.

Por último, cabe mencionar que, a diferencia de los capítulos anteriores, aquí se utilizó la estrategia de *checkerboard* para el *screening* a los solos efectos de obtener una referencia al momento de sensibilizar las placas de microtitulación con los antígenos en estudio, y así poder establecer la dilución de muestras a ensayar. Por ello, aquí no se consideró el valor p/n máximo como una limitante de selección, ya que los cuatro antígenos en estudio se evaluaron con la seroteca de trabajo para poder evaluar comparativamente su desempeño inmunodiagnóstico. A su vez, para simplificar el trabajo experimental, se realizaron pequeños ajustes numéricos a los valores óptimos obtenidos tanto para la concentración de sensibilización como para la dilución de las muestras; los mismos se reportan a continuación (**Tabla 6.8**).

Antígeno	IgG <sub>T</sub>		IgG <sub>4</sub>	
	Concentración Antígeno (µg/mL)	Dilución Suero (1/dilución)	Concentración Antígeno (µg/mL)	Dilución Suero (1/dilución)
rAgB <sub>1</sub>	0,50	4.000	0,25	1.000
p176	5,00	2.000	5,00	1.000
pB1a	5,00	1.000	5,00	100
pb1b	5,00	1.000	5,00	100

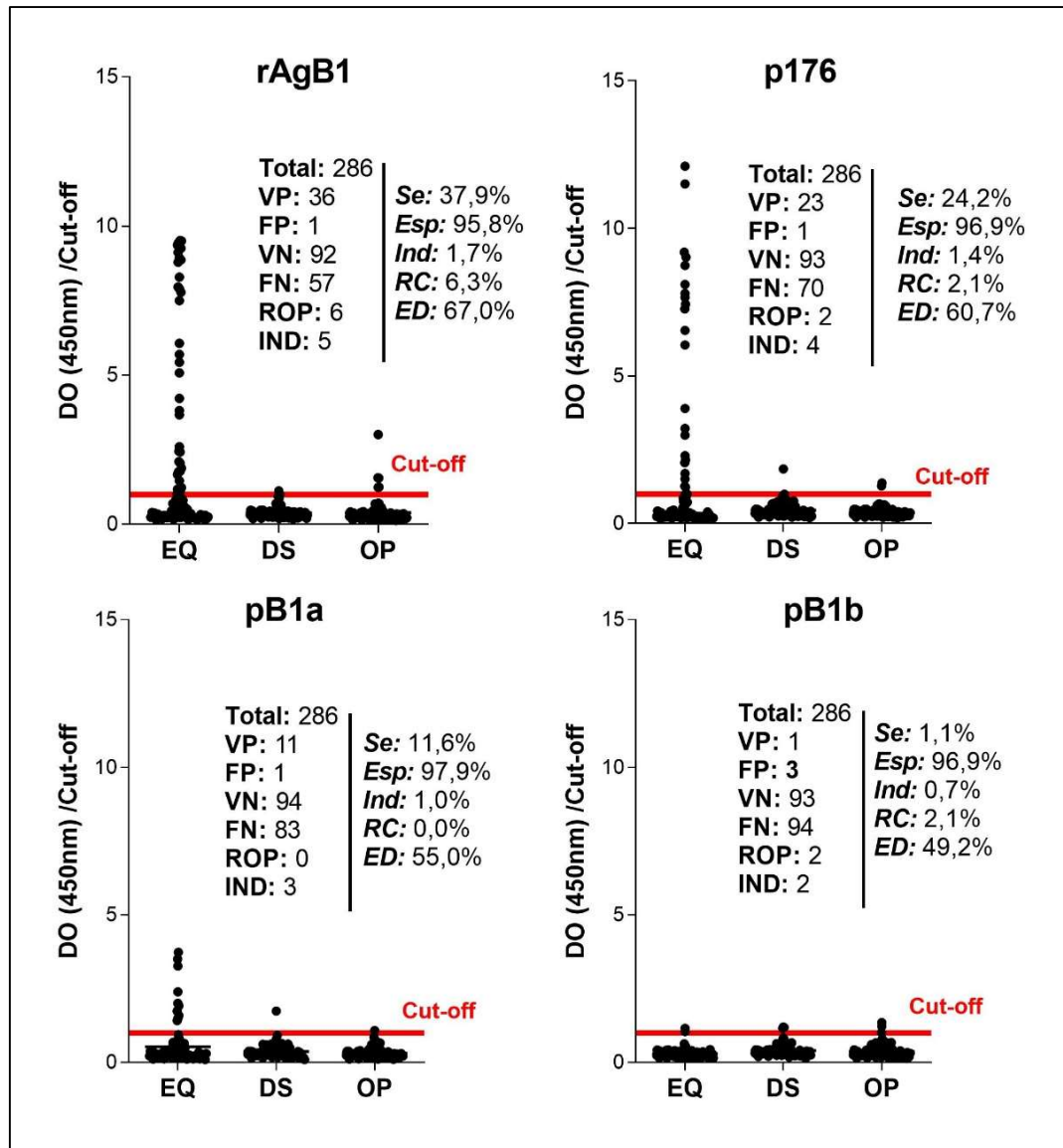
**Tabla 6.8.** Concentraciones de coating y diluciones de sueros seleccionadas para evaluar la performance inmunodiagnóstica de los antígenos de trabajo. Si bien estas condiciones son seleccionadas en función de los datos obtenidos en el checkerboard, no son necesariamente las mismas que las del screening. Se detallan las combinaciones para IgG<sub>T</sub> y para IgG<sub>4</sub>.

#### 6.4.2.2. Evaluación del desempeño diagnóstico de rAgB<sub>1</sub> y de los péptidos derivados de su secuencia.

La evaluación comparativa del desempeño diagnóstico de rAgB<sub>1</sub> y de los péptidos sintéticos derivados de su secuencia, utilizados en la presente tesis, se llevó a cabo tanto para IgG<sub>T</sub> como para IgG<sub>4</sub> utilizando la seroteca completa descrita en la **sección 2.1.1.** y aplicando las condiciones experimentales del ensayo optimizadas en el **Capítulo 5;** a saber:

- La sensibilización de las placas se realizó O.N. a 4°C (sin agitación) utilizando *buffer* carbonato/bicarbonato pH =9,6.
- La incubación de las muestras se realizó en ausencia de agente caotrópico durante 1 h a TA con agitación continua.
- Los conjugados enzimáticos (diluidos 1/10.000 ambos: IgG<sub>T</sub> e IgG<sub>4</sub>.) se incubaron durante 1 h a TA sin agitación.
- La reacción colorimétrica de revelado se detuvo luego de su desarrollo durante 10 min a 37°C sin agitación.

En la **Figura 6.5.** se reportan los resultados obtenidos para la detección de anticuerpos IgG<sub>T</sub> específicos, observándose que los valores de especificidad alcanzados fueron superiores al 90%; independientemente del antígeno ensayado. De hecho, estos valores superaron los obtenidos tras la aplicación del *kit* comercial utilizado como referencia (90,6%). Sin embargo, los valores de sensibilidad fueron consistentemente bajos, nuevamente de manera independiente del antígeno ensayado. Además, resulta interesante que, exceptuando a pB1b quien no fue útil para discriminar muestras seropositivas de muestras seronegativas (sensibilidad: 1,1%), los valores de sensibilidad para los restantes antígenos descendieron a medida que se redujo el tamaño molecular de los mismos: rAgB<sub>1</sub> (37,9%) > p176 (24,2%) > pB1a (11,6%). A su vez, la densidad óptica observada en los sueros con resultados positivos (en relación al *cut-off*) tanto para rAgB<sub>1</sub> como para p176, fue mucho mayor que al utilizar pB1a como antígeno, lo que evidenciaría un mayor poder de discriminación entre los sueros de pacientes con EQ.



**Figura 6.5.** Evaluación del desempeño diagnóstica en EQ humana para los antígenos en estudio para IgG<sub>T</sub>. Este análisis se realizó con la seroteca completa descrita en 2.1. DS; donantes sanos, EQ; pacientes con EQ, OP; pacientes con otras parasitosis. Para cada antígeno se muestra la distribución de los resultados por grupo y los valores de los distintos parámetros diagnósticos.

El valor de sensibilidad obtenido al detectar anticuerpos IgG<sub>T</sub> específicos para rAgB<sub>1</sub> fue inesperadamente bajo en comparación con los estudios previamente reportados [Manzano-Román et al., 2015]. En efecto, y aunque los valores de sensibilidad para rAgB<sub>1</sub> han sido muy variables en función de los reportes analizados (55-84% [Carmena et al., 2006] y 71-95% [Ito et al., 2014]), los mismos nunca estuvieron por debajo de 50% como en nuestro caso. Este hecho podría reflejar características particulares del rAgB<sub>1</sub> utilizado aquí, ya que, como se indicó anteriormente, en la presente tesis se evaluó por

primera vez el valor inmunodiagnóstico de su forma recombinante expresada y producida mediante un sistema eucariota. De hecho, dado que el sistema eucariota utilizado para su producción se basó en células de insectos (células S2 de *Drosophila melanogaster*) [Folle et al., 2024], esto podría haber alterado en alguna medida la inmunoreactividad de rAgB<sub>1</sub>; quizás debido a la introducción (o no) de PTM particulares y/o a efectos no deseados sobre su plegamiento estructural. Asimismo, y como se mencionó previamente, la familia proteica del AgB de *E. granulosus* s.l. es polimórfica, por lo que las formas recombinantes previamente ensayadas no necesariamente serían las mismas a la utilizada aquí, pudiendo esto explicar, al menos parcialmente, su baja sensibilidad diagnóstica.

Como se observa en la **Figura 6.5.**, la baja sensibilidad obtenida mediante la detección de anticuerpos IgG<sub>T</sub> específicos para rAgB<sub>1</sub> afectó negativamente la eficiencia diagnóstica general (67,0%), resultando en un valor inferior al obtenido mediante el *kit* comercial (77,9%). Sin embargo, cabe destacar que el valor de reactividad cruzada (6,3%) fue similar al obtenido con el *kit* comercial (5,3%), aunque el espectro de parasitosis identificadas mediante la detección de anticuerpos IgG<sub>T</sub> específicos para rAgB<sub>1</sub> fue más diverso. De hecho, mientras que la reactividad cruzada del *kit* comercial detectó como seropositivas muestras provenientes de pacientes con Enfermedad de Chagas (n=2), cisticercosis (n=1) y toxoplasmosis (n=2), la detección de anticuerpos IgG<sub>T</sub> específicos para rAgB<sub>1</sub> detectó como seropositivas muestras provenientes de pacientes con Enfermedad de Chagas (n=1), cisticercosis (n=1), toxoplasmosis (n=1), toxocariasis (n=1) y giardiasis (n=2).

