

Universidad de la República Oriental del Uruguay

Facultad de Ciencias

Tesis de Doctorado
PEDECIBA Biología

FABPs de cestodos: interacciones y destinos

Mag. Gabriela Alvite

Orientadora: Dra. Adriana Esteves

Co-orientadora: Dra. Betina Córscico

Tribunal:

Dra. Estela Castillo

Dra. Nibia Berois

Dr. Carlos Carmona

Abril del 2014

AGRADECIMIENTOS

A Marcelo, por su apoyo incondicional siempre, y a Seba y Mile por llenarme de alegría.

A mi madre y mi hermana, por su ayuda constante y por inculcarme valores como la perseverancia.

A Adriana, por su orientación, apoyo y gran dedicación. Por respetar mis tiempos y a su vez alentarme.

A mis amigos de Bioquímica, de los cuales aprendo cada día, me acompañan siempre y comparto mucho, especialmente Cora, Claudio, Ana y Ceci.

A Alejandra Kun, por recibirme en su laboratorio y orientarme con las microscopías.

A Betina Córscico, por orientarme en los ensayos de FRET.

A Lucía Turell, por ayudarme con las actividades enzimáticas de las fracciones.

A Madia Trujillo, por enseñarme el uso del espectrofluorímetro de cinética rápida.

A la ANII, por el apoyo financiero a mi proyecto de doctorado (FCE).

A CSIC, por otorgarme una beca de apoyo a posgrado (CAP).

Al PEDECIBA, por el apoyo financiero.

A Madelón y al servicio UByPA del Instituto Pasteur, por los varios MS.

Al tribunal, por aceptar evaluar este trabajo y por los aportes al mismo.

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	3
2.1. Proteínas de unión de ácidos grasos	3
2.1.1. Clasificación	3
2.1.2. Estructura	4
2.1.3. Funciones	7
2.1.4. Patologías vinculadas a las FABPs	10
2.2. Modelos experimentales	11
2.2.1. Clasificación taxonómica	11
2.2.2. Ciclo de vida de <i>Echinococcus granulosus</i>	12
2.2.3. Echinococcosis quística	14
2.2.4. <i>Mesocestoides vogae, syn. (corti)</i>	17
2.3. Metabolismo lipídico en platelmintos parásitos	18
2.4. FABPs en platelmintos parásitos	21
2.4.1. FABPs en los organismos de estudio	24
3. Hipótesis de trabajo y objetivos	26
3.1. Hipótesis de trabajo	26
3.2. Objetivo general	26
3.3. Objetivos específicos	27
4. Localización subcelular de EgFABPs y MvFABPs	28
4.1. Materiales y métodos	28
4.1.1. Fraccionamiento subcelular, electroforesis uni y bidimensional, <i>Western Blot</i> y espectrometría de masa	28
4.1.1.1. Colecta de material parasitario	28
4.1.1.2. Fraccionamiento subcelular	29
4.1.1.3. Verificación del enriquecimiento de las fracciones	29
4.1.1.4. Electroforesis 1D y 2D	30
4.1.1.5. <i>Western Blot</i>	31
4.1.1.6. Espectrometría de masa	31
4.1.2. Inmunomicroscopía de fluorescencia confocal	32
4.1.2.1. Clonado de las secuencias codificantes completas de MvFABPa y MvFABPb	33
4.1.2.2. Expresión y purificación de rMvFABPa y rMvFABPb	34
4.1.2.3. Purificación del suero anti-rEgFABP1	34
4.1.2.4. Producción de sueros contra rMvFABPa y rMvFABPb	35
4.1.2.5. Purificación de sueros contra rMvFABPa y rMvFABPb	35

4.1.2.6.	Producción de extractos proteicos de protoescólices y tetratiridos	36
4.1.2.7.	Inmunolocalizaciones <i>in toto</i>	37
4.1.2.8.	Inmunohistoquímicas sobre criosecciones	38
4.1.2.9.	Microscopía de fluorescencia confocal	39
4.2.	Resultados	40
4.2.1.	Purificación del suero anti-rEgFABP1	40
4.2.2.	Inmunolocalización <i>in toto</i> de MvFABPs en tetratiridos	42
4.2.3.	Fraccionamiento subcelular e identificación mediante electroforesis 1D y 2D asociadas a <i>WB</i> y <i>MS</i>	48
4.2.3.1.	Determinación de actividades enzimáticas marcadoras	49
4.2.3.2.	Microscopía de fluorescencia de la fracción nuclear	52
4.2.3.3.	Detección de FABPs mediante SDS-PAGE 1D y <i>WB</i>	52
4.2.3.4.	Identificación de FABPs en fracciones subcelulares de protoescólices	54
4.2.3.5.	Posibles modificaciones postraduccionales	65
4.2.3.6.	Identificación de FABPs en fracciones subcelulares de tetratiridos	67
4.2.4.	Localización subcelular con anticuerpos específicos	76
4.2.4.1.	Generación de MvFABPa y MvFABPb recombinantes	76
4.2.4.2.	Purificación de los sueros policlonales anti-rMvFABPa y anti-rMvFABPb	83
4.2.4.3.	Inmunolocalización de MvFABPs en criosecciones	85
5.	Interacción FABP-membrana, interacción FABP-proteína	93
5.1.	Materiales y métodos	93
5.1.1.	Estudio de interacción FABP-membrana: ensayos de FRET	93
5.1.1.1.	Expresión y purificación de rEgFABP1	93
5.1.1.2.	Delipidación de proteínas recombinantes	94
5.1.1.3.	Ensayos de unión con antriloxi ácidos grasos	94
5.1.1.4.	Preparación de vesículas fosfolipídicas	94
5.1.1.5.	Determinación del coeficiente de partición relativo (K_p)	95
5.1.1.6.	Transferencia de 12AS desde rFABPs a SUVs	95
5.1.2.	Interacción FABP-proteína	96
5.1.2.1.	Ensayos de captura de ligandos: clonado de EgFABPs y MvFABPs en vector pQE	96
5.1.2.2.	Ensayos de captura de ligandos: producción y purificación de las His-EgFABPs y His-MvFABPs	97
5.1.2.3.	Ensayos de captura de ligandos: preparación de extractos proteicos	98

5.1.2.4.	Ensayos de captura de ligandos	98
5.1.2.5.	Ensayos de inmunoprecipitación	99
5.1.2.6.	Identificación mediante espectrometría de masa	100
5.2.	Resultados	101
5.2.1.	Estudios de interacción FABPs-membranas artificiales	101
5.2.1.1.	Ensayos de unión de rEgFABP1 con el ligando 12AS	101
5.2.1.2.	Determinación del coeficiente de partición relativo (Kp)	104
5.2.1.3.	Efecto de la concentración de las vesículas en la transferencia del 12AS desde las FABPs a membranas	104
5.2.1.4.	Efecto de la carga de las vesículas en la transferencia del 12AS desde las FABPs a membranas	107
5.2.1.5.	Efecto de la fuerza iónica en la transferencia del 12AS desde las FABPs a membranas	111
5.2.1.6.	Análisis de los potenciales electrostáticos de superficie	114
5.2.2.	Estudios de interacción FABP-proteína: ensayos de captura de ligandos	117
5.2.2.1.	Clonado de los ADNc de las EgFABPs y MvFABPs en pQE y expresión de las proteínas recombinantes	117
5.2.2.2.	Purificación de His-EgFABP1, His-MvFABPa y His-MvFABPb	120
5.2.2.3.	Ensayos de captura de ligandos de EgFABP1	126
5.2.2.4.	Ensayos de captura de ligandos de MvFABPa	128
5.2.2.5.	Ensayos de captura de ligandos de MvFABPb	129
5.2.3.	Estudios de interacción FABP-proteína: ensayos de inmunoprecipitación	131
5.2.3.1.	Ensayos de inmunoprecipitación de EgFABP1, MvFABPa y MvFABPb	131
5.2.3.2.	Identificación de proteínas en el inmunoprecipitado con anticuerpo contra rEgFABP1	135
5.2.3.3.	Identificación de proteínas en el inmunoprecipitado con anticuerpo contra rMvFABPa	139
5.2.3.4.	Identificación de proteínas en el inmunoprecipitado con anticuerpo contra rMvFABPb	147
6.	Discusión	152
7.	Conclusiones y perspectivas	168
8.	Bibliografía	172
9.	Abreviaturas	195

1. RESUMEN

Este trabajo se enmarca en una línea general seguida por nuestro laboratorio desde tiempo atrás, basada en el estudio, a nivel molecular, de la biología de los parásitos *Echinococcus granulosus* y *Mesocestoides vogae*. Han surgido así las proteínas de unión de ácidos grasos (FABPs), que podrían ser claves para la supervivencia de *E. granulosus* y *M. vogae*, y son en sí mismas todo un desafío. Los cestodos son incapaces de sintetizar *de novo* la mayoría de sus propios lípidos dependiendo de la captura de los mismos del hospedero, proceso en donde las FABPs podrían estar involucradas. Las FABPs son proteínas muy conservadas a lo largo de la escala zoológica para las cuales la elucidación de su función es uno de los temas aún no resuelto por la comunidad científica internacional. Se trata de proteínas de bajo peso molecular, principalmente intracelulares y capaces de unir ácidos grasos (AG) y otras moléculas hidrofóbicas pequeñas. Previamente, hemos aislado dos genes que codifican FABPs de *E. granulosus* (EgFABP1 y EgFABP2) y de *M. vogae* (MvFABPa y MvFABPb).