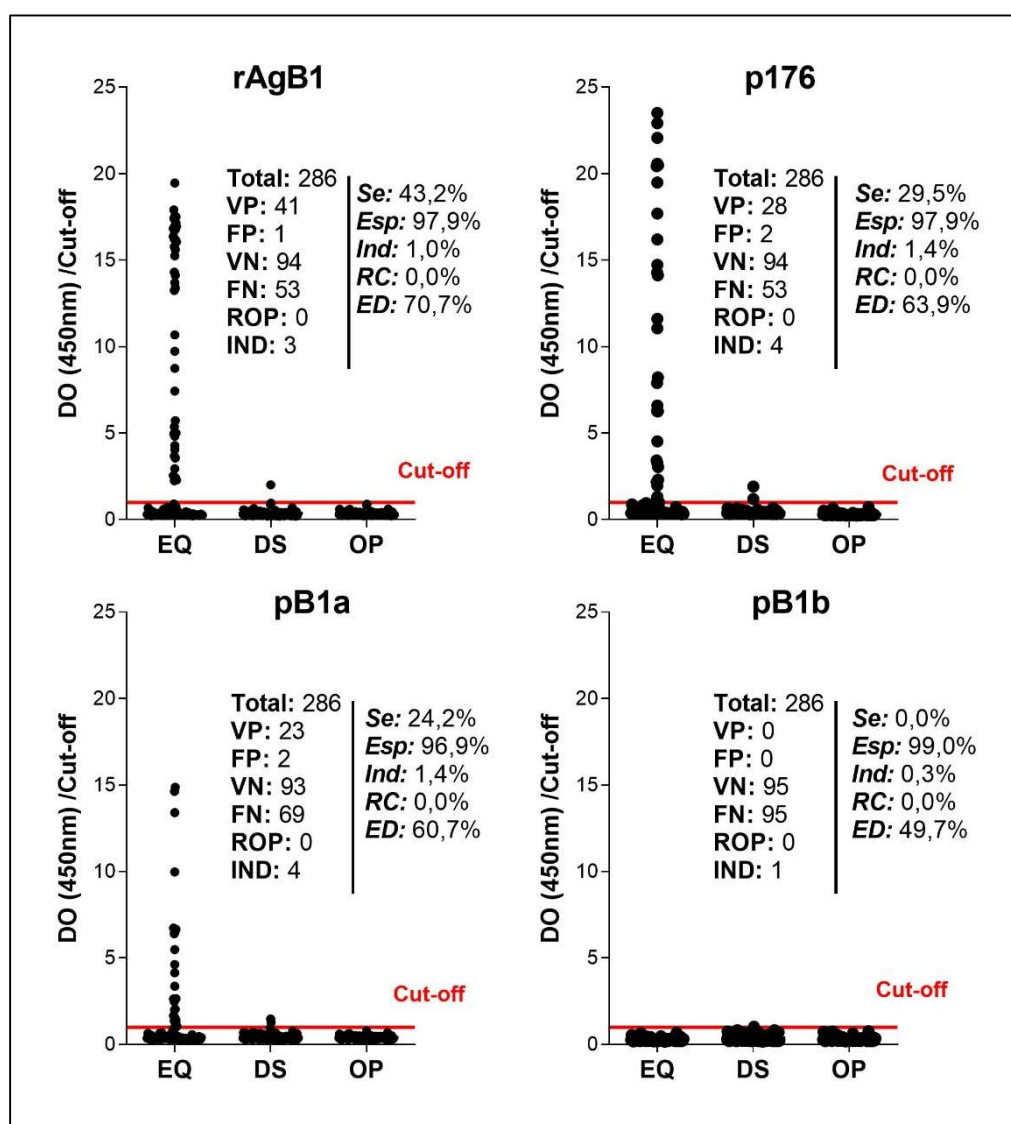
Por otro lado, y como ya se mencionó, los valores de sensibilidad obtenidos mediante la detección de anticuerpos IgG<sub>T</sub> específicos para rAgB<sub>1</sub> siguieron, globalmente, una tendencia descendente a medida que se redujo el tamaño molecular del antígeno utilizado en la sensibilización (**Figura 6.5.**). Sin embargo, aunque los péptidos pB1a y pB1b están ambos compuestos por 11 aminoácidos, el péptido pB1b como antígeno fue prácticamente incapaz de permitir la detección diferencial de muestras provenientes de pacientes con EQ, considerándolo por tanto un péptido inútil para el inmunodiagnóstico de EQ humana. Este hallazgo estaría de acuerdo con el comportamiento inferido para pB1b a partir de su modelado tridimensional (**Figura 6.2.**), ya que su estructura, a diferencia de la modelada para pB1a, fue mayoritariamente desorganizada y no compartió similitudes con su péptido/proteína de origen (p176 o rAgB<sub>1</sub>). Además, los resultados obtenidos sobre su valor inmunodiagnóstico respaldan,

al menos parcialmente, los hallazgos previamente reportados en los cuales se mapeó la inmunodominancia de p176 dentro de su región N-terminal [González-Sapienza & Cachau, 2003].

El valor de sensibilidad obtenido a partir de la detección de anticuerpos IgG<sub>T</sub> específicos para p176 fue, al igual que lo ocurrido con rAgB<sub>1</sub>, sorprendentemente bajo en comparación con los estudios anteriormente publicados donde se informaron valores cercanos al 80% [González-Sapienza et al., 2000; Lorenzo et al., 2005; Santivañez et al., 2012]. En este caso, tanto las diferencias en la pureza y solubilización del péptido, como en las condiciones experimentales del ELISA ensayado (por ejemplo: el buffer y la concentración de antígeno utilizada en la sensibilización, el valor de dilución de las muestras, el tiempo de incubación, etc.) y/o en el tipo y la calidad de los reactivos utilizados (por ejemplo: tipo y dilución de conjugados enzimáticos y/o de sustrato cromogénico, entre otros), podrían explicar, nuevamente al menos en parte, las diferencias halladas entre los resultados obtenidos aquí y los reportados en la literatura.

Por último, y aunque los valores de eficiencia diagnóstica obtenidos mediante la detección de anticuerpos IgG<sub>T</sub> específicos para los péptidos sintéticos aquí ensayados fueron bajos, los valores de indeterminación y de reactividad cruzada mejoraron generalmente respecto a los resultados para rAgB<sub>1</sub> (**Figura 6.5.**). De hecho, la detección de anticuerpos IgG<sub>T</sub> específicos para p176 y para pB1b solo mostró reacción cruzada con muestras de sueros provenientes de pacientes con toxocariasis (n=2) y con Enfermedad de Chagas (n=2), respectivamente. Por su parte, la detección de anticuerpos IgG<sub>T</sub> específicos para pB1a no mostró reactividad cruzada alguna. A este respecto, cabe mencionar además que la reactividad cruzada de los anticuerpos IgG<sub>T</sub> frente a otras parasitosis mostró una distribución mayoritariamente aleatoria, ya que solamente una muestra de suero proveniente de un paciente con Enfermedad de Chagas se identificó positivamente tanto en el ensayo que utilizó rAgB<sub>1</sub> como en el que utilizó pB1b como antígeno de sensibilización. Por lo tanto, estos resultados sugieren que cuanto más pequeño es el tamaño molecular del antígeno utilizado, menor es la interferencia con anticuerpos generados contra otros parásitos. Desafortunadamente, en nuestra colección de sueros no existieron muestras provenientes de pacientes con equinococosis alveolar; ya que esta junto con la cisticercosis, serían los principales inductores de interferencia en el inmunodiagnóstico de EQ humana [Carmena et al., 2006].

Por otro lado, en la **Figura 6.6.** se reportan los valores del desempeño diagnóstico obtenidos tras la detección de anticuerpos IgG<sub>4</sub> específicos para los cuatro antígenos en estudio en este capítulo, observándose generalmente mejoras significativas respecto de la detección de anticuerpos IgG<sub>T</sub> específicos. Así, la detección de anticuerpos IgG<sub>4</sub> mostró excelentes valores de especificidad independientemente del antígeno ensayado, siendo consistentemente superiores al 95%. Una vez más, por tanto, se alcanzaron mejores resultados de especificidad general que los obtenidos mediante el uso del *kit* comercial (90,6%).



**Figura 6.6.** Evaluación del desempeño diagnóstica en EQ humana para los antígenos en estudio para IgG<sub>4</sub>. Este análisis se realizó con la seroteca completa descrita en 2.1. DS; donantes sanos, EQ; pacientes con EQ, OP; pacientes con otras parasitosis. Para cada antígeno se muestra la distribución de los resultados por grupo y los valores de los distintos parámetros diagnósticos.

Por su parte, y aunque los valores de sensibilidad obtenidos se mantuvieron bajos tras la detección de anticuerpos IgG<sub>4</sub> específicos para cualquier de los antígenos analizados, los mismos siguieron nuevamente una tendencia descendente con la reducción del tamaño molecular del antígeno, pero mejorando significativamente respecto a la detección de anticuerpos IgG<sub>T</sub> específicos. Así, las mejoras de sensibilidad tras la detección de anticuerpos IgG<sub>4</sub> fue inversa respecto del tamaño molecular del antígeno. De hecho, los valores de sensibilidad para rAgB<sub>1</sub>, p176 y pB1a aumentaron aproximadamente un 14%, 22% y 110%, respectivamente, cuando se detectaron anticuerpos IgG<sub>4</sub> (**Figura 6.6.**) en lugar de anticuerpos IgG<sub>T</sub> (**Figura 6.5.**). A su vez, la densidad óptica observada en los sueros con resultados positivos (en relación al *cut-off*) al utilizar rAgB<sub>1</sub> y p176 fue mucho mayor que con pB1a, sugiriendo una mejor discriminación de los mismos. Nuevamente, la detección de anticuerpos IgG<sub>4</sub> específicos para pB1b no mostró utilidad alguna para el inmunodiagnóstico de EQ humana (**Figura 6.6.**).

El incremento de sensibilidad observado tras la detección de anticuerpos IgG<sub>4</sub> específicos para pB1a hizo que con este antígeno se alcanzaran los mismos parámetros de desempeño diagnóstico que los observados tras la detección de anticuerpos IgG<sub>T</sub> específicos para p176 (**Figura 6.5.**). Las mejoras en los valores de especificidad y sensibilidad tras la detección de anticuerpos IgG<sub>4</sub> específicos, derivaron en un incremento aproximado del 5% en la eficiencia diagnóstica para rAgB<sub>1</sub> y p176; observándose un incremento del doble (10%) para el uso de pB1a (**Figura 6.6.**).

Por último, cabe destacar que los fenómenos de indeterminación y reactividad cruzada prácticamente desaparecieron al detectar anticuerpos IgG<sub>4</sub> en lugar de anticuerpos IgG<sub>T</sub>. Dicho hallazgo resultó ser independiente del antígeno utilizado (**Figura 6.6.**), sugiriéndose entonces que la fina especificidad de los anticuerpos IgG<sub>4</sub> podría influir positivamente en el desempeño general de las herramientas inmunodiagnósticas para EQ humana.

En resumen, el presente capítulo de la tesis buscaba mejorar los resultados del desempeño serodiagnóstico en EQ humana por parte de los péptidos seleccionados *in silico* partiendo del SM y del TM parasitario predicho. Para ello, se identificaron EBL presentes en las principales proteínas parasitarias utilizadas en inmunodiagnóstico (Ag5

y distintas subunidades de AgB). Sin embargo, los resultados experimentales obtenidos descartaron los 15 péptidos ensayados, dado que en la etapa de *screening* por *checkerboard* ninguno de ellos fue reconocido de manera diferencial por el *pool* de muestras positivas. Por ello, y para profundizar en los posibles motivos que explicasen dichos resultados negativos, se realizó luego un estudio sistemático sobre el desempeño inmunodiagnóstico en EQ humana por parte de una forma recombinante de AgB<sub>1</sub> (expresada y producida en sistema eucariota) y de tres péptidos sintéticos derivados de su secuencia (p176, pB1a y pB1b). Los resultados obtenidos sugirieron que, en el caso concreto de rAgB<sub>1</sub>, su porción inmunodominante está localizada en su extremo N-terminal. Asimismo, la sensibilidad global de los inmunoensayos en formato ELISA indirecto estaría directamente relacionada con el largo de los péptidos utilizados como antígeno; mientras que la detección de anticuerpos IgG<sub>4</sub> específicos, en lugar de anticuerpos IgG<sub>T</sub>, reduciría significativamente los fenómenos de reactividad cruzada, mejorando así la sensibilidad del ensayo. En suma, los resultados obtenidos en este capítulo serán de gran utilidad futura para continuar con el desarrollo racional de inmunoensayos basados en péptidos para el serodiagnóstico de EQ humana.

## CAPÍTULO 7.

### DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS

La EQ es una enfermedad zoonótica parasitaria que se diagnóstica por técnicas imagenológicas, siendo las técnicas serológicas complementarias en el proceso de confirmación. Asimismo, las metodologías serológicas son generalmente útiles, también, en estudios de tamizaje poblacional. Desafortunadamente, dichas técnicas suelen presentar limitaciones importantes debido, principalmente, a sus variaciones intrínsecas en términos de sensibilidad y de especificidad diagnóstica. Estas variaciones pueden deberse a distintas causas, que abarcan desde factores técnicos de los inmunoensayos, hasta particularidades de los pacientes; generando, por lo tanto, resultados muchas veces inexactos.

En este contexto, el objetivo general de la presente tesis consistió en diseñar una estrategia de trabajo novedosa para el diseño *in silico* de péptidos sintéticos que, potencialmente, permitiesen mejorar el desempeño inmunodiagnóstico de las pruebas serológicas para EQ humana. Así, en primer lugar, se diseñó y ejecutó de manera *in silico* un flujo de trabajo que identificase y permitiese seleccionar proteínas de *E. granulosus* s.l. capaces, potencialmente, de inducir buenas respuestas de anticuerpos en humanos infectados. Para ello, y partiendo del proteoma teórico predicho para el parásito, se seleccionaron proteínas de interés para, posteriormente, identificar en las mismas regiones peptídicas potencialmente útiles como antígenos en técnicas de inmunodiagnóstico. Luego de seleccionar dichos péptidos, se los sintetizó comercialmente y se buscó consolidar una estrategia de validación experimental utilizando una seroteca de trabajo generada para tales efectos durante la presente tesis.