En este trabajo nos proponemos profundizar en el conocimiento de la biología molecular de los cestodos mediante la comprensión de los mecanismos moleculares de acción de las FABPs de *E. granulosus* y *M. vogae*. Buscamos definir los destinos subcelulares de las EgFABPs y las MvFABPs utilizando dos estrategias experimentales distintas. Por un lado, aplicamos electroforesis uni y bidimensionales a fracciones subcelulares de las formas larvarias e identificamos estas proteínas mediante *Western Blot* y espectrometría de masa. Por otro lado, realizamos inmunolocalizaciones *in toto* y sobre criosecciones, buscando colocalización con marcadores subcelulares fluorescentes. Asimismo, determinamos si estos organismos son capaces de capturar un análogo de ácido graso. Además, analizamos el mecanismo de transferencia de ligandos desde EgFABP1, MvFABPa y MvFABPb hacia membranas artificiales, utilizando ensayos de Transferencia de Energía de Resonancia de Förster (FRET). Finalmente, nos propusimos identificar las proteínas del parásito capaces de interactuar con las FABPs, utilizando dos métodos complementarios, captura de ligando e inmunoprecipitación, y posterior identificación mediante espectrometría de masa.

De esta manera identificamos a tres isoformas de EgFABP1 en la fracción citosólica, nuclear, mitocondrial y microsomal de células de protoescoleces de *E. granulosus*. Proponemos que dos isoformas pueden poseer modificaciones postraduccionales como fosforilación y trimetilación de lisinas. A pesar de los esfuerzos realizados, EgFABP2 no pudo ser identificada en las fracciones analizadas, sugiriéndonos una expresión baja o nula en el estadio de protoescoleces. Por otro lado, encontramos que tanto MvFABPa como MvFABPb se localizan en la fracción citosólica, nuclear, mitocondrial y microsomal, de células de tetratiridios de *M. vogae*. La presencia de MvFABPa y MvFABPb en citosol, núcleo y mitocondrias es verificada a través de inmunolocalizaciones. Destacamos que este trabajo muestra, por primera vez, que los tetratiridios son capaces de capturar ácidos grasos del medio, y proporciona evidencias que indican que MvFABPa y MvFABPb podrían ser las responsables de distribuirlo en el citosol, ya que ambas MvFABPs colocalizan con el

análogo de ácido graso. Además, encontramos a MvFABPb en gotas lipídicas en el citosol, sugiriendo la participación de dicha proteína en el almacenamiento de AG. En base a la localización nuclear de EgFABP1, MvFABPa y MvFABPb, así como del ácido graso fluorescente, y a la presencia de la señal de localización nuclear en dichas proteínas y de la señal de exportación nuclear exclusivamente en MvFABPa, sugerimos que EgFABP1 y MvFABPb podrían llevar AG al núcleo, mientras que MvFABPa podría exportar AG excedentes hacia el citosol. Debido a la localización de MvFABPa en el aparato de Golgi, sugerimos que esta proteína podría ser secretada al medio llevando, tal vez, AG hacia el exterior evitando así su acción deletérea. También es posible que EgFABP1, MvFABPa y MvFABPb transporten además, los AG hacia las mitocondrias para ser utilizados como vía alternativa de energía. En este trabajo determinamos que el mecanismo de transferencia de ligandos desde EgFABP1, MvFABPa y MvFABPb hacia membranas modelo es colisional. EgFABP1 y MvFABPa presentan un comportamiento similar donde la interacción proteína-membrana es mediada por factores iónicos e hidrofóbicos. En cambio, MvFABPb presenta un mecanismo de transferencia del tipo colisional fuerte al transferir el ligando a las membranas negativas mientras que adopta un mecanismo del tipo colisional débil para entregar el ligando a las membranas neutras. Sugerimos que la alta densidad de carga positiva en la región helical de MvFABPb sería la responsable de la fuerte interacción electrostática que podría establecerse con las membranas negativas o con proteínas de membrana que exponen residuos negativos. A partir del análisis de las proteínas que podrían interactuar con las FABPs encontramos que una proteína similar al factor de elongación de la planta del caucho podría interactuar con EgFABP1, una proteína similar a la cadena liviana reguladora de la miosina (CLRM) de invertebrados podría interactuar con MvFABPa y MvFABPb, y una proteína similar a la paramiosina de *E. granulosus* podría interactuar con MvFABPa.

Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que las FABPs de los platelmintos parásitos llevarían a cabo la mayoría de las funciones que actualmente cumplen los diversos tipos de FABPs de vertebrados. El estudio de las modificaciones postraduccionales de la EgFABP1, así como de la posible interacción entre las FABPs estudiadas y factores transcripcionales, y la confirmación de la interacción de las FABPs con las proteínas musculares identificadas nos permitirá avanzar en el conocimiento de las funciones de las FABPs.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Proteínas de unión de ácidos grasos

2.1.1. Clasificación

Las proteínas de unión de ácidos grasos (FABPs), se clasifican dentro de la superfamilia de las Calicinas. Esta superfamilia incluye a las proteínas de unión de ligandos lipofílicos cuyos miembros están ampliamente distribuidos en el reino animal (Flower, 1993). Se subdivide en tres familias: las Avidinas, las Lipocalinas, y las Proteínas de unión de lípidos intracelulares (iLBPs) (Flower, 1996). A pesar de presentar baja identidad de secuencia a nivel aminoacídico (menos del 10% de identidad), las Calicinas comparten su estructura tridimensional de barril β (Flower, 1996). Las iLBPs, incluyen a las proteínas de unión de ácidos grasos (FABPs), junto con las proteínas que unen ácido retinoico celular (CRABPs) y las que unen retinol celular (CRBPs). Estas proteínas participan en la captura celular y transporte intracelular de varios compuestos hidrofóbicos, como son los ácidos grasos de cadena larga (AG), colesterol y retinoides, entre otros (Glatz et van der Vusse, 1996; Donovan et al., 1996). Estos ligandos participan en diversos procesos celulares, incluyendo la síntesis de membranas, modificación de proteínas, regulación de la transcripción, señalización intracelular y provisión de energía metabólica. La calidad de insolubles de los lípidos determina la necesidad de contar con moléculas capaces de transportarlos a través del citoplasma y conducirlos hacia sus destinos metabólicos. Miembros de las iLBPs han sido identificados tanto en vertebrados como en invertebrados.

La presencia de las FABPs parece estar confinada al reino animal, sugiriendo que el gen ancestral surgió luego de la divergencia de animales, hongos y plantas (1200-1000 millones de años atrás). Se estima que la primera duplicación génica ocurrió hace alrededor de 930 millones de años (Schaap et al., 2002). La hipótesis de que estos genes comparten un origen evolutivo común se apoya en que la organización génica de las iLBPs de vertebrados es conservada y presenta una estructura de cuatro-exones/tres-intrones (Ganformina et al., 2000; Schaap et al., 2002; Veerkamp et Maatman, 1995).