La utilización de péptidos sintéticos en técnicas de inmunodiagnóstico podría mejorar los valores asociados al pobre desempeño diagnóstico de ciertas metodologías, ya que, en términos de sensibilidad de los ensayos, la utilización de estructuras con un fuerte carácter antigénico permitiría mejorar los resultados actuales; mientras que, en términos de especificidad, utilizar unidades estructurales bien definidas permitiría disminuir posibles fenómenos de reactividad cruzada. A su vez, los péptidos sintéticos

tienen la ventaja de ser fácilmente sintetizables y estandarizables desde el punto de vista de su producción; y, de hecho, actualmente se dispone en la clínica de péptidos sintéticos útiles para el inmunodiagnóstico de diversos agentes patógenos. En este sentido, cabe mencionar, por ejemplo, los *kits* comerciales disponibles para inmunodiagnóstico de enfermedades virales tales como *Virus Epstein Bar* [Diasorin s.r.l., Saluggia, Italy], *Virus Hepatitis C* [Innogenetics, Gent, Belgium] y SARS-CoV-2 [Adaltis, Italia], y de enfermedades bacterianas como *Chlamydia trachomatis* [Labsystems OY, Helsinki, Finland]. Sin embargo, la utilización de péptidos sintéticos para inmunodiagnóstico de EQ en humanos se encuentra aún en etapas de investigación, ya que, si bien se han obtenidos resultados alentadores para algunos péptidos sintéticos, como por ejemplo p176 [Gonzalez-Sapienza et al., 2000] y GU4 [Barbieri et al., 1998], los mismos han enfrentado problemas de reproducibilidad; entre otros.

La ejecución del primer objetivo específico de la presente tesis permitió conformar una seroteca de calidad para el trabajo en inmunodiagnóstico de EQ humana; logrando incorporar un importante número de muestras individuales. En este sentido, se establecieron tres poblaciones bien definidas: (i) pacientes con EQ confirmada por cirugía (grupo EQ, n=95), (ii) donantes sanos (grupo DS, n=96) y (iii) individuos con otras parasitosis (grupo OP, n=95) (**Tabla 3.1**). Dentro del grupo EQ se conformó, además, un subgrupo con un importante número de muestras (n=50) provenientes de pacientes para los cuales se contaba con algún tipo de información clínica (sexo, edad, localización del QH, tratamiento farmacológico y/o técnica imagenológica utilizada en el diagnóstico). Desafortunadamente, no se pudo obtener información clínica sobre el estadio del QH de cada paciente, lo cual podría haber sido de gran utilidad para el análisis del desempeño diagnóstico de los péptidos sintéticos, ya que se ha observado que los distintos estadios parasitarios suelen asociarse con la presencia de distintas subclases de anticuerpos IgG. Así, mientras que pacientes con QH en estadios CE1, CE2 y CE3 presentan altos niveles de anticuerpos IgG<sub>4</sub>, en los pacientes con QH en estadios CE4 y CE5 predomina los anticuerpos de subclases IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>3</sub> [Carmena et al., 2006; Zhang et al., 2012]. Por su parte, las muestras que conformaron el grupo OP solo contaron con información relacionada al tipo de parasitosis cursada por los pacientes: esquistosomiasis (n=26), Enfermedad de Chagas (n=23), toxoplasmosis (n=15), cisticercosis (n=11), toxocariasis (n=9), giardiasis (n=7), fascioliasis (n=2), oncocercosis (n=1) y malaria (n=1).

Es importante destacar que la ejecución del primer objetivo específico se debió modificar respecto del plan de trabajo original dadas las restricciones impuestas a la movilidad entre países, por criterios sanitarios, en el contexto de la pandemia por COVID-19 (2020-2021); ya que, inicialmente, se dispondría de una gran seroteca perteneciente al laboratorio dirigido por la Dra. Marcela Cucher en el Instituto de Microbiología y Parasitología Médica del CONICET (IMPam-CONICET, Buenos Aires, Argentina). Por ello, durante la realización de la presente tesis se debió ampliar el banco de muestras disponible localmente; y para ello, se establecieron diversas colaboraciones nacionales. En este sentido, cabe mencionar que, debido a lo heterogéneo de las muestras recabadas, provenientes de aportes con distintas fuentes y orígenes, las muestras que conformaron finalmente nuestra seroteca de estudio presentaron grandes variaciones tanto en antigüedad como en forma de conservación. Por ello, y para conocer, al menos parcialmente la calidad de las muestras presentes en las serotecas conformadas, se realizaron dos tipos de caracterizaciones sobre las mismas: (i) determinación de la concentración de proteínas totales y (ii) perfil serológico relacionado con EQ humana.

La caracterización proteica de las muestras sugirió un relativo buen estado de conservación general, aunque con concentraciones proteicas totales significativamente menores en las muestras del grupo EQ, tanto en el grupo completo como en el subgrupo con información clínica disponible, respecto de los grupos DS y OP (**Figura 3.1.** y **Figura 3.3.**). Por su parte, en lo que respecta al perfil serológico de las muestras del grupo EQ, nuevamente tanto en el grupo completo como en el subgrupo con información clínica disponible, los resultados obtenidos concordaron con los reportados por el fabricante (**Figuras 3.5** y **Figura 3.6.**). A su vez, no se encontró una asociación significativa entre la concentración proteica de los distintos grupos conformados y los resultados serológicos obtenidos mediante el uso del *kit* comercial Vircell® utilizado como referencia (**Figura 3.7.**).

Los resultados serológicos en EQ humana pueden verse afectados por diversos factores propios del paciente en estudio, tales como: localización del QH [Kilimcioglu et al., 2013; Akisu et al., 2006], estado metabólico del QH [Wang et al., 2013; Tamarozzi et al., 2013; Schweiger et al., 2012], aplicación de tratamiento farmacológico prequirúrgico al paciente [Tamarozzi et al., 2013; Hernández-González et al., 2012], número y tamaño de QH presentes [Hernández-González et al., 2012], entre otros. Sin embargo, y tras la realización de diversas caracterizaciones y análisis de contingencia aplicados sobre el

subgrupo de pacientes EQ con información clínica, no se observaron sesgos significativos relacionados a los resultados serológicos obtenidos mediante el *kit* comercial utilizado (**Figura 3.8.**). Así, el perfil serológico del grupo de pacientes con EQ, tanto en el grupo completo como en el subgrupo con información clínica disponible, mostró un comportamiento muy similar; no observándose ningún tipo de sesgo significativo para con el tipo de datos clínicos evaluados; sugiriéndose entonces que el uso de la seroteca de paciente con EQ, tanto del grupo completo como del subgrupo con información clínica disponible, brindaría resultados serológicos similares.

Por otro lado, y en forma paralela a la conformación de las serotecas de trabajo, se llevó a cabo el segundo objetivo específico de la presente tesis; es decir, se predijo *in silico* el secretoma (SM) y transmembranoma (TM) de *E. granulosus* s.l. y, luego, sobre los mismos, se identificaron péptidos potencialmente útiles para inmunodiagnóstico de EQ humana. La predicción del SM y del TM de *E. granulosus* s.l. intentó partir del conjunto de proteínas parasitarias que tendría, *a priori*, mayor y mejor contacto con el sistema inmune del paciente infectado, pudiendo, por lo tanto, desencadenar en los mismos, teóricamente, buenas respuestas de anticuerpos específicos. De esta manera, y partiendo del proteoma teórico para *E. granulosus* s.l. compuesto por 10.231 proteínas parasitarias diferentes, se realizó por un lado la predicción bioinformática de su SM, el cual quedó conformado por un total de 1.136 proteínas parasitarias; equivalentes aproximadamente al 11% del proteoma de partida (**Figura 4.1.**). En este sentido, se han reportado predicciones similares realizadas para el SM de otros parásitos cestodos filogenéticamente cercanos a *E. granulosus* s.l., como ser *E. multilocularis* [Wang et al., 2015; Wang et al., 2015; Miles et al., 2017] y *T. solium* [Gómez et al., 2015; Miles et al., 2017]; reportando en ambos casos, aproximadamente entre el 6% y el 10% del total de proteínas parasitarias. Estos valores, junto con los aquí reportados, sugerirían que aproximadamente el 10% del proteoma de los parásitos cestodos se correspondería con proteínas potencialmente secretadas, pudiendo existir pequeñas diferencias entre diversas predicciones en función del tipo y versión de los algoritmos utilizados, de los parámetros aplicados a los mismos y de la calidad del proteoma completo utilizado de partida (por ejemplo: curado vs. no curado).

Como se comentó previamente, el Ag5 y las distintas subunidades del AgB son las principales proteínas parasitarias utilizadas actualmente en inmunodiagnóstico para EQ humana. Por ello, el análisis de su comportamiento a lo largo del flujo de trabajo

diseñado y aplicado en la presente tesis, podría considerarse como una aproximación indirecta de su validación. En este sentido, las cinco subunidades del AgB (AgB<sub>1</sub>-AgB<sub>5</sub>) fueron exitosamente incluidas dentro del SM parasitario predicho, ya que todas ellas presentaron una única RTM (*TMHMM v2.0*) con presencia de péptido señal (*Phobius*) y de secreción por vía clásica (*SignalP v5.0*), sin señal de exportación al RE (*PScan*), ni de exportación mitocondrial (*TargetP v2.0*) o de anclaje GPI (*PredGPI*). Por su parte, el Ag5 no se identificó dentro del SM parasitario, ya que, si bien presentó una única RTM (*TMHMM v2.0*), una secuencia de péptido señal (*Phobius*) y una de exportación por vía clásica (*SignalP v5.0*), también presentó una señal de exportación al RE (*PScan*); motivo por el cual quedó excluido del SM parasitario predicho. Este hecho sugiere que el flujo de trabajo aplicado para la predicción *in silico* del SM parasitario presentaría sus limitaciones, ya que tanto el AgB como el Ag5 se han detectado experimentalmente en productos de excreción/secreción parasitaria y/o en LH [Folle et al., 2017; Díaz et al., 2016; Silva-Álvarez et al., 2015; Ahn et al., 2015; Pagnozzi et al., 2014]; sugiriendo fuertemente que ambos antígenos serían naturalmente secretados/excretados por el parásito.

Por otro lado, el TM de *E. granulosus* s.l. predicho a nivel bioinformático se conformó por un total de 1.778 proteínas; equivalentes aproximadamente al 17% del proteoma parasitario completo (**Figura 4.1**). Lamentablemente, hasta el momento no se han reportado predicciones similares para ningún parásito cestodo, incluyendo a *E. granulosus* s.l., motivo por el cual no se pudieron realizar comparaciones con resultados previos. Asimismo, resulta importante destacar ciertas limitaciones en la predicción del TM parasitario, ya que, aunque una proteína sea incluida en el mismo, esto no implica necesariamente que esté accesible para su interacción con el sistema inmune del hospedero infectado, dado que su ubicación podría estar en membranas internas del parásito y, por lo tanto, no expuestas a la interfaz parásito-hospedero. Además, y aunque este último fuese el caso, la inclusión de dicha proteína en el TM parasitario no brindaría información sobre su topografía dentro de la membrana, pudiendo por lo tanto tener porciones intracelulares y extracelulares, sumadas a la correspondiente porción transmembrana [Fleishman et al., 2006; Overduin et al., 2021].

Para continuar con el segundo objetivo específico de la presente tesis, se realizó la aplicación combinada de diversas estrategias de análisis inmuno-informático que permitieron identificar y seleccionar 7 proteínas del SM y 8 proteínas del TM

teóricamente valiosas como antígenos parasitarios para su uso en inmunodiagnóstico de EQ humana (**Figura 4.2.**). En particular, dichas proteínas se seleccionaron ya que: (i) exhibieron muy bajos niveles de conservación con otros organismos distintos de los helmintos, (ii) presentaron altos valores de antigenicidad teórica, y (iii) serían potencialmente capaces de ser presentadas por una gran diversidad de moléculas del complejo MHC-II en humanos. Desde una perspectiva de teoría inmunológica, todas estas características facilitarían y/o promoverían el desarrollo de buenas respuestas de anticuerpos específicos contra las mismas en individuos con EQ; asignándoles por lo tanto un valor potencialmente relevante para su uso en ensayos de inmunodiagnóstico.

En este punto, es importante hacer nuevamente el ejercicio aproximado de validación analizando el comportamiento del Ag5 y de las cinco subunidades del AgB. En cuanto a sus niveles de conservación aproximada con otros organismos distintos de los helmintos, el Ag5 mostró un valor mínimo de 30% respecto a XP\_059086215.1 de *Tigripus californicus*; mientras que para las distintas subunidades del AgB dichos valores oscilaron en el rango desde 40% (para AgB<sub>2</sub> respecto a MDG6100414.1 de *Alteromonas sp.*) hasta 48% (para AgB<sub>4</sub> respecto a MTV29025.1 de *Profundirhabdus haloterans*); por lo que no hubiesen superado el umbral preestablecido de manera arbitraria (< 25%). Por su parte, en términos de antigenicidad teórica, si bien ambos antígenos superaron el umbral establecido en el predictor *Vaxijen*, no superaron el aplicado por el predictor *AntigenPro*; motivo por el cual serían (y efectivamente fueron) descartadas del resto del flujo de trabajo inmuno-informático. Este hecho, haría cuestionar el uso del predictor *AntigenPro* para el análisis de antigenicidad teórica en una hipotética versión mejorada del flujo de trabajo diseñado, ya que tanto el Ag5 como las distintas subunidades del AgB inducen buenas respuestas de anticuerpos específicos en pacientes con EQ [Carmena et al., 2006].