Las FABPs son proteínas principalmente intracelulares, de entre 14 y 15 kDa (127 a 134 aminoácidos). En mamíferos se han descrito nueve miembros, cada uno

nombrado de acuerdo al órgano o tejido en donde fue aislado por primera vez y/o en el que su expresión predomina: corazón (H-FABP) (Fournier et al., 1978), adipocito (ap2 o A-FABP) (Bernlohr et al., 1984), hígado (L-FABP) (Mishkin et al., 1972, Gordon et al., 1983; Chan et al., 1985), cerebro/retina (B-FABP/R-FABP) (Feng et al., 1994), intestino (I-FABP) (Alpers et al., 1984), epidermis (E-FABP/K-FABP) (Siegenthaler et al., 1993), células de Schwann (proteína P2 de mielina/My-FABP) (Weise et al., 1980), ileón (gastrotropina o il-FABP) (Walz et al., 1988; Gantz et al., 1989), y testículos (T-FABP) (Oko et Morales, 1994). Algunos miembros de esta subfamilia se expresan en un único tejido, mientras que otras lo hacen en varios. A modo de ejemplo, en mamíferos se ha determinado que la expresión de A-FABP está confinada casi exclusivamente al tejido adiposo (Coe et Bernlohr, 1998); mientras que la H-FABP se expresa en el corazón, músculo esquelético, riñón, testículos, glándula mamaria, glándula adrenal y cerebro, predominando en los dos primeros tejidos (Hertz et Bernlohr, 2000). La expresión de FABPs en un tipo celular dado refleja su capacidad de metabolizar lípidos, llegando a representar del 1 al 5% de las proteínas citosólicas solubles totales (Hauerland et Spener, 2004).

En los invertebrados se han aislado varias FABPs de platelmintos, nematodos y artrópodos. Dichas proteínas presentan identidad de secuencia baja con las FABPs de vertebrados, siendo ésta mayor con las del tipo H-FABP (Esteves et Ehrlich, 2006). Sin embargo, las estructuras resueltas y predictivas coinciden con la estructura de barril β consenso descrita para las FABPs de vertebrados (Benning et al., 1992; Hauerland et al., 1994; Jakobsson et al., 2003). Con respecto a la organización génica, la posición de los intrones de las FABPs de invertebrados es conservada en relación a las proteínas de vertebrados aunque el número de los mismos es variable. Por otro lado, la expresión de FABPs en invertebrados parece estar relacionada a procesos de desarrollo. Se considera la hipótesis que la FABP de tipo cardíaca, frecuente en invertebrados, podría ser cercana a la FABP ancestral y llevaría a cabo todas las funciones de los diversos tipos de FABPs de vertebrados (Esteves et Ehrlich, 2006).

2.1.2. Estructura

Las FABPs poseen una identidad variable a nivel de su estructura primaria (20-70%). A pesar de ello, se ha definido una región relativamente conservada en la

secuencia aminoacídica de las FABPs, ubicada en el extremo N-terminal, que oficia de huella de la familia: [GSAIVK]-{FE}-[FYW]-x-[LIVMF]-x(2)-{K}-x-[NHG]-[FY]-[DE]-x-[LIVMFY]-[LIVM]-{N}-{G}-[LIVMAKR] (ExpPASy, entrada PROSITE PS00214).

Es también una característica compartida por todos los miembros de la familia su estructura de barril β (Figura 1). El mismo contiene diez cadenas β antiparalelas organizadas en dos hojas casi ortogonales que forman un barril levemente elíptico, con un motivo hélice-vuelta-hélice uniendo las dos primeras cadenas beta (β A y β B) (Banaszak et al., 1994; Zhang et al., 2003). Se ha descrito una región portal que podría actuar como una puerta de ingreso y egreso de ácidos grasos, que comprende la hélice α -II, y los giros β C- β D y β E- β F (Sacchettini et al., 1989; Banaszak et al., 1994). Mediante la comparación de estructuras de apo y holo-FABPs se ha determinado que existen regiones específicas de desorden en el dominio portal de la forma apo (Richieri et al., 1999; He et al., 2007), sugiriendo así que ocurren cambios conformacionales en esta región durante la unión o liberación del ácido graso.

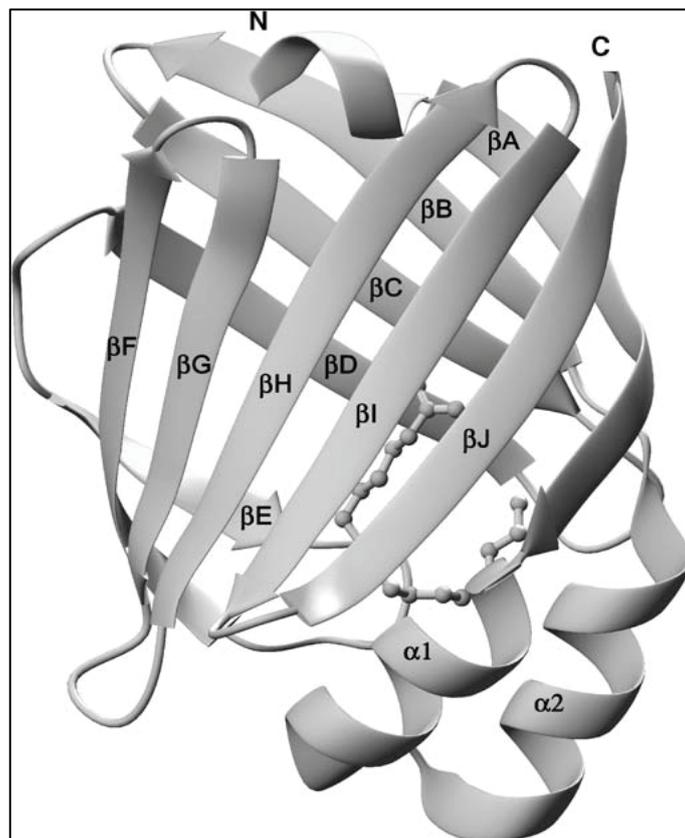


Figura 1. Estructura tridimensional de la proteína de unión a ácidos grasos 1 de *Echinococcus granulosus* recombinante. Se muestra el ligando unido (ácido palmítico).

Los elementos de estructura secundaria se marcan con los nombres convencionales (β A a β J, α 1 y α 2). Figura tomada de Jakobsson et al., 2003.

Los distintos miembros de la familia alojan el o los ligandos en un bolsillo hidrofóbico, variando la posición o los puntos de contacto dependiendo de cada proteína. Generalmente, los miembros del grupo al que pertenecen las H-FABPs acomodan sus ligandos en una conformación con forma de U, dirigiendo el grupo carboxilato hacia el fondo de la cavidad para así interactuar con los residuos Arg106-Arg126-Tyr128. La estructura de FABPs de invertebrados resueltas muestran que el grupo carboxilato del ligando interactúa con la misma región interior del barril (Esteves et Ehrlich, 2006). Todos los complejos FABP-ácido graso cuya estructura ha sido determinada exhiben una estequiometría de unión 1:1, con excepción del de la L-FABP que puede unir dos ligandos (Thompson et al., 1999; Hanhoff et al., 2002).

A pesar de no haberse detectado en estas proteínas dominios funcionales consenso, podrían existir a nivel de superficie, elementos estructurales que conformen sitios específicos de interacción con membranas o proteínas. En particular en la FABP de adipocito se han identificado ciertos dominios funcionales potenciales que incluyen la señal de localización nuclear (NLS), la señal de exportación nuclear (NES) y el sitio de unión de la lipasa sensible a hormona (HSL) (Ayers et al., 2007, Gillian et al., 2007; Smith et al., 2007). La secuencia primaria no muestra la señal NLS consenso lineal (K-K/R-X-K/R); sin embargo, la señal se encuentra en la estructura tridimensional de la proteína y se localiza en tres residuos básicos (K21, R30, K31) en la región hélice-vuelta-hélice (Ayers et al., 2007). La señal NES tampoco está presente en la estructura primaria pero se ensambla en la estructura terciaria a partir de tres residuos de leucinas no-adyacentes (L66, L86, L91) (Ayers et al., 2007). La entrada de ciertos ligandos activa la señal NLS; genera una oscilación de la F57, cerrando el portal y contrayendo el bolsillo de unión. Se ha demostrado que los ligandos que actúan como no-activadores (por ejemplo, oleato y estearato) protruyen desde el portal, impidiendo su cierre, mientras que los ligandos activadores (por ejemplo, troglitazona, ácido linoleico, y sulfonato de anilinaftaleno) favorecen la conformación en donde la señal NLS está expuesta (Gillian et al., 2007).