Por último, y en relación al análisis de la potencial capacidad de las proteínas seleccionadas para ser presentadas por diversas moléculas del complejo MHC-II humano, cabe destacar que el análisis correspondiente se realizó utilizando todos los alelos presentes en la base de datos del predictor de trabajo utilizado (*NetMHC-II v2.3*: 20 alelos HLA-DQ, 25 alelos HLA-DR y 9 alelos HLA-DP), sin considerarse, por lo tanto, sus frecuencias de distribución poblacional a nivel nacional y/o regional. En este sentido, y dado que actualmente se dispone de estudios poblacionales para frecuencias alélicas de moléculas del complejo MHC-II humano para poblaciones de América del Sur [Requena

et al., 2022], se podría realizar nuevamente el estudio aquí reportado, pero utilizando solo aquellos alelos que presentan una mayor frecuencia de distribución alélicas poblacional a nivel regional. Sin dudas, esto enriquecería enormemente los resultados del presente trabajo, haciendo que las predicciones *in silico* fuesen más representativas de las situaciones reales potencialmente presentes en las serotecas de trabajo conformadas.

Por otro lado, se seleccionaron solo aquellas proteínas parasitarias que superasen el umbral preestablecido de presentación para un índice de unión  $< 2\%$  sobre más del 85% y del 90% de las moléculas del MHC-II humanas, disponibles en el predictor *NetMHC-II v2.3*, para las proteínas del SM y del TM, respectivamente. Estos valores, seleccionados y aplicados de forma cuasi arbitraria, bien pudieron haber ocasionado el descarte de otras proteínas que igualmente exhibiesen, potencialmente, una buena capacidad para ser presentadas por diversas moléculas del complejo MHC-II humano. De hecho, analizando el comportamiento del Ag5 y de las subunidades del AgB como forma de validación indirecta, se observó que ninguna de estas proteínas superaría el umbral establecido previamente. En particular, dicho análisis para el Ag5 determinó que sería presentado con un buen índice de unión por, aproximadamente, el 78% de los alelos presentes en el predictor; mientras que el mismo análisis aplicado a las distintas subunidades del AgB mostró valores que oscilarían entre 19-46%; en todos los casos por debajo del umbral de 85% preestablecido en la presente tesis para proteínas del SM parasitario.

Por último, cabe mencionar que de las 7 proteínas del SM y de las 8 proteínas del TM identificadas y seleccionadas como teóricamente valiosas en cuanto antígenos para inmunodiagnóstico de EQ humana (**Figura 4.2.**), la gran mayoría de ellas se correspondió o bien con proteínas “no caracterizadas” o bien con proteínas descritas como “hipotéticas”. Por ello, sería de gran valor poder realizar estudios complementarios que permitiesen conocer si dichas proteínas se expresan efectivamente a nivel parasitario en estadios relevantes para los pacientes con EQ. En este sentido, y con la colaboración del Dr. Sebastián Miles (DDBT del Instituto de Higiene, UdelaR), se analizó el perfil de expresión de las mencionadas proteínas sobre una base de datos transcriptómicos disponibles para protoescolices de *E. granulosus* s.l. [Tsai et al., 2013]. En dicho análisis se exploró, para cada una de las proteínas en estudio, su valor FPKM (del inglés, *Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads*), el cual corresponde a

un indicador simple y directo del nivel de expresión génica, normalizado por el recuento de lecturas en función de la longitud del gen y del número total de lecturas asignadas.

En la **Tabla 7.1.** se resumen los valores FPKM para las 7 proteínas del SM y las 8 proteínas del TM identificadas y seleccionadas, donde se observa que los valores para las proteínas del SM parasitario oscilaron en el rango 0-127, mientras que para las proteínas del TM los valores FPKM estuvieron en el rango 1-34. Cabe mencionar que en la base de datos utilizada se reportó un total de 10.241 proteínas con un valor FPKM promedio de 987 (rango: 0-2.015.090); y, a su vez, entre las 8.393 proteínas que mostraron valores FPKM > 0, su valor promedio fue de 1.204 (rango: 1-2.015.090). En este sentido, y dado que el valor FPKM no se corresponde con números absolutos de expresión génica, se analizó el valor correspondiente al Ag5 y a la subunidad AgB<sub>1</sub> para poder realizar una valoración estimada del perfil de expresión de las proteínas seleccionadas. En este sentido, los valores FPKM para el Ag5 y para el AgB<sub>1</sub> fueron de 451 y 9.867, respectivamente. Por lo tanto, y en base al valor FPKM mínimo que corresponde a una proteína útil en inmunodiagnóstico efectivamente expresada (Ag5), resultó claro que todas las proteínas seleccionadas, tanto del SM como del TM parasitario, exhibirían valores nulos o muy bajos de expresión génica (al menos en protoescolices); quizás con la excepción de EgrG\_001168500 cuyo valor FPKM fue solo 3,6 veces inferior al del Ag5 (127 vs. 451, respectivamente). Por lo tanto, en una versión mejorada del flujo de trabajo diseñado y aplicado en la presente tesis debería incluirse un paso adicional de valoración del nivel de expresión de las proteínas en estudio; idealmente en estadios parasitarios relevantes para los pacientes con EQ (por ejemplo: QH).

Origen	Código de Acceso	Nombre	FPKM
SM	EgrG_001168500	<i>Hypothetical protein</i>	127
	EgrG_000052100	<i>Hypothetical protein</i>	0
	EgrG_000601800	<i>Apple</i>	9
	EgrG_000080900	<i>Chorion class high cysteine protein 12</i>	0
	EgrG_000349800	<i>Hypothetical protein</i>	17
	EgrG_001024500	<i>Hypothetical protein</i>	3
	EgrG_001199600	<i>Hypothetical protein</i>	3
TM	EgrG_001057800	<i>DNA methylase N 6 adenine specific</i>	15
	EgrG_001129450	<i>Expressed protein</i>	8
	EgrG_000055300	<i>Uncharacterized protein</i>	25
	EgrG_000103600	<i>Uncharacterized protein</i>	4
	EgrG_001032800	<i>Uncharacterized protein</i>	1
	EgrG_001115500	<i>Protein tweety homolog</i>	4
	EgrG_000951600	<i>Hypothetical protein</i>	1
	EgrG_000236600	<i>Ras guanine Nucleotide exchange factor</i>	34

**Tabla 7.1.** Perfil de expresión de las proteínas seleccionadas del SM y del TM parasitario según su valor FPK. (Análisis realizado por el Dr. Miles).

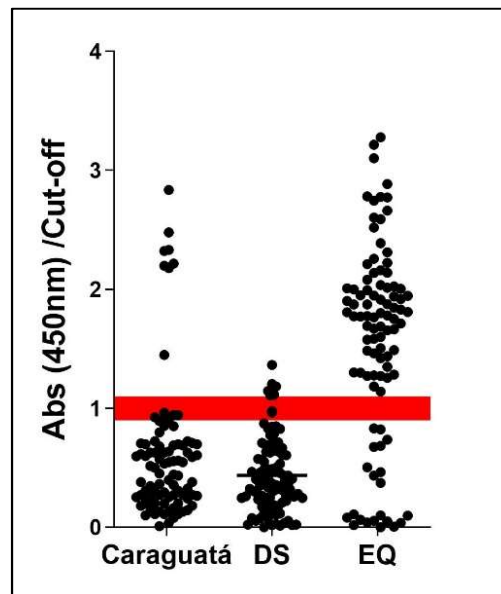
Para finalizar con el segundo objetivo específico de la presente tesis, se realizó la identificación de EBLL (epítopes B lineales limpios) presentes en las 7 proteínas del SM y en las 8 proteínas del TM mencionadas (**Figura 4.3.**). Como se explicó oportunamente, el concepto de “limpios” hace referencia a la ausencia de posibles sitios para PTM presentes en dichos EBL, de forma tal que, obtenidos en formato de péptidos sintéticos, dichos EBLL constituirían candidatos de interés para la producción de antígenos definidos potencialmente útiles en inmunodiagnóstico de EQ humana. En este sentido, cabe mencionar que el análisis de posibles sitios para PTM en las proteínas seleccionadas se realizó utilizando los predictores disponibles y conocidos por el grupo de trabajo en su momento, sin contar con evidencia empírica de que las PTM estudiadas pudiesen estar efectivamente presentes, o no, en proteínas de *E. granulosus* s.l. Sin embargo, un estudio posterior realizado por nuestro grupo sugirió un listado de 22 posibles PTM diferentes con alta probabilidad de estar presentes en proteínas del tegumento parasitario [Miles et al., 2022]. Así, por un lado, fueron varias las PTM reportadas que no se analizaron en el

flujo de trabajo de la presente tesis y que, por lo tanto, sería de interés poder evaluar a futuro (**Tabla 4.3.**). Por otro lado, y en sentido inverso, algunas de las PTM analizadas no fueron descritas en el trabajo mencionado, por lo que cabe la posibilidad de haber descartado, de forma no deseada, potenciales EBLL relevantes; limitando así, al menos parcialmente, los resultados obtenidos en las siguientes etapas del desarrollo de la presente tesis. Asimismo, resulta importante destacar que el desempeño de la mayoría de los predictores para PTM utilizados, no ha sido previamente evaluado para su uso sobre proteínas de origen parasitario.

A continuación, la ejecución del tercer objetivo específico de la presente tesis versó sobre la validación experimental de los EBLL (en formato de péptidos sintéticos), identificados a partir del SM y del TM predicho para *E. granulosus* s.l., en cuanto a su potencial valor serodiagnóstico en EQ humana. Para ello, y aunque existen guías generales para la solubilización de péptidos sintéticos liofilizados, en primer lugar, se logró aplicar una estrategia relativamente sencilla de solubilización basada principalmente en la carga eléctrica neta y el carácter ácido/base de los péptidos (**Tabla 5.3.** y **Tabla 5.4.**). Luego de solubilizar todos los péptidos sintéticos, los mismos se evaluaron en inmunoensayos de tipo ELISA indirecto, aplicando una estrategia de *checkerboard* para el *screening* mediante el uso de *pooles* de muestras de pacientes con EQ (*pool* positivo) y de individuos residentes en zona endémica para *E. granulosus* s.l. (Caraguatá, Tacuarembó) reportados previamente como seronegativos (*pool* negativo) [Hernández et al., 2005]. Como se comentó oportunamente, la elección del mencionado *pool* negativo intentó aplicar una mayor exigencia al *screening* ya que, a diferencia de las muestras del grupo DS, las muestras utilizadas representarían en mejor medida el entorno medioambiental donde suelen coexistir diversos agentes causantes de helmintiasis.

En este sentido, solo 6 de los 54 péptidos ensayados lograron superar las condiciones preestablecidas para proseguir con el desarrollo de la presente tesis. Por ello, la baja proporción de casos de éxito nos llevó a realizar, *a posteriori*, un análisis retrospectivo para evaluar posibles errores en la estrategia aplicada. En este sentido, sería posible que las muestras utilizadas para conformar los *pooles* ensayados en el *screening* hubiesen incidido negativamente sobre los resultados, afectando el poder de discriminación entre los *pooles*. En la **Figura 7.1.** se resumen los resultados serológicos obtenidos mediante el uso del *kit* comercial Vircell® para los diferentes grupos relevantes en este punto: (i) muestras que conformaron el *pool* positivo (grupo EQ), (ii) muestras

que conformaron el *pool* negativo (individuos residentes en Caraguatá reportados previamente como seronegativos [Hernández et al., 2005], y (iii) muestras del grupo DS. Como se observa, dentro del grupo de individuos residentes en Caraguatá (Tacuarembó), previamente reportados como seronegativos para EQ, 8/88 muestras resultaron seropositivas mediante el uso del *kit* comercial; las cuales lamentablemente fueron incluidas en el *pool* negativo. A su vez, dentro del grupo EQ, 21/95 muestras fueron negativas al usar el *kit* comercial; las cuales también, lamentablemente, fueron incluidas en el *pool* positivo. De esta forma, el poder de discriminación entre los *pools* utilizados en el *screening* pudo verse comprometido. De hecho, al ensayar *a posteriori* los *pools* mediante el *kit* comercial, los resultados obtenidos fueron seropositivos en ambos casos, con valores normalizados contra el *cut-off* de 1,82 para el *pool* positivo y de 1,34 para el *pool* negativo; apoyando la posibilidad de que su uso combinado en la estrategia de *screening* mostrase una capacidad de discriminación no óptima.