2.1.3. Funciones

La función específica de cada FABP está aún bajo investigación, si bien recientemente se han obtenido hallazgos prometedores (Smith et al., 2007; Storch et Córscico, 2008, Hostetler et al., 2009, Storch et Thumser, 2010). La abundancia tejida específica y afinidad diferencial por los ácidos grasos, sugieren que cada FABP puede cumplir roles específicos dentro de los tejidos en que se encuentran (Storch et McDermott, 2009). Por ejemplo, a la I-FABP se le atribuye un rol en la absorción de los ácidos grasos de la dieta, mientras que la H-FABP y la L-FABP se relacionan con la beta-oxidación cardíaca y la oxidación peroxisomal, respectivamente.

Tradicionalmente, se ha postulado que la función general de estas proteínas es la solubilización de sus ligandos y su transporte a través del citosol (Peeters et Veerkamp, 1989; Waggoner et al., 1990). Sin embargo, con el correr de los años su carácter de meros transportadores se ha ido modificando. Hertz el y Bernlhor consideran a las FABPs como chaperonas, debido a su capacidad de proteger y dirigir a los ácidos grasos dentro de la célula y por su participación activa en la adquisición o remoción de ácidos grasos de los depósitos intracelulares (Hertz el et Bernlhor, 2000).

Algunos miembros de esta familia estarían implicados en procesos de regulación de la expresión génica (Schroeder et al., 2008, Hostetler et al., 2009), modulación del crecimiento y proliferación celular (Madsen et al., 1992; Yang et al., 1994; Shimizu et al., 1997; Wang et al., 2003), y regulación del metabolismo lipídico (Shen et al., 1999; Scheja et al 1999; Coe et al., 1999; Hertz el et al., 2002). Participarían, además, en la captura de ácidos grasos desde el medio extracelular, cooperando con los transportadores de membrana (FAT/CD36, FABPpm, FATP) (van der Vusse et al., 2002). Recientemente, se ha establecido la intervención de las FABPs de macrófagos en procesos inflamatorios a través de su rol en la síntesis del leucotrieno C4 (Long et al., 2013).

Las FABPs podrían adquirir o entregar sus ligandos a las membranas a través de diferentes mecanismos. Mediante ensayos de Transferencia de Energía de Resonancia de Förster (FRET) se ha demostrado que la mayoría de las FABPs transfieren su ligando a través de un mecanismo colisional que involucra interacciones

directas entre la proteína y la membrana, mientras que unas pocas utilizan un mecanismo de difusión en donde el ligando difunde hacia la película acuosa adyacente a la membrana. El mecanismo colisional sería aplicable a las proteínas de los subgrupos H-FABP, I-FABP, A-FABP, K-FABP, entre otras (Kim et Storch, 1992a; Wootan et al., 1993; Hsu et al., 1996; Storch et Thumser, 2000), mientras que el proceso de difusión ha sido descrito para las L-FABP y la proteína de unión a retinol celular de tipo II (CRBP-II) (Kim et Storch, 1992b; Herr et al., 1999; Thumser et Storch, 2000). En este contexto, el dominio α -helicoidal de las FABPs estaría implicado en la transferencia de los ácidos grasos mediante interacción electroestática entre los fosfolípidos aniónicos de las membranas y los residuos básicos de este dominio, en particular los residuos de lisina (Herr et al., 1995, Herr et al.1996; Córscico et al., 1998; Liou et al., 2001). Experiencias que involucran la delección de este dominio, la generación de proteínas quiméricas y la modificación de los residuos de lisinas en esta región, corroboran la importancia del dominio α -helicoidal y de los residuos de lisinas en la interacción FABP-membrana (Cistola et al., 1996; Wu et al., 2001; Córscico et al., 2004; Franchini et al., 2008; Córscico et al., 2005).

Una de las proteínas sobre la que se ha estudiado exhaustivamente su función *in vitro* es la A-FABP. Esta proteína interactúa con la lipasa sensible a hormona (HSL), sugiriendo el pasaje del ligando lipídico desde la A-FABP al sitio catalítico de la enzima para regular su actividad enzimática (Shen et al., 1999). Smith y colaboradores reportan que la A-FABP unida a ligando interacciona con la HSL fosforilada activada e identifican una región en el dominio helical de la A-FABP, llamada el cuarteto cargado (Asp17-Arg30-Asp18-Lys21), como el sitio de interacción con la HSL (Smith et al., 2007; Smith et al., 2008). Este cuarteto está conservado en otras FABPs que interaccionan con HSL (H-FABP y E-FABP) pero no en aquellas que no interaccionan (L-FABP y I-FABP), y podría ser un dominio de interacción con proteínas general, utilizado por las FABPs en el control regulatorio del metabolismo lipídico (Smith et al., 2008).

También ha sido descrita la interacción entre la E-FABP y la proteína de unión de calcio S100A7 en presencia de cationes divalentes, relocalizándose en estructuras de adhesión a membrana (Ruse et al., 2003).

La búsqueda de los destinos intracelulares ha sido una aproximación adoptada por varios investigadores como forma de esclarecer la función de los miembros de esta familia de proteínas. En la última década ha surgido fuerte evidencia indicando que varios miembros de la familia de las FABPs transportarían ácidos grasos desde el citoplasma hacia el núcleo donde serían transferidos a receptores nucleares, como respuesta a la activación por sus ligandos específicos. Varios grupos han demostrado no sólo la localización nuclear de la proteína y su ligando, sino también, el efecto activador del ligando en el proceso de translocación citoplasma-núcleo, así como la presencia de señales de translocación nuclear y exportación al citoplasma (Ves-Losada et al., 2001; Wolfrum et al., 2001; Huang et al., 2002; Gillilan et al., 2007; Ayers et al., 2007). Distintas experiencias sugieren que varios miembros de las FABPs interaccionarían con los receptores nucleares para transferirles el ligando unido, por ejemplo: A-FABP y E-FABP interaccionan con PPAR gama y beta, respectivamente; H-FABP con PPAR alfa; L-FABP con PPAR alfa y gama (Isseman et al., 1992; Tan et al., 2002; Schroeder et al., 2008).

Por otro lado, estudios de localización intracelular han sugerido que la H-FABP, se localiza en mitocondrias y núcleos; I-FABP en mitocondria, retículo endoplásmico/Golgi y región perinuclear, mientras que la L-FABP en los compartimentos anteriores y en la matriz de los peroxisomas, (Börchers et al., 1989; Thumser et Storch, 2007; Karsenty et al., 2009). Se determinó que la expresión de esta última es inducida por clofibrato (proliferador de peroxisomas) (Antonenkov et al., 2006). Asimismo, Karsenty y colaboradores han estudiado la distribución intracelular de la I-FABP, determinando que el dominio helical, podría ser importante para direccionar a la I-FABP hacia la región perinuclear, pero no hacia el retículo endoplásmico, aparato de Golgi y mitocondria, y que este dominio no es esencial para la unión del ligando (Karsenty et al., 2009).

En la figura 2 se muestra una síntesis de las funciones que podrían llevar a cabo las FABPs.

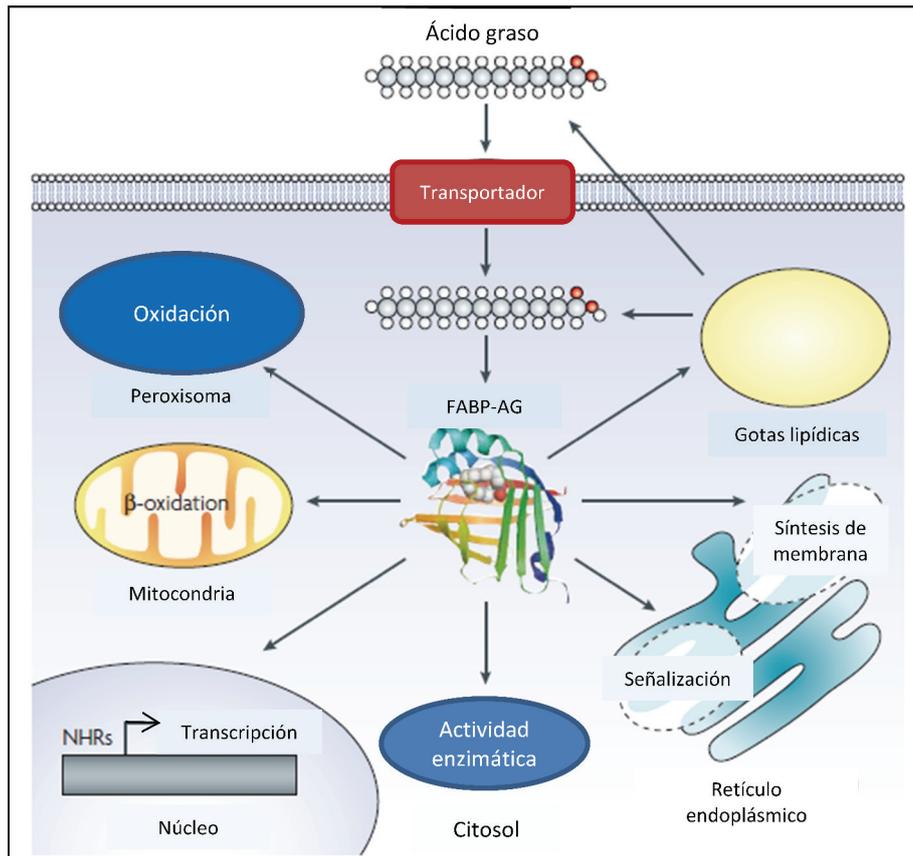


Figura 2. Funciones putativas de las FABPs en la célula. Se muestra el posible tránsito de AG transportados por las FABPs. Figura tomada y modificada de Furuhashi et Hotamisligil, 2008.