**Figura 7.1.** Estudio serológico realizado mediante el uso del kit comercial Vircell® para las muestras de residentes en zona endémica (Caraguatá, Tacuarembó), y los grupos EQ y DS.

Por otra parte, en lo que respecta a los inmunoensayos en formato ELISA, se logró optimizar para péptidos sintéticos un protocolo general reportado previamente por nuestro grupo [Mourglia-Ettlin et al., 2018]; fijando condiciones experimentales útiles para trabajos futuros: (i) sensibilización con los péptidos sintéticos mediante incubación *overnight* a 4°C (sin agitación), (ii) incubación de las muestras durante 1 h a TA (en

ausencia de agente caotrópico, con agitación), (iii) incubación del conjugado enzimático durante 1 h a TA (sin agitación), y (iv) incubación del agente revelador durante 10 min a 37°C (sin agitación). Luego, mediante la aplicación de estas condiciones experimentales utilizando la seroteca completa (grupos EQ, DS y OP) sobre los cuatro péptidos sintéticos seleccionados que superaron el estudio de *screening*, se observaron muy buenos resultados en términos de especificidad, reactividad cruzada e indeterminación. Sin embargo, los valores de sensibilidad para cualquiera de dichos péptidos resultaron virtualmente nulos. En consecuencia, el valor de eficiencia diagnóstica para cualquiera de los cuatro péptidos sintéticos osciló entre 49,7% y 50,3% (**Figura 5.6.**); valores muy inferiores al 84,3% determinado para el *kit* comercial Vircell® utilizando la misma seroteca completa (**Figura 3.5.**).

Entre los múltiples factores que pudieron haber incidido en la baja eficiencia diagnóstica de los péptidos sintéticos estudiados, identificamos tres -mutuamente no excluyentes- como los más probables; pudiendo ser optimizados en el futuro. En primer lugar, durante la etapa de sensibilización de las placas no se utilizó ninguna estrategia de acoplamiento adicional que aumentase la eficiencia de unión de los péptidos; un punto que pudo ser limitante para el desempeño de los inmunoensayos evaluados. En este sentido, son variados los reportes que hacen referencia a posibles estrategias para mejorar la sensibilización de placas utilizando péptidos como antígenos; entre los cuales se destacan: (i) utilización de péptidos ramificados con espaciadores de glicina [Mardsen et al., 1992], (ii) uso de péptidos ramificados unidos por lisinas y acoplados a una molécula de biotina [Hernández et al., 2000], (iii) péptidos con cinco residuos de lisina adicionados en posición N-terminal [Baillou et al. 1991], (iv) utilización de péptidos en tándem con motivos CGG adicionados en posición N-terminal para aumentar su densidad [Manocha et al. 2003], (v) uso de péptidos con espaciadores de polietilenglicol acoplados a biotina [Wolfe et al., 2021], y (vi) diseño de péptidos con un *tag* de propargil-glicina en posición N-terminal acoplados a moléculas de BSA [Milchram et al., 2021]; entre muchas otras estrategias. En segundo lugar, durante la etapa de incubación con el conjugado enzimático, en la presente tesis se utilizó uno específico para moléculas de IgG humanas (totales o específicas de subclases, según fuese el caso) de tipo monoclonal desarrollado en ratón. Sin embargo, en los *kits* de uso clínico suelen utilizarse conjugados de tipo policlonal, ya que, *a priori*, serían capaces de detectar una mayor diversidad de alotipos y glicofomas de IgG humanas; maximizando así su poder de detección [Lipman et al.,

2005]. En tercer y último lugar, para el cálculo de los distintos parámetros diagnósticos, en la presente tesis se estableció un valor de *cut-off* definido como el promedio de los valores de absorbancia de las muestras pertenecientes al grupo DS más tres desviaciones estándares. Esta decisión, si bien hizo más exigente a los inmunoensayos respecto del uso más común de dos desviaciones estándares [Oluka et al., 2023], disminuiría, en consecuencia, el valor de sensibilidad del mismo.

Llegados a este punto, resulta de importancia comentar que, dado el pobre desempeño inmunodiagnóstico observado para los péptidos sintéticos ensayados, se propuso un cuarto objetivo específico (no planteado originalmente), donde se identificaron *in silico* péptidos derivados de antígenos comúnmente utilizados en inmunodiagnóstico para EQ humana, evaluando además su potencial valor serodiagnóstico a nivel experimental. Para ello, se identificaron y sintetizaron comercialmente 15 EBL derivados de las principales proteínas parasitarias utilizadas en inmunodiagnóstico de EQ humana: Ag5 y las distintas subunidades del AgB (AgB<sub>1</sub>-AgB<sub>5</sub>) (Tabla 6.3.). Sin embargo, los resultados obtenidos durante la evaluación experimental de su potencial valor serodiagnóstico no fueron promisorios. En particular, durante la etapa de *screening* mediante estrategia de *checkerboard*, ninguno de los péptidos ensayados fue reconocido de manera diferencial por el *pool* positivo respecto del *pool* negativo; haciendo que, por lo tanto, ninguno de los péptidos continuase a través del flujo de evaluación inmunodiagnóstica diseñado.

Por ello, y para obtener información adicional que permitiese a futuro mejorar la estrategia desarrollada en la presente tesis, se realizó a continuación un análisis comparativo y sistemático sobre el desempeño inmunodiagnóstico del AgB<sub>1</sub> recombinante (rAgB<sub>1</sub>) producido en sistema eucariota [Folle et al., 2024] y de los péptidos sintéticos utilizados derivados de su secuencia (p176, pB1a y pB1b). Cabe destacar que, si bien el desempeño serodiagnóstico de formas recombinantes del AgB<sub>1</sub> -expresadas y producidas en microorganismos procariontas- ha sido reportado previamente [Carmena et al., 2006], no existen hasta el momento estudios análogos realizados con rAgB<sub>1</sub> expresado y producido en sistemas eucariotas; por lo que el estudio realizado en la presente tesis fue el primero de este tipo. Asimismo, el estudio sistemático realizado sobre rAgB<sub>1</sub> y sobre péptidos sintéticos derivados de su secuencia; es decir, utilizando las mismas muestras de suero y los mismos reactivos aplicados sobre procedimientos experimentales idénticos,

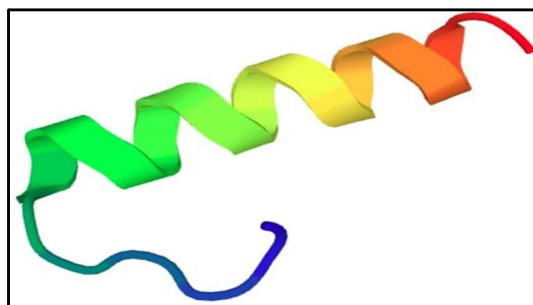
también resultó ser el primero de su tipo; motivo por el cual los resultados obtenidos se encuentran en proceso de publicación.

En este sentido, el desempeño inmunodiagnóstico tanto para rAgB<sub>1</sub> (expresado y producido en sistema eucariota) como para los péptidos sintéticos derivados de su secuencia, mediante detección de IgG<sub>T</sub> específicas, mostró en todos los casos valores de especificidad superiores al obtenido con el *kit* comercial de referencia (95,8%). Sin embargo, los valores de sensibilidad obtenidos fueron consistentemente bajos, nuevamente de manera independiente del antígeno ensayado (**Figura 6.5.**). En este sentido, el valor de sensibilidad obtenido mediante la detección de IgG<sub>T</sub> específicas para rAgB<sub>1</sub> fue inesperadamente bajo (37,9%) en comparación con estudios similares previamente reportados [Manzano-Román et al., 2015]. De hecho, y aunque se han reportado valores muy variables de sensibilidad diagnóstica al utilizar formas recombinantes de AgB<sub>1</sub> [Ito et al., 2014; Carmena et al., 2006], los mismos nunca estuvieron por debajo del 50%. Este hecho podría reflejar características particulares del rAgB<sub>1</sub> utilizado, ya que, como se indicó previamente, en la presente tesis se evaluó por primera vez el valor inmunodiagnóstico de una forma recombinante de AgB<sub>1</sub> expresada y producida utilizando un sistema eucariota. Específicamente, el sistema eucariota utilizado para su producción se basó en células de insectos (células S2 de *Drosophila melanogaster*) [Folle et al., 2024], lo cual podría haber alterado en alguna medida la inmunoreactividad de rAgB<sub>1</sub>; ya sea por adición/ausencia de PTM particulares y/o por efectos particulares sobre su plegamiento estructural [Merkuleva et al., 2022]. Asimismo, y como se destacó previamente, la familia proteica del AgB en *E. granulosus s.l.* es polimórfica [Muzulin et al., 2007], por lo que las formas recombinantes previamente ensayadas podrían no ser, necesariamente, las mismas que la utilizada en la presente tesis. Este hecho podría explicar, al menos parcialmente, los bajos valores de sensibilidad inmunodiagnóstica observados en la presente tesis para rAgB<sub>1</sub>.

Por otro lado, resultó interesante que, a excepción de pB1b, los valores de sensibilidad para los demás antígenos, mediante la detección de anticuerpos IgG<sub>T</sub> específicos, descendieron a medida que se redujo su tamaño: rAgB<sub>1</sub> = 37,9%, p176 = 24,2% y pB1a = 11,6% (**Figura 6.5.**). En este aspecto, fue particularmente destacable el comportamiento diferencial observado para los péptidos pB1a y pB1b, ya que, si bien ambos están compuestos por 11 aminoácidos, pB1b como antígeno fue prácticamente incapaz de permitir la detección diferencial de muestras, teóricamente, seropositivas

(grupo EQ) y seronegativas (grupo DS); considerándolo, por lo tanto, como un péptido inútil para el inmunodiagnóstico de EQ humana (sensibilidad = 1,1%). Este hallazgo estaría de acuerdo, al menos parcialmente, con su comportamiento inferido a partir del modelado tridimensional de su estructura (**Figura 6.5.**). En este sentido, la estructura de pB1b, a diferencia de pB1a, sería mayoritariamente desorganizada debido a la presencia del residuo P26; haciendo que no comparta similitudes estructurales con su péptido/proteína de origen (ya sea p176 o rAgB<sub>1</sub>, indistintamente). Además, nuestros resultados sobre el valor inmunodiagnóstico de pB1a y pB1b respaldarían, al menos parcialmente, los hallazgos previamente reportados sobre el mapeo de la inmunodominancia de p176 dentro de su región N-terminal [[González-Sapienza & Cachau, 2003](#)]. Sin embargo, en dicho reporte el epítoto inmunodominante de 12 aminoácidos sugerido comprendería la secuencia EVKYFFER (residuos 17-24 de rAgB<sub>1</sub>), la cual estaría principalmente contenida dentro de la secuencia de pB1b. Esta inconsistencia entre lo reportado previamente y el resultado sobre desempeño inmunodiagnóstico obtenido aquí para el péptido sintético pB1b, podría deberse a que la estrategia utilizada para el estudio de inmunodominancia en dicho reporte se basó en el uso de anticuerpos monoclonales, mientras que, en la presente tesis, los datos obtenidos derivaron del uso de una amplia colección de muestras diversas.

En base a los resultados obtenidos, tanto experimentales como de modelado estructural, a futuro se propone evaluar un nuevo antígeno peptídico como candidato a ensayar para inmunodiagnóstico de EQ en humanos. Dicho péptido, denominado AgB<sub>1</sub>.p25, estaría compuesto por los primeros 25 residuos aminoacídicos partiendo del extremo N-terminal de la secuencia de rAgB<sub>1</sub>. Así, dicho péptido conservaría, teóricamente, la estructura tridimensional completa de  $\alpha$ -hélice presente en rAgB<sub>1</sub> previo al residuo P26 e incluiría toda su región de inmunodominancia. De hecho, el modelado tridimensional de AgB<sub>1</sub>.p25 avalaría nuestra propuesta (**Figura 7.1.**).



**Figura 7.2.** Modelado de la estructura tridimensional correspondiente al péptido *AgB<sub>1</sub>.p25* obtenido mediante el uso del software *PepFold3*. En azul se destaca el extremo *N-terminal*, mientras que en rojo se muestra el extremo *C-terminal*.