2.1.4. Patologías vinculadas a las FABPs

La comprensión de las funciones de las FABPs en sistemas complejos ha sido ampliada mediante el estudio de células o animales en donde la expresión de estas proteínas está genéticamente alterada (Hotamisligil et al., 1996; Binas et al., 1999; Vassileva et al., 2000; Owada et al., 2002; Martin et al 2003; Owada et al., 2006). Es así que, se han abierto nuevas interrogantes sobre los efectos sistémicos de las FABPs *in vivo* y sus mecanismos de acción. Estos estudios consideran a las FABPs como blancos terapéuticos potenciales para un rango de desórdenes asociados, incluyendo obesidad, diabetes y aterosclerosis. Se ha observado en algunos animales o tejidos deficientes en una FABP que existe una compensación de la FABP ausente mediante la sobreexpresión de otra FABP; por ejemplo, en adipocitos la ausencia de la A-FABP provoca el aumento de la E-FABP, normalmente presente en bajos niveles (Hotamisligil et al., 1996; Shaughnessy et al., 2000).

Las FABPs también parecen ser marcadores sensibles del daño tisular debido a que la concentración tisular es relativamente alta y la concentración en plasma es baja. Se ha demostrado que la H-FABP no sólo es un marcador excelente para la detección temprana del daño cardíaco en síndromes coronarios agudos, sino también es suficientemente sensible para detectar daños menores de miocardio en fallas cardíacas y muestra valores pronósticos promisorios para los eventos cardíacos (Chan et al., 2003; Bruins Slot et al., 2008). Resultados promisorios se obtuvieron utilizando la L-FABP de plasma como nuevo marcador para la detección de daño hepático, mientras que el nivel de L-FABP urinario es un buen indicador de lesión renal. El daño intestinal puede ser detectado específicamente por la I-FABP del plasma. El uso diagnóstico de la A-FABP, de la T-FABP y de la E-FABP, entre otras proteínas de unión a lípidos, todavía no ha sido explorado para la detección de daño tisular (Pelsers et Glatz., 2009).

2.2. Modelos experimentales

Nuestro grupo de investigación se ha centrado en el estudio de la estructura y función de las FABPs en los platelmintos parásitos *Echinococcus granulosus* (Esteves et al., 1993, Alvite et al., 2001; Esteves et al., 2003a; Jakobsson et al., 2003, Esteves et Ehrlich, 2006; Esteves, 2009) y *Mesocestoides vogae* (Alvite et al., 2008). En el presente trabajo utilizamos ambos parásitos como organismos de estudio.

2.2.1. Clasificación taxonómica

El *phylum Platyhelminthes* incluye los helmintos acelomados de cuerpo achatado dorso-ventralmente y simetría bilateral. Este *phylum* contiene cuatro clases: Turbellaria, Monogenea, Trematoda y Cestoidea o Cestoda. La clase Cestoidea incluye endoparásitos que no poseen tracto digestivo, se alimentan debido a la capacidad de absorción del tegumento sincitial cubierto de microtricas. Generalmente son segmentados y presentan órganos adhesivos en la extremidad anterior (ventosas). La clase Cestoda se divide en las subclases Cestodaria y Eucestoda. El cuerpo o estróbila de los organismos eucestodos es segmentado y consiste en un número de unidades reproductivas (proglótides) conteniendo órganos masculinos y femeninos. Esta subclase posee cuatro órdenes: Tetraphyllidea, Trypanorhynca, Pseudophyllidea y Cyclophyllidea. El orden Cyclophyllidea se caracteriza por la presencia de un escólex con cuatro ventosas musculares semi-esféricas y generalmente un rostelo que usualmente presenta ganchos. Este orden se subdivide en 14 familias, dos de las

cuales son Mesocestoididae y Taeniidae que incluyen parásitos de animales domésticos. La familia Taeniidae es la más importante del orden Cyclophyllidea desde el punto de vista sanitario y económico e incluye los géneros *Taenia* y *Echinococcus* (Thompson, 1995 y referencias incluidas).

Se definen cuatro especies dentro del género *Echinococcus*, *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. vogeli* y *E. oligarthrus*, las cuales presentan una gran especificidad de hospederos, posiblemente determinada por factores mecánicos, bioquímicos, fisicoquímicos, nutricionales e inmunológicos. Recientemente dos nuevas especies han sido identificadas: *E. shiquicus* (en mamíferos pequeños) y *E. felidis* (en leones africanos), pero los potenciales de transmisión se desconocen (Moro y Schantz, 2009). La familia Mesocestoididae no es tan relevante para la sanidad y la economía infectando a canes y gatos domésticos, solo algunos casos de infecciones en humanos fueron descritos.

2.2.2. Ciclo de vida de *Echinococcus granulosus*

El ciclo biológico del parásito *E. granulosus* se cumple entre animales ungulados herbívoros y predadores caninos; bajo circunstancias especiales el hombre es hospedero intermediario. *Echinococcus* requiere de dos hospederos mamíferos para completar su ciclo de vida: un hospedero definitivo donde el adulto se desarrolla en el intestino delgado, y un hospedero intermediario en cuyas vísceras se desarrolla el quiste hidático o larva metacestode. El hospedero definitivo es un carnívoro que se infecta al ingerir protoescólices (PEs) que son producidos por multiplicación asexual en el estadio larvario de metacestode. En un solo quiste puede haber cientos de PEs y cada uno es capaz de desarrollarse generando un gusano adulto sexualmente maduro que apenas mide de 3 a 6 mm y es hermafrodita. Los adultos producen huevos, cada uno de los cuales contiene un sólo embrión (oncósfera); estos huevos se depositan con las heces del hospedero definitivo y son capaces de sobrevivir períodos variables dependiendo de las condiciones ambientales. Los huevos son redondos, no operculados, con seis ganchos y cubierta radialmente estriada y resistente (Thompson, 1995).

La figura 3 ilustra el ciclo de vida de *Echinococcus granulosus*, comenzando por el hospedero definitivo que se infecta por la ingesta de vísceras que contienen protoescólices y el mismo se cierra en el hospedero intermediario (ovinos, bovinos, porcinos, caprinos, equinos, camellos, ciervos, humanos) donde la oncósfera penetra

la pared intestinal, pasando al sistema circulatorio o linfático, llegando así a los órganos blanco donde se desarrolla la forma larvaria.

La larva metacestode o quiste hidático de *Echinococcus granulosus* se representa en la figura 4, es unilocular, esférica y contiene líquido en su interior. Está formada por una capa interna o capa germinativa, parcialmente sincitial, nucleada y rodeada externamente por una capa elástica y acelular de espesor variable, la capa laminar; ésta está rodeada a su vez por una capa fibrosa producida por el hospedador llamada capa adventicia.

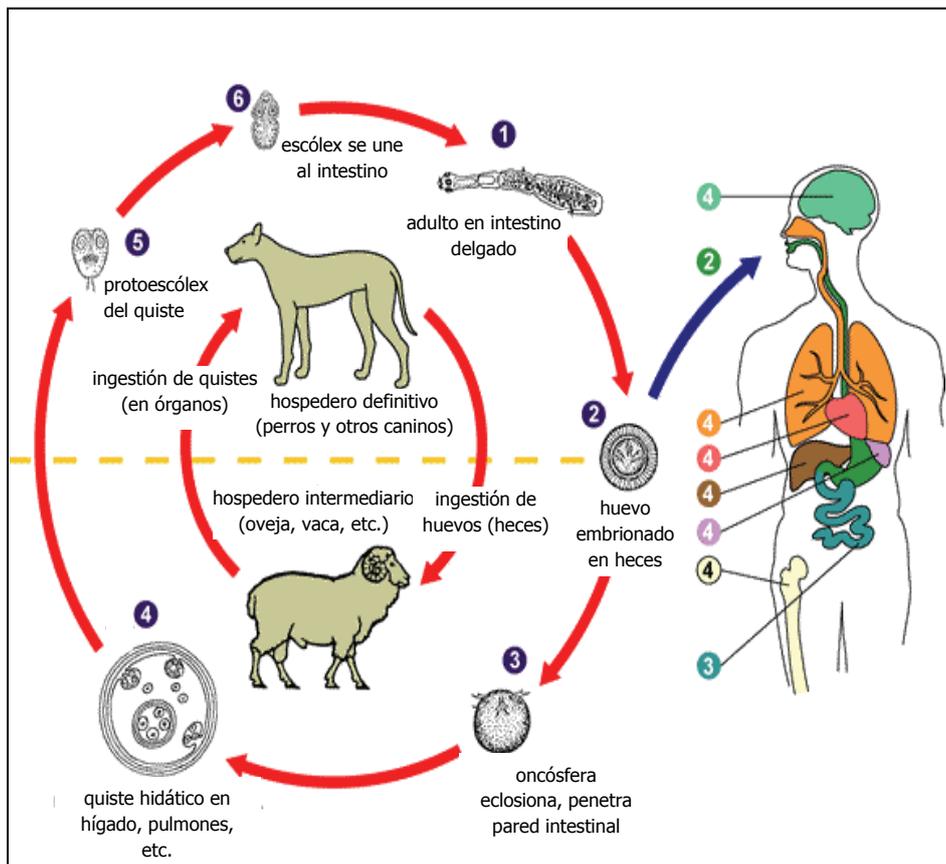


Figura 3. Ciclo de vida de *Echinococcus granulosus*. Figura tomada y adaptada de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>.

A partir de la capa germinativa se desarrollan directa o indirectamente todos los elementos de la hidátide. El desarrollo y crecimiento del quiste es lento, crecen de 1 a 5 cm por año y pueden alcanzar tamaños de hasta 20 cm. En su interior se encuentra

una gran cantidad de líquido, junto con vesículas prolíferas, protoescólicas y quistes hijos. Las vesículas prolíferas son espesamientos de la capa germinativa hacia el interior del quiste que quedan unidos por pedúnculos a la capa germinativa. En su interior se desarrollan los protoescólicas. Por rotura del pedúnculo las vesículas pueden quedar libres en el líquido hidático, y a su vez, si la hidátide se rompe los protoescólicas podrán ser liberados. Las vesículas hijas presentan la misma estructura de la hidátide madre (Thompson, 1995). Existe la posibilidad de ruptura del quiste hidático dentro del hospedero, en cuyo caso puede producirse la resiembra de protoescólicas, generando así nuevos quistes.

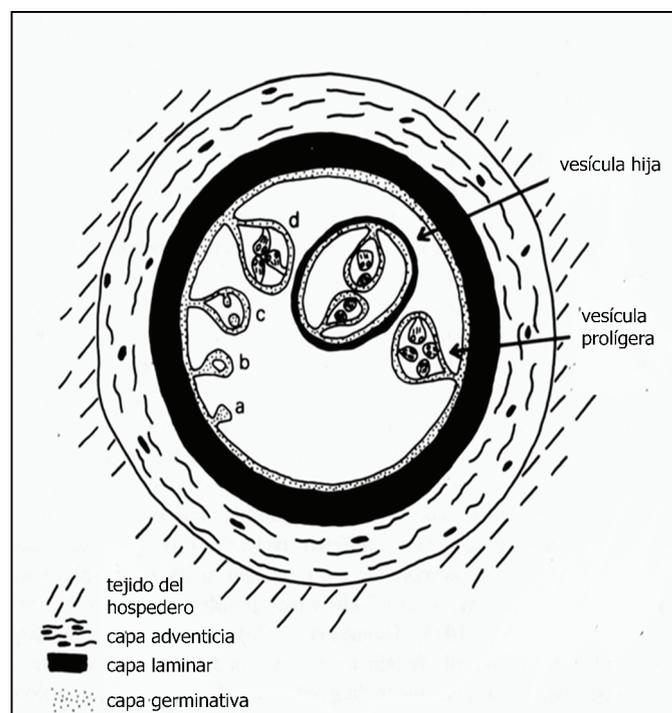


Figura 4. Representación esquemática de la larva metacestode o quiste hidático de *E. granulosus*. a, b, c, y d son etapas en el desarrollo de las vesículas que dan lugar a los PEs (prolígeras). Figura tomada y modificada de Thompson, 1995.

2.2.3. *Echinococcosis quística*

La forma larvaria de *Echinococcus granulosus* (Cestoda) es la causante de la Echinococcosis quística, una zoonosis cosmopolita. Ha sido identificada desde hace siglos como un importante problema de salud humana, con una mortalidad en la actualidad del 2 al 4% (Ammann et Eckert, 1996; Turnes, 2011). Representa, además,

un importante problema económico para aquellas regiones del mundo con una economía básicamente ganadera. La enfermedad es endémica en América del Sur, África, Australia, Europa mediterránea y Asia (Garippa et al., 2004; Torgerson et al., 2006; Ahmadi et Meshkekar, 2011). La infección causada por *E. granulosus* ha re-emergido en ciertas áreas donde se creía controlada, por ejemplo, en Bulgaria y en el país de Gales (Romig et al., 2006).

Cinco países de América del Sur, Argentina, Brasil, Chile, Perú y Uruguay, se encuentran clasificados como países con alta infección (Irabedra et Salvatella 2010; Larrieu et Zanini, 2012). En éstos, la economía pecuaria se basa en gran medida en la cría de bovinos y ovinos, existiendo la costumbre de alimentar a los canes con las vísceras resultado de la faena domiciliaria, las que pueden estar infectadas con la forma larvaria, continuando así el ciclo del parásito hacia la forma adulta (FAO, 2007). Esta zoonosis tiene repercusiones sobre la economía ya que a los gastos en salud pública y campañas de prevención deben sumarse las pérdidas de producción, ya sea por decomisos de aduana, por pérdida de peso de bovinos y ovinos, disminución de litros de leche producidos, de fecundidad y pérdida por kilos de lana. A nivel mundial las pérdidas se calculan en US\$ 763:000.000 por año en pérdidas humanas y US\$ 2.200:000.000 por año en pérdidas para la ganadería (Congreso Mundial de Hidatidosis 2009, Uruguay). Un informe de la FAO muestra que las pérdidas mínimas por producción en el cono sur de América Latina a causa de la Echinococcosis quística oscilan entre 77 y 115 millones de dólares.

Para nuestro país las pérdidas por producción se calculan entre 13 y 19 millones de dólares. Las pérdidas en términos de salud humana asciende a 30 millones de dólares en la región, con un costo de U\$S 4.102 por paciente (Guarnera et al., 2005; FAO, 2007). En nuestro país la población afectada incluye principalmente trabajadores rurales y sus familias, habitantes de centros poblados pequeños o residentes de áreas de contexto socio económico crítico, muchas veces en los cinturones de las ciudades. Relevamientos ecográficos (*screening* de masas) realizados en el año 2006 muestran un porcentaje de infección en áreas rurales del 1 al 3% de la población general, con aparición de quistes hidáticos hialinos de hígado en niños. La aparición de estos casos muestra que no se ha producido el corte de la enfermedad (Comisión Nacional de Zoonosis, 2006, Uruguay; FAO, 2007). En el año 2007 comienza a aplicarse un nuevo Plan Estratégico basado en un enfoque de riesgo, centrado en áreas identificadas como favorables a la introducción y/o mantenimiento de los ciclos endémicos (Irabedra, 2009). Un estudio de situación

realizado en 2008 por la comisión de zoonosis sobre estas poblaciones (13 pueblos seleccionados) encontró 12,4% de muestras positivas, comprobándose además que un 22.2% mantienen la práctica de alimentar a sus perros con víceras (Elola, 2009).