De manera análoga a lo observado para *rAgB<sub>1</sub>*, el valor de sensibilidad diagnóstica obtenido para *p176*, mediante la detección de anticuerpos *IgG<sub>T</sub>* específicos, fue inesperadamente bajo en comparación con reportes previamente publicados; informándose en dichos casos valores cercanos al 80% [González-Sapienza et al., 2000; Santivañez et al., 2012]. En este caso, las diferencias en resultados obtenidos podrían explicarse, al menos parcialmente, tanto a la pureza y/o el protocolo de solubilización del péptido, así como por las condiciones experimentales del ELISA realizado (*buffer* de sensibilización, concentración de antígeno sensibilizante, dilución de muestras, tiempo de incubación, etc.) y/o por los reactivos utilizados (tipo y dilución de conjugados enzimáticos, calidad y concentración de sustrato cromogénico, etc.). De hecho, mientras que González-Sapienza y colaboradores realizaron la sensibilización de las placas a pH 9,2, incubaron las muestras durante 2 h diluidas 1/400 y utilizaron como sustrato de revelado 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona clorhidrato [González-Sapienza et al., 2000]; en la presente tesis el pH del *buffer* de sensibilización fue de 9,6, las muestras se incubaron durante 1 h (con agitación) a dilución 1/2.000 y el sustrato de revelado utilizado fue 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB).

Por otro lado, y aunque la colección de muestras de suero utilizadas en la presente tesis fue alta en términos numéricos (EQ = 95, DS = 96 y OP = 95), en comparación con las utilizadas en los reportes previos de estudio de *p176* (EQ = 90, DS = 28 y OP = 86 [González-Sapienza et al., 2000]), y EQ = 61, DS = 128 y OP = 0 [Santivañez et al., 2012]), no es posible descartar la existencia de posibles sesgos intrínsecos en las muestras aquí usadas. Sin embargo, esta posibilidad parecería poco probable dados los resultados obtenidos mediante la aplicación del *kit* comercial de referencia. En este sentido, en un

estudio multicéntrico que tenía como objetivo informar una comparación imparcial sobre el valor del uso de antígenos de un mismo lote para inmunodiagnóstico de EQ humana, y que incluyó seis laboratorios sudamericanos distintos (uno argentino, uno brasileño, uno chileno, dos peruanos y uno uruguayo), el péptido sintético p176 arrojó resultados inesperados [Lorenzo et al., 2005]. De hecho, los valores de sensibilidad diagnóstica para p176 reportados en dicho trabajo, variaron desde 27,1% (Chile) hasta 81,4% (en uno de los laboratorios de Perú), siendo, por lo tanto, el antígeno que exhibió mayor variación inter-laboratorios entre los seis ensayados (LH, AgB8/1, AgB8/2, EgMDH y p176) en términos de sensibilidad diagnóstica ( $63,0\% \pm 20,4\%$ ). Estos resultados, sumados a los obtenidos en la presente tesis, justificarían la realización de esfuerzos futuros adicionales para asegurar la reproducibilidad en el desempeño inmunodiagnóstico de p176, ya que el mismo sería un reactivo potencialmente confiable dada la posibilidad de su producción automatizada no-biológica y a gran escala.

En paralelo, y dada la relevancia reportada que tienen las respuestas de anticuerpos de subclase IgG<sub>4</sub> en las infecciones humanas por parásitos helmintos [Rajesh Kumar Tenguria et al., 2014], se realizó el mismo estudio sistemático sobre rAgB<sub>1</sub> y los péptidos sintéticos derivados de su secuencia (p176, pB1a y pB1b), pero evaluando el desempeño inmunodiagnóstico de los antígenos tras la detección de anticuerpos IgG<sub>4</sub> específicos. En este caso, nuevamente se observaron excelentes valores de especificidad para todos los antígenos en estudio, independientemente del antígeno ensayado; siendo, además, consistentemente superiores al 95%. Nuevamente, por lo tanto, se alcanzaron mejores resultados de especificidad diagnóstica que mediante el uso del *kit* comercial de referencia (90,6% para la detección de IgG<sub>T</sub> específicas). Por otro lado, y aunque los valores de sensibilidad obtenidos tras la detección de anticuerpos IgG<sub>4</sub> específicos fueron bajos en todos los casos, los mismos volvieron a seguir una tendencia descendente con la reducción del tamaño del antígeno: rAgB<sub>1</sub> = 43,2%, p176 = 29,5% y pB1a = 24,2% (**Figura 6.6.**). Sin embargo, esta tendencia mostró mejores resultados de sensibilidad que los observados tras la detección de anticuerpos IgG<sub>T</sub> específicos, de la mano de una reducción significativa en la tasa de fenómenos de reactividad cruzada (**Figura 6.5.**). Estos resultados estuvieron en línea con comportamientos previamente reportados para el uso comprado de la detección de IgG<sub>T</sub> vs. IgG<sub>4</sub> en el seguimiento de pacientes con EQ. Por ejemplo, Tenguria y Naik observaron que la eficiencia diagnóstica tras la detección de anticuerpos específicos para *E. granulosus* mejoraba al detectar anticuerpos IgG<sub>4</sub>

(92,7%) en lugar de anticuerpos IgG<sub>T</sub> (88,2%) para pacientes tratados con albendazol [Tenguria & Naik, 2014]. Estos resultados sugerirían, por lo tanto, que la sensibilidad diagnóstica de los inmunoensayos desarrollados estaría directamente relacionada con el tamaño molecular (principalmente el largo) de los péptidos utilizados como antígeno, y que la detección de anticuerpos IgG<sub>4</sub> específicos reduciría la tasa de reactividad cruzada de los ensayos; contribuyendo así a mejorar la sensibilidad diagnóstica de los mismos.

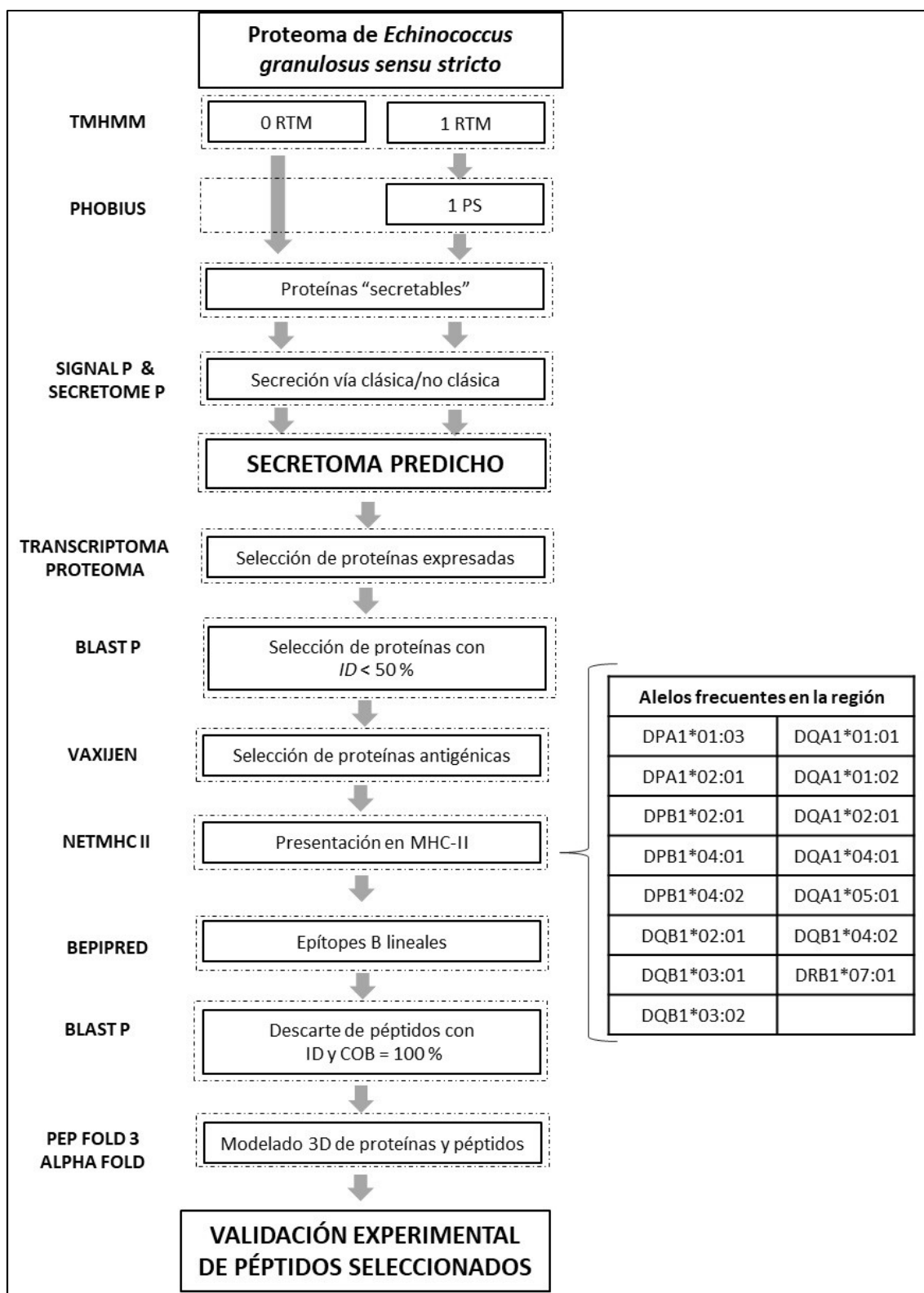
La ausencia de utilidad diagnóstica del péptido pB1b en relación con su par pB1a y su molécula de origen (ya sea, p176 o rAgB<sub>1</sub>), tanto tras la detección de anticuerpos específicos IgG<sub>T</sub> como IgG<sub>4</sub>, pone en discusión la necesidad de realizar predicciones para diferentes PTM en el flujo de trabajo diseñado y aplicado en la presente tesis. Como se observa en la **Figura 6.1.**, mientras que los péptidos p176 y pB1a presentaron un número importante de posibles sitios para PTM (8 y 6, respectivamente), el péptido pB1b no presentó ninguno. Sin embargo, los resultados de valor inmunodiagnóstico fueron más prometedores para p176 y pB1a, y, de hecho, si se hubiera aplicado la etapa de filtrado en base al concepto de EBLL (es decir, sin sitios posibles para PTM), pB1b hubiese sido seleccionado mientras que pB1a no, descartando así a un posible candidato útil para el diseño de nuevos antígenos con valor inmunodiagnóstico para EQ humana. Por ello, en una versión optimizada del flujo de trabajo diseñado, la selección de EBLL a partir de EBL sería, cuanto menos, cuestionable.

Por lo tanto, y en base al análisis crítico realizado tanto al flujo de trabajo bio-inmuno-informático como a la estrategia de validación experimental desarrollados en la presente tesis, a continuación, se propone una nueva versión optimizada de los mismos para aplicar a futuro y poder así mejorar los resultados obtenidos. En este sentido, en la **Figura 7.3.** se esquematiza la versión optimizada para el flujo de trabajo bio-inmuno-informático, el cual se centraría únicamente en el SM parasitario por ser quien, al menos en la actualidad, contendría las estructuras moleculares con mejor desempeño inmunodiagnóstico para EQ humana. Así, partiendo del proteoma completo predicho para *E. granulosus* s.l., dicho flujo comenzará con la predicción de regiones transmembrana (*TMHMM v2.0*), a partir de la cual se seleccionarán aquellas proteínas que no presenten RTM junto con las que presenten una única RTM, y a estas últimas se les aplicará un análisis adicional para seleccionar las proteínas que presenten secuencia de péptido señal (*Phobius*). Luego, se seleccionarán aquellas únicamente con posibilidad de ser secretadas por vía clásica (*Signal P v5.0*) y/o no-clásica (*Secretome P v1.0*). Una vez obtenido el SM

parasitario teórico, se seleccionarán solo aquellas proteínas que muestren evidencia, ya sea transcriptómica y/o proteómica, de presentar altos niveles de expresión en estadios parasitarios relevantes para el paciente con EQ (de preferencia, se utilizarán bases de datos referidas a QH).

Luego, se realizarán análisis de homología contra cualquier proteína presente en la base de datos no redundante de NCBI, excluyendo los *phyla* Nematelintos y Platelmintos (en este último caso incluyendo las clases Trematodo y Cestodo), seleccionando solo aquellas proteínas con un *score* de identidad < 50%. A continuación, se realizará el análisis de antigenicidad de las proteínas seleccionadas aplicando únicamente el *software VaxiJen 2.0* y seleccionando aquellas que superen el umbral establecido por defecto. Posteriormente, el análisis de probabilidad de las proteínas de ser presentadas en moléculas humanas relevantes del complejo MHC-II se realizará mediante el uso del *software NetMHC-II v2.3*, utilizando únicamente los 15 alelos detallados en la **Figura 7.3.**, ya que presentan la mayor frecuencia de distribución ponderada entre los países de la región: Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay [Requena et al., 2020]. Asimismo, el umbral de unión a aplicar entre las proteínas en estudio y las moléculas de MHC-II seleccionadas, se establecerá luego de analizar el comportamiento del Ag5 y de las distintas subunidades del AgB sobre la lista de 15 alelos previamente mencionada.