Hace 30 años, la cirugía era la opción para el tratamiento de los quistes hidáticos. Más recientemente se han introducidos tratamientos que han complementado e incluso reemplazado el uso de la cirugía, evitando el riesgo de la ruptura del quiste y la resiembra de protoescolices. Consisten en quimioterapia con compuestos benzimidazólicos y tratamientos con punción del quiste, aspiración, inyección de químicos y re-aspiración (Moro y Schantz, 2009). El 30 al 50% de los pacientes tratados con drogas benzimidazólicas presentan una regresión significativa del tamaño del quiste y alivio de los síntomas, mientras que un tercio aproximadamente se curan. Sin embargo, del 20 al 40% de los casos no responde favorablemente (Davis et al., 1989; Horton, 1989; Todorov et al., 1992; Smego et al., 2005; El-On, 2003). En el tratamiento de la Hidatidosis se ha utilizado exitosamente la combinación de praziquantel y albendazol (Mohamed et al., 1998; Cobo et al., 1998).

En términos de prevención se ha desarrollado una vacuna recombinante Providean Hidatil EG95, actualmente comercializada por Tecnovax en Argentina, que confiere 96-98% de protección. Ensayos en Australia y Argentina han demostrado que después del año de la inmunización, el 86% de las ovejas vacunadas estaban libres de quistes hidáticos viables. La vacunación redujo en un 99.3% el número de quistes viables (Lightowers et al., 1999; Heath et al., 2003). Modelos matemáticos indicarían que la combinación de la vacunación de ovejas y el tratamiento de perros con drogas antihelmínticas sería la estrategia más efectiva contra la echinococcosis (Torgerson, 2006; Moro y Schantz, 2009).

Si bien se han desarrollado estrategias de erradicación, no han sido exitosas, tal vez porque las políticas adoptadas no han sido persistentes y eficaces (Turnes, 2011). De todos modos, se ha avanzado en el desarrollo de ensayos de diagnóstico serológico, que permiten un diagnóstico precoz de la enfermedad, aunque la especificidad y sensibilidad alcanzadas no son aún satisfactorias (Siles-Lucas, 2009).

2.2.4. *Mesocestoides vogae*, syn. (*corti*)

Dentro del género *Mesocestoide*, *Mesocestoides vogae*, a pesar de no ser una amenaza para la salud pública, es un interesante organismo modelo para el estudio de la biología de los cestodos, ya que presenta similitudes con tenias de interés sanitario. Es considerado un modelo para el estudio de inmunología, bioquímica, desarrollo y reproducción de cestodos (Britos, 2000; Koziol et Castillo, 2011).

En la década del 60 se lograron aislar tetratiridios (larvas) de la cavidad peritoneal de lagartijas, demostrándose que estas larvas eran capaces de proliferar asexualmente por fisión longitudinal al ser inyectadas en el peritoneo de ratones (Specht y Vogé, 1965). Los linajes de los organismos utilizados para experimentación en los distintos laboratorios provienen de este aislamiento original. Es posible observar *in vitro* la reproducción asexual y la diferenciación al estado adulto sexuado. Este parásito es de fácil mantenimiento en el laboratorio mediante pasajes intraperitoneales en ratones machos, obteniendo así un alto número de larvas, no siendo así en *E. granulosus*. El material parasitario obtenido de esta manera es más homogéneo, desde un punto de vista genético, que aquel que proviene de infecciones naturales (Smyth, 1990). A pesar de que la prevalencia de la echinococosis quística se mantiene en niveles importantes en nuestro país, la obtención de material parasitario en los frigoríficos es dificultosa y el mismo es escaso, por este motivo adoptamos este cestodo con las ventajas que presenta como organismo modelo.

Mesocestoides tiene un ciclo de vida indirecto, del que no se conocen todos los detalles para cada especie (Figura 5). Los primeros hospederos intermediarios son artrópodos (hormigas, escarabajos coprófagos, ácaros oribátidos) que ingieren los huevos expulsados con las heces de un hospedero principal. En ellos se desarrollan las larvas cisticercoides. Estos artrópodos son ingeridos, a su vez, por los segundos hospederos intermediarios que pueden ser reptiles, anfibios, aves o pequeños mamíferos. En ellos se liberan los cisticercoides que se desarrollan a larvas tetratiridios e invaden su cavidad peritoneal. Cuando un gato o un perro ingieren a su vez a unos de estos segundos hospederos intermediarios, los tetratiridios se liberan en el estómago, alcanzan el intestino, se desarrollan a adultos y comienzan a poner huevos. El periodo de prepatencia dura de 15 a 20 días.

También puede ocurrir que la mascota u otro hospedero definitivo ingieran accidentalmente un artrópodo contaminado. En este caso, los cisticercoides darán

lugar en él a los tetratiridios que, en vez de quedarse dentro del intestino, atravesarán la pared intestinal e invadirán la cavidad peritoneal. En esta última podrán además multiplicarse asexualmente por simple división longitudinal (Witenberg, 1934, citado en Webster, 1949). En este caso se habla de una tetratiridiosis, en vez de la mesocestoidiasis que es la infestación del intestino con formas adultas.

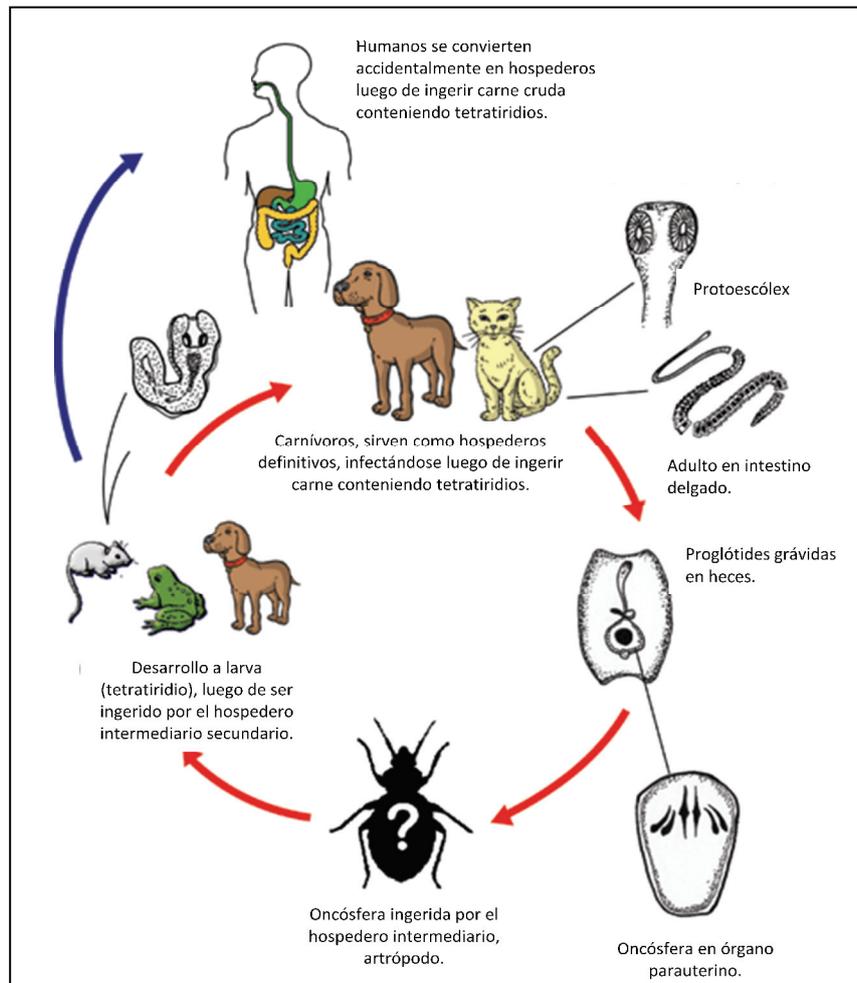


Figura 5. Ciclo de vida de *Mesocestoides vogae*. Figura tomada y adaptada de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>.

Anatómicamente, los tetratiridios consisten en tegumento, parénquima, ventosas, músculos internos, sistema excretorio o osmoregulatorio, sistema nervioso y en el *pool* de células germinativas (Hess, 1980).

2.3. Metabolismo lipídico en platelmintos parásitos

Como se mencionara anteriormente, los lípidos son un grupo heterogéneo de compuestos con roles cruciales en la estructura celular y en el metabolismo energético. Actúan también como moléculas reguladoras y de señalización, facilitando una comunicación dinámica entre el medio extracelular, los depósitos citoplasmáticos, organelos, y el núcleo, para controlar las actividades biológicas múltiples. Debido a las propiedades fisicoquímicas de los lípidos, el transporte hacia los sitios de procesamiento y acción debería estar mediado por proteínas de unión a lípidos (LBP) (Alvite et Esteves, 2011; Alvite et Esteves, 2012).

A pesar que el conocimiento del metabolismo lipídico en los platelmintos parásitos es escaso, se han establecido dos paradigmas que han gobernado los estudios por décadas: la incapacidad de sintetizar *de novo* los ácidos grasos y esteroides (Meyer et al., 1966; Jacobsen et Fairbairn, 1967; Smyth and McManus, 1989) y la ausencia de oxidación de ácidos grasos (Ward et Fairbairn, 1970; Barrett et Körting, 1976).

Si bien el metabolismo lipídico de los platelmintos parásitos es restringido, se ha demostrado que pueden elongar ácidos grasos (Meyer et al., 1970) y sintetizar lípidos complejos con preferencia de fosfolípidos (Young et Podesta, 1982), sugiriendo un rol en la síntesis de membranas. Por otro lado, a pesar de que los platelmintos parásitos contienen gran cantidad de triacilglicéridos (TAG), éstos no parecen ser fuente de energía (Ward et Fairbairn, 1970; Barrett et Körting, 1976). Sin embargo, las enzimas de la beta oxidación están presentes en los platelmintos *Fasciola hepatica* y *Himenolepis diminuta* y presentan actividad variable (Ward et Fairbairn, 1970; Barrett et Körting, 1976; Seubert et al., 1968; Vinaud et al., 2007; Vinaud et al., 2009). La ausencia de la vía oxidativa fue explicada por la ausencia de enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos, ciclo enlazado con la oxidación de ácidos grasos (Barrett et Körting, 1976).

Vinaud y colaboradores han demostrado la habilidad de *Taenia crassiceps* de producir energía a partir de lípidos, como fuente de energía alternativa, cuando la concentración de glucosa es baja o en presencia de antihelmínticos (Vinaud et al., 2007; Vinaud et al., 2009). Probablemente, las drogas impiden la captura de glucosa del ambiente, favoreciendo el uso de ácidos grasos como fuente alternativa de energía (Vinaud et al., 2009).

Los lípidos son necesarios para la biosíntesis de membranas y renovación debido al crecimiento continuo y reproducción asexual. Los platelmintos pueden absorber precursores (ácidos grasos, glicerol, colina, fosfocolina, etanolamina, fosfoetanolamina, inositol, y fosfoinositol) e incorporarlos en fosfolípidos, triacilglicéridos y esteroides (Young et Podesta, 1982). Estudios en *Schistosoma mansoni* demostraron que estos parásitos capturan ácidos grasos y los metabolizan e incorporan rápidamente en fosfolípidos, en particular fosfatidilcolina (Brouwers et al., 1997). Una vez incorporados, los ácidos grasos acilados pueden estar sujetos a dación/reacilación permitiendo la transferencia a otra clase de lípidos. Pequeñas cantidades de ácidos grasos son luego utilizadas en la síntesis de TAGs, probablemente como depósito, evitando concentraciones altas intracelulares de ácidos grasos libres (Barrett, 1981).

Los platelmintos serían también incapaces de sintetizar esteroides *de novo*, sin embargo, pueden incorporar rápidamente esteroides exógenos y ácidos grasos en ésteres de esteroides (Barrett, 1983). En *S. mansoni* se ha demostrado la adquisición de colesterol de las lipoproteínas del hospedero (Rumjanek et al., 1983, Rumjanek et al., 1988). Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) se unen a la superficie de las larvas y los adultos (Bennett et Caulfield, 1991). Las LDL unidas podrían proveer fosfolípidos y esteroides al parásito. Varios receptores o proteínas de unión, involucradas en la interacción con las LDL o con las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), han sido descritas en *S. mansoni* (Rumjanek et al., 1988; Tempone et al., 1997). En *S. japonicum* se ha encontrado una proteína de unión a lipoproteínas de muy baja densidad (SVLBP) en el tegumento y en el revestimiento intestinal (Rogers et al., 1989). Las lipoproteínas LDL o VLDL unidas a la superficie del parásito pueden inhibir la unión de anticuerpos humanos anti-schistosoma, y así ayudarlo a la evasión de las reacciones citotóxicas dependientes de anticuerpos a través del enmascaramiento de los antígenos del parásito (Chiang et Caulfield, 1989).

Existe evidencia que indica que la síntesis de prostaglandinas, tromboxanos y eicosanoides a partir de ácido araquidónico (20:4) o ácido linoleico (18:2) exógeno, es posible en *Taenia taeniformis*, *Spirometra erinacei*, *S. mansoni*, y *Trichobilharzia ocellata* (Rumjanek et Simpson, 1980; Leid et McConnell, 1983a; Leid et McConnell, 1983b; Fukushima et al., 1993; Nevhutalu et al., 1993; Gao et al., 1993; Belley et Chadee, 1995). En vertebrados, el ácido araquidónico deriva de la desaturación del ácido linoleico y es el precursor de los eicosanoides. Debido a que los platelmintos

parásitos no pueden realizar síntesis *de novo* de ácidos grasos ni poseen mecanismos de desaturación (Meyer et al., 1970), el ácido araquidónico tiene que ser adquirido de sus hospederos. La producción de prostaglandinas de los helmintos podría modular el sistema inmune del hospedero y el establecimiento de la infección (Kubata et al., 2007).

2.4. FABPs en platelmintos parásitos

Los platelmintos parásitos dependen del secuestro y utilización de los lípidos del hospedero durante la infección. Por lo tanto, es esencial que tengan un sistema de unión de lípidos eficiente para capturar y transportar moléculas hidrofóbicas claves. En este sentido, no llama la atención que las proteínas de unión a lípidos hayan sido extensamente estudiadas en estos organismos, entre ellas se encuentran las proteínas de unión de ligandos hidrofóbicos (HLBPs) y las proteínas de unión de ácidos grasos. Las HLBPs y las FABPs comparten la habilidad de unir lípidos, pero difieren en la especificidad de unión de ligandos, en la estructura y organización molecular, en la localización intra/extracelular, en la distribución filogenética, en la evolución y en sus posibles funciones. Los miembros de los dos grupos son blancos en estudio para quimioterapia, desarrollo de vacunas e inmunodiagnóstico (Alvite et Esteves, 2012).

Durante mucho tiempo, el trabajo con platelmintos parásitos en el área molecular, se ha centrado en la búsqueda e identificación de especies, cepas, así como antígenos para diagnóstico e inmunoprotección y los genes responsables de su síntesis. En esta dirección, varias FABPs han sido aisladas por sus propiedades inmunogénicas, demostrando una actividad protectora significativa frente a la infección experimental en modelos animales. La primera FABP de platelmintos descrita fue la aislada del parásito *Schistosoma mansoni* (Trematodo), fue nombrada Sm14, indicando su masa molecular aparente (Moser et al., 1991). Sm14 fue identificada a partir de una librería de expresión usando un antisuero generado contra un extracto de organismos adultos que generó inmunidad protectora en ratones luego del desafío con larvas (cercaria). La proteína recombinante fue rápidamente desarrollada y ensayada como antígeno protectoro contra *S. mansoni* y también contra infecciones de *Fasciola hepatica* (Tendler et al., 1996). Se han realizados varios intentos por optimizar el nivel de protección frente a infecciones desafío pero en todos los casos la protección

oscilaba alrededor de 50-60%, valor similar al obtenido con la proteína Sm14 nativa o recombinante (Vilar et al., 2003; Varaldo et al., 2004; Abreu et al., 2004; Garcia et al., 2008; Esteves, 2009; Mendes et al., 2010). La proteína Sm14 es uno de los seis candidatos vacunales seleccionados por la Organización Mundial de la Salud para ser sometida a ensayos clínicos. Actualmente, la vacuna Sm14 se encuentra en el estudio de fase I para evaluar su seguridad en la prevención de la Schistosomiasis (<http://clinicaltrials.gov/show/NCT01154049>).

Posteriormente, proteínas homólogas a Sm14 de *S. mansoni*, como Sj