A continuación, aquellas proteínas seleccionadas positivamente por su interés en inmunodiagnóstico de EQ humana, se estudiarán en mayor detalle para caracterizar su estructura tridimensional y la presencia de EBL dentro de su secuencia. Así, se realizará el modelado tridimensional de cada proteína candidata mediante el *software Alpha Fold*, y se identificarán posibles EBL (*Bepipred 2.0*) que no presenten un 100% de identidad y cobertura con cualquier proteína presente en la base de datos no redundante de NCBI. Luego, se realizará el modelado tridimensional de los EBL seleccionados y, mediante una evaluación comparativa de su estructura “libre” vs. “dentro de la proteína madre” (siguiendo una estrategia similar a la recientemente reportada por nuestro grupo [Miles et al., 2023]), se seleccionarán finalmente aquellos EBL con estructuras tridimensionales altamente similares en ambas situaciones.



**Figura 7.3.** Nuevo flujo de trabajo bio-inmuno-informático propuesto en base a la experiencia adquirida y a los resultados obtenidos durante la realización de la presente tesis.

Por otra parte, el proceso optimizado de validación experimental para los EBL seleccionados se realizará partiendo de sus versiones como péptidos sintéticos, de manera análoga a lo realizada en la presente tesis, pero aplicando algunas modificaciones. Así, los péptidos sintéticos se sintetizarán comercialmente, y sus formas liofilizadas se solubilizarán según las características ácido/base de los mismos, así como según el valor de su carga neta a pH fisiológico. Luego, para el *screening* en formato *checkerboard* se utilizarán nuevamente *pooles* de muestras, prestando particular atención en la selección de cuáles conformarán cada *pool*: únicamente se utilizarán muestras de residentes en zona endémica seronegativos para el *pool* negativo, y muestras seropositivas de pacientes EQ para el *pool* positivo; en ambos casos según el resultado serológico obtenido mediante el uso del *kit* comercial Vircell®. Por su parte, en lo que respecta a la etapa de sensibilización con los péptidos sintéticos, se ensayarán adicionalmente distintas estrategias que optimicen su acople a las placas, por ejemplo, mediante el uso de conjugados covalentes péptido-*carrier*; utilizando para ello proteínas inmunológicamente irrelevantes (por ejemplo: BSA). Por último, se optará por trabajar con conjugados enzimáticos de tipo policlonal, específicos para IgG<sub>T</sub> o IgG<sub>4</sub> humana, y se evaluará la utilidad de diversos valores de *cut-off* (promedio más 2 ó 3 desviaciones estándares) y/o la construcción de curvas ROC, para seleccionar aquella condición que permita obtener los mejores valores posibles de eficiencia diagnóstica.

En suma, los resultados obtenidos en la presente tesis permitieron sentar las bases para el desarrollo de una nueva línea de investigación tendiente al diseño y evaluación de péptidos sintéticos potencialmente útiles en inmunodiagnóstico. En este sentido, aunque los resultados obtenidos no superaron el desempeño diagnóstico alcanzado por el *kit* comercial utilizado como referencia, los mismos permitieron concluir sobre modificaciones futuras a realizar sobre el flujo de trabajo desarrollado, de forma tal que puedan alcanzarse mejores resultados. Asimismo, dichos resultados permitieron generar evidencia empírica valiosa relacionada con diversas propiedades y características que los péptidos sintéticos deben cumplir/exhibir para ser potencialmente útiles en inmunodiagnóstico de EQ humana. Finalmente, se logró proponer una estrategia de trabajo *in silico* optimizada de acuerdo a la experiencia generada, así como modificaciones a aplicar en la validación experimental de péptidos sintéticos candidatos. En conclusión, se generó un importante volumen de conocimientos teóricos y experimentales que, a futuro, permitirán avanzar en el desarrollo de inmunoensayos

basados en péptidos sintéticos, potencialmente útiles para el diagnóstico de patologías de causa infecciosa.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agudelo-Higuita et al. (2016). **Cystic Echinococcosis**. *J Clin Microbiol.* 54(3):518-23.
- Aguiar et al. (2015). **Detection of genotype-specific Ehrlichia canis exposure in Brazilian dogs by TRP36 peptide ELISA**. *Ticks Tick Borne Dis.* 7(1):142-145.
- Ahn et al. (2015). **Alteration of immunoproteome profile of Echinococcus granulosus hydatid fluid with progression of cystic echinococcosis**. *Parasite Vectors* 8:10.
- Akisu et al. (2006). **Comparative evaluation of western blotting in hepatic and pulmonary cystic echinococcosis**. *Parasite.* 13(4):321-6.
- Altschul et al. (1990). **Basic local alignment search tool**. *J Mol Biol.* 5;215(3):403-10.
- Álvarez-Rojas et al. (2014). **Echinococcus granulosus sensu lato genotypes infecting humans--review of current knowledge**. *Int J Parasitol.* 44(1):9-18.
- Backert et al. (2015). **Immunoinformatics and epitope prediction in the age of genomic medicine**. *Genome Med.* 20:7:119.
- Baillou et al. (1991). **Fine serotyping of human immunodeficiency virus serotype 1 (HIV-1) and HIV-2 infections by using synthetic oligopeptides representing an immunodominant domain of HIV-1 and HIV-2/simian immunodeficiency virus**. *J Clin Microbiol.* 29(7):1387-91
- Barbieri et al. (1998). **Diagnostic evaluation of a synthetic peptide derived from a novel antigen B subunit as related to other available peptides and native antigens used for serology of cystic hydatidosis**. *Parasite Immunol.* 20(2):51-61.
- Barreda et al. (2020). **Identification of conserved peptides containing B-cell epitopes of Babesia bovis AMA-1 and their potential as diagnostics candidates**. *Transbound Emerg Dis.* 67 Suppl 2:60-68.
- Batisti et al. (2023). **Antigen discovery by bioinformatics analysis and peptide microarray for the diagnosis of cystic echinococcosis**. *PLoS Negl Trop Dis.* 12;17(4):e0011210.
- Benabid et al. (2013). **Contribution of specific anti-hydatid IgG subclasses in the diagnosis of echinococcosis primary infection and relapses**. *Clin Lab.* 59(3-4):293-8.
- Bendtsen et al. (2004). **Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion**. *Protein Eng Des Sel.* 17(4):349-56.
- Biava et al. (2001). **Laboratory diagnosis of cystic hydatid disease**. *World J Surg.* 25(1):10-4.
- 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). **Update on Treatment for Cystic Echinococcosis of the Liver.** *Curr Treat Options Infect Dis* **8**, 153–164.
- Brusca & Brusca. (2003). **Invertebrates.** *Systematic Biology*. 53 (4): 664–666.
- Budke et al. (2006). **Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis.** *Emerg Infect Dis*. 12(2):296-303.
- Carmena et al. (2006). **Antigens for the immunodiagnosis of Echinococcus granulosus infection: An update.** *Acta Trop*. 98(1):74-86.
- Carmena et al. (2007). **The immunodiagnosis of Echinococcus multilocularis infection.** *Clinical Microbiology and Infection*. 13:460-475.
- CDC, 2019. **Echinococcosis.** [www.cdc.gov/dpdx/echinococcosis/index.html](http://www.cdc.gov/dpdx/echinococcosis/index.html)
- Celik et al. (2009). **Evaluation of antibodies against hydatid cyst fluid antigens in the post-treatment follow-up of cystic echinococcosis patients.** *Med Sci Monit*. 15(4):CR170-6.
- Chauhan et al. (2023). **In silico study to predict promiscuous peptides for immunodiagnosis of cystic echinococcosis.** *Trop Parasitol*. 13(1):54-62.
- Chen et al. (2006). **MeMo: a web tool for prediction of protein methylation modifications.** *Nucleic Acids Research*. 34(Web Server issue):W249-53.
- Chirag et al. (2015). **Detection of hydatid-specific antibodies in the serum and urine for the diagnosis of cystic echinococcosis in patients from the Kashmir Valley, India.** *J Helminthol*. 89(2):232-7.
- Christophe et al. (2010). **High-throughput prediction of protein antigenicity using protein microarray data.** *Bioinformatics*. 26;23:2936–2943.
- Craig et al. (2007). **Prevention and control of cystic echinococcosis.** *Lancet Infect Dis*. 7(6):385-94.
- 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.
- Darabi et al. (2019). **Design and Construction of a Fusion Peptide Containing B1, B2, B4, and EPC1 Epitopes for Diagnosis of Human Cystic Echinococcosis.** *Iran J Public Health*. 48(9):1671-1680.
- de Castro et al. (2006). **ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins.** *Nucleic Acids Res*. 1;34(Web Server issue):W362-5.
- Deng et al. (2016). **GPS-PAIL: prediction of lysine acetyltransferase-specific modification sites from protein sequences.** *Sci Rep* 6:39787.
- Deplazes et al. (2017). **Global Distribution of Alveolar and Cystic Echinococcosis.** *Adv Parasitol*. 95:315-493.
- Díaz et al. (2016). **Parasite molecules and host responses in cystic echinococcosis.** *Parasite Immunol*. 38(3):193-205.

Doytchinova et al. (2007). **VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines.** *BMC Bioinformatics*. 5;8:4.

Emanuelsson et al. (2000). **Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence.** *J Mol Biol*. 21;300(4):1005-16.

Fathi et al. (2018). **Design and construction of a new recombinant fusion protein (2b2t+EPC1) and its assessment for serodiagnosis of cystic echinococcosis.** *APMIS*. 126(5):428-439.

Fleishman, et al. (2006). **Transmembrane protein structures without X-rays.** *Trends in biochemical sciences*.106-13.

Florez et al. (2017). **Synthetic Peptides Derived from Ribosomal Proteins of Leishmania spp. in Mucocutaneous Leishmaniasis: Diagnostic Usefulness.** *Protein Pept Lett*. 24(10):982-988.

Folle et al. (2017). **Characterisation of Antigen B Protein Species Present in the Hydatid Cyst Fluid of Echinococcus canadensis G7 Genotype.** *PLoS Negl Trop Dis*. 11(1):e0005250.

Folle et al. (2024). **Modulatory actions of Echinococcus granulosus antigen B on macrophage inflammatory activation.** *Front Cell Infect Microbiol*. 18;14:1362765.

Gauna et al. (2015). **Synthetic peptides for the immunodiagnosis of hepatitis A virus infection.** *J Immunol Methods*. 427:1-5.

Gómara et al. (2007). **Synthetic peptides for the immunodiagnosis of human diseases.** *Curr Med Chem*. 148(5):531-46.

Gomez et al. (2015). **Genome analysis of Excretory/Secretory proteins in Taenia solium reveals their Abundance of Antigenic Regions (AAR).** *Sci Rep*. 19;5:9683.

González-Sapienza et al. (2000). **Improved immunodiagnosis of cystic hydatid disease by using a synthetic peptide with higher diagnostic value than that of its parent protein, Echinococcus granulosus antigen B.** *J Clin Microbiol*. 38(11):3979-83.

Gonzalez-Sapienza et al. (2003). **Identification of Critical Residues of an Immunodominant Region of Echinococcus granulosus Antigen B.** *Journal of Biological Chemistry*, 278(22), 20179–20184.

Guimarães-Peixoto et al. (2016). **Evaluation of a synthetic peptide from the Taenia saginata 18kDa surface/secreted oncospherical adhesion protein for serological diagnosis of bovine cysticercosis.** *Acta Trop*. 164:463-468.

Gupta et al. (2002). **Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function.** *Pac Symp Biocomput*. 2002;:310-22.

Han et al. (2019). **Survey of echinococcoses in southeastern Qinghai Province, China, and serodiagnostic insights of recombinant Echinococcus granulosus antigen B isoforms.** *Parasit Vectors*. 12:323.

Hernández et al. (2005). **Cystic echinococcosis: analysis of the serological profile related to the risk factors in individuals without ultrasound liver changes living in an endemic area of Tacuarembó, Uruguay.** *Parasitology*.130(Pt 4):455-60.

Hernández-González et al. (2012). **Improved serodiagnosis of cystic echinococcosis using the new recombinant 2B2t antigen.** *PLoS Negl Trop Dis.* 6(7):e1714.

Hernandez-Gonzalez et al. (2018). **Evaluation of the recombinant antigens B2t and 2B2t, compared with hydatid fluid, in IgG-ELISA and immunostrips for the diagnosis and follow up of CE patients.** *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12:e0006741.

Huttner et al. (2008). **Genetic characterization and phylogenetic position of *Echinococcus felidis* (Cestoda: Taeniidae) from the African lion.** *International Journal for Parasitology.* 38, 861–868.

Ito et al (2014). **Cystic echinococcoses in Mongolia: molecular identification, serology and risk factors.** *PLoS Negl Trop Dis.* 8:e2937.

Jensen et al. (2018). **Improved methods for predicting peptide binding affinity to MHC class II molecules.** *Immunology.* 154(3):394-406.

Jespersen et al. (2017). **BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes.** *Nucleic Acids* 3;45(W1):W24-W29.

Jian et al. (2008). **CSS-Palm 2.0: an updated software for palmitoylation sites prediction.** *Protein Engineering, Design and Selection.* 21;11:639–644.

Jiang et al. (2012). **Analysis on the reactivity of five subunits of antigen B family in serodiagnosis of echinococcosis.** *Exp Parasitol.* 131(1):85-91.

Johansen et al. (2006). **Analysis and prediction of mammalian protein glycation.** *Glycobiology.* 16:844-853.

Julenius et al. (2007). **NetCGlyc 1.0: prediction of mammalian C-mannosylation sites.** *Glycobiology.* 17(8):868-76.

Jumper et al. (2021). **Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold.** *Nature.* 596(7873):583-589.

Kalantari et al. (2010). **Application of recombinant *Echinococcus granulosus* antigen B to ELISA kits for diagnosing hydatidosis.** *Parasitol Res.* 106(4):847-51.

Käll et al. (2004). **A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method.** *J Mol Biol.* 14;338(5):1027-36.

Kern et al. (2017). **The Echinococcoses: Diagnosis, Clinical Management and Burden of Disease.** *Adv Parasitol.* 96:259-369.

Kiemer et al. (2005). **NetAcet: prediction of N-terminal acetylation sites.** *Bioinformatics.* 1;21(7):1269-70.

Kilimcioğlu et al. (2013). **A mass screening survey of cystic echinococcosis by ultrasonography, Western blotting, and ELISA among university students in Manisa, Turkey.** *Acta Trop.* 128(3):578-83.

Krogh et al. (2001). **Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes.** *J Mol Biol.* 19;305(3):567-80.

Krorhone et al. (2022). **Chromosome-scale *Echinococcus granulosus* (genotype G1) genome reveals the Eg95 gene family and conservation of the EG95-vaccine molecule.** *Commun Biol* 5, 199.

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.

Lawn et al. (2004). **Human cystic echinococcosis: evaluation of post-treatment serologic follow-up by IgG subclass antibody detection.** *Am J Trop Med Hyg.* 70(3):329-35.

Lipman et al. (2005). **Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources.** *ILAR J.* 46(3):258-68.

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. (2012). **GPS-ARM: Computational Analysis of the APC/C Recognition Motif by Predicting D-Boxes and KEN-Boxes.** *Plos one.* 7(3): e34370.

Lorenzo et al. (2005). **Comparative analysis of the diagnostic performance of six major *Echinococcus granulosus* antigens assessed in a double-blind, randomized multicenter study.** *J Clin Microbiol.* 43(6):2764-70.

Lymbery et al. (2014). ***Echinococcus canadensis*, *E. borealis*, and *E. intermedius*. What's in a name?** *Trends Parasitol.* 31(1):23-9.

Ma et al (2016) **Development of a Peptide ELISA for the Diagnosis of Aleutian Mink Disease.** *PLoS One.* 11(11):e0165793.

Manocha, et al. (2003). **Comparing modified and plain peptide linked enzyme immunosorbent assay (ELISA) for detection of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) and type-2 (HIV-2) antibodies.** *Immunol. Lett.* 85:275-278.

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.

Marsden et al. (1992). **Advantages of branched peptides in serodiagnosis: Detection of HIV-specific antibodies and the use of glycine spacers to increase sensitivity,** *Journal of Immunological Methods*,147:1:65-72.

McManus et al. (2012). **Diagnosis, treatment, and management of echinococcosis.** *BMJ.* 11;344:e3866.

Merkuleva et al. (2022). **Comparative Immunogenicity of the Recombinant Receptor-Binding Domain of Protein S SARS-CoV-2 Obtained in Prokaryotic and Mammalian Expression Systems.** *Vaccines (Basel).* 9;10(1):96.

Meshgi et al. (2018). **Design and synthesis of a new peptide derived from *Fasciola gigantica* cathepsin L1 with potential application in serodiagnosis of fascioliasis.** *Exp Parasitol.* 189:76-86.

Milchram, et al. (2022). **A Novel Click Chemistry-based Peptide ELISA Protocol: Development and Technical Evaluation.** *BioTechniques,* 72(4), 134–142.

- Miles et al. (2017). **Identification of universal diagnostic peptide candidates for neglected tropical diseases caused by cestodes through the integration of multi-genome-wide analyses and immunoinformatic predictions.** *Infect Genet Evol.* 54:338-346.
- Miles et al. (2022). **Unraveling post-translational modifications in *Echinococcus granulosus sensu lato*.** *Acta Trop.* 230:106410.
- 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.
- Min et al. (2010). **Evaluation of computational methods for secreted protein prediction in different eukaryotes.** *J. Proteomics Bioinform.* 3, 143–147.
- Mohammadzadeh et al. (2012). **Comparison of the usefulness of hydatid cyst fluid, native antigen B and recombinant antigen B8/1 for serological diagnosis of cystic echinococcosis.** *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 106(6):371-5.
- Moro & Schantz. (2006). **Echinococcosis: historical landmarks and progress in research and control.** *Ann Trop Med Parasitol.* 100(8):703-14.
- Moro & Schantz. (2009). **Echinococcosis: a review.** *Int J Infect Dis.* 13(2):125-33.
- Mourglia-Ettlin et al. (2018). **Ageing impairs parasite-specific antibody responses in cystic echinococcosis.** *Parasite Immunol.* 40(1).
- Mucci et al (2017). **Next-generation ELISA diagnostic assay for Chagas Disease based on the combination of short peptidic epitopes.** *PLoS Negl Trop Dis.* 9;11(10):e0005972.
- Muzulin et al. (2007). **Echinococcus granulosus antigen B gene family: further studies of strain polymorphism at the genomic and transcriptional levels.** *Exp Parasitol.* 118(2):156-64.
- Nakao et al. (2013). **Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae).** *Int J Parasitol.* 43(12-13):1017-29.
- Oluka et al. (2023). **Optimisation and Validation of a conventional ELISA and cut-offs for detecting and quantifying anti-SARS-CoV-2 Spike, RBD, and Nucleoprotein IgG, IgM, and IgA antibodies in Uganda.** *Front Immunol.* 14;14:1113194.
- Overduin et al. (2021). **Transmembrane Protein Targets and Bound Lipids.** *Membranes (Basel).* 17;11(6):451.
- Pagnozzi et al (2016). **Diagnostic Accuracy of Antigen 5-Based ELISAs for Human Cystic Echinococcosis.** *PLoS Negl Trop Dis.* 29;10(3):e0004585.
- Pagnozzi et al. (2014). **An easy and efficient method for native and immunoreactive *Echinococcus granulosus* antigen 5 enrichment from hydatid cyst fluid.** *PLoS One.* 9(8):e104962.
- Pagnozzi et al. (2018). **Structural and immunodiagnostic characterization of synthetic antigen B subunits from *Echinococcus granulosus* and their evaluation as target antigens for cyst viability assessment.** *Clin Infect Dis.* 2018;66:1342–1351.

Petersen et al. (2011). **SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions.** *Nat Methods.* 29;8(10):785-6.

Pierleoni et al. (2008). **PredGPI: a GPI-anchor predictor.** *BMC Bioinformatics.* 23;9:392.

Rahimi et al. (2011). **Performance of antigen B isolated from different hosts and cyst locations in diagnosis of cystic echinococcosis.** *Iran J Parasitol.* 6(1):12-9.

Requena et al. (2020). **Identification of Novel Candidate Epitopes on SARS-CoV-2 Proteins for South America: A Review of HLA Frequencies by Country.** *Front. Immunol.* 11:2008.

Romig et al. (2011). **Echinococcosis in sub-Saharan Africa: emerging complexity.** *Vet Parasitol.* 8;181(1):43-7.

Rossi et al. (2016). **The first meeting of the European Register of Cystic Echinococcosis (ERCE).** *Parasit Vectors.* 28;9:243.

Sadjjadi et al. (2013). **Evidence that the Echinococcus granulosus G6 genotype has an affinity for the brain in humans.** *Int J Parasitol.* 43(11):875-7.

Sánchez-Ovejero et al. (2020). **Evaluation of the sensitivity and specificity of GST-tagged recombinant antigens 2B2t, Ag5t and DIPOL in ELISA for the diagnosis and follow up of patients with cystic echinococcosis.** *PLoS Negl Trop Dis.* 30;14(11):e0008892.

Sanchez-Trincado et al. (2017). **Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction.** *J Immunol Res.* 2017:2680160.

Santivañez et al. (2012). **Serological diagnosis of lung cystic hydatid disease using the synthetic p176 peptide.** *Clin Vaccine Immunol.* 19(6):944-7.

Schweiger et al. (2012). **Serological diagnosis of echinococcosis: the diagnostic potential of native antigens.** *Infection.* 40(2):139-52.

Silva-Álvarez et al. (2015). **Echinococcus granulosus antigen B: a Hydrophobic Ligand Binding Protein at the host-parasite interface.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 93:17-23.

Stentoft et al. (2013). **Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology.** *EMBO J.* 15;32(10):1478-88.

Tamarozzi et al. (2013). **Recombinant AgB8/1 ELISA test vs. commercially available IgG ELISA test in the diagnosis of cystic echinococcosis.** *Parasite Immunol.* 35(12):433-40.

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.

Tamarozzi et al. (2021). **Serology for the diagnosis of human hepatic cystic echinococcosis and its relation with cyst staging: A systematic review of the literature with meta-analysis.** *PLoS Negl Trop Dis* 15(4): e0009370.

Tenguria & Naik (2014). **Evaluation of human cystic echinococcosis before and after surgery and chemotherapy by demonstration of antibodies in serum.** *Ann Parasitol.* 60(4):297-303.

Tsai et al. (2013). **The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism.** *Nature.* 496(7443):57-63.

Vengesai et al. (2023). **Diagnostic performances of Schistosoma haematobium and Schistosoma mansoni recombinant proteins, peptides and chimeric proteins antibody based tests. Systematic scoping review.** *PLoS One.* 2;18(3):e0282233.

Vola et al. (2019). **Diagnostic performances of commercial ELISA, Indirect Hemagglutination, and Western Blot in differentiation of hepatic echinococcal and non-echinococcal lesions: a retrospective analysis of data from a single referral centre.** *Am J Trop Med Hyg.* 101:1345–1349.

Wang et al. (2013). **Differential diagnosis of cystic and alveolar echinococcosis using an immunochromatographic test based on the detection of specific antibodies.** *Parasitol Res.* 112(10):3627-33.

Wang et al. (2015). **Characterization of Two Novel Linear B-Cell Epitopes in the Capsid Protein of Avian Hepatitis E Virus (HEV) That Are Common to Avian, Swine, and Human HEVs.** *J Virol.* 89(10):5491-501.

Wang et al. (2016). **The mimic epitopes of Mycobacterium tuberculosis screened by phage display peptide library have serodiagnostic potential for tuberculosis.** *Pathog Dis.* 74(8):ftw091.

Wang et al. (2020). **Identification of a Novel Linear B Cell Epitope on the Sao Protein of Streptococcus suis Serotype 2.** *Front Immunol.* 16;11:1492.

Wen et al. (2019). **Echinococcosis: Advances in the 21st Century.** *Clin Microbiol* 13;32(2):e00075-18.

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

Wolfe et al. (2021). **A high-throughput pipeline for design and selection of peptides targeting the SARS-Cov-2 Spike protein.** *Sci Rep,* 21768.

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.

Xie et al. (2016). **GPS-Lipid: a robust tool for the prediction of multiple lipid modification sites.** *Sci Rep.* 16;6:28249.

Xue et al. (2010). **GPS-SNO: computational prediction of protein S-nitrosylation sites with a modified GPS algorithm.** *PLoS One.* 24;5(6):e11290.

Zhang et al. (2012). **Immunology and immunodiagnosis of cystic echinococcosis: an update.** *Clin Dev Immunol.* 2012:101895.

Zhao et al. (2014). **GPS-SUMO: a tool for the prediction of sumoylation sites and SUMO-interaction motifs.** *Nucleic Acids Res.* 42(Web Server issue):W325-30.

Zhicheng et al. (2014). **Systematic analysis of the *in-situ* crosstalk of tyrosine modifications reveals no additional natural selection on multiply modified residues.** *Scientific Reports*. 4: 7331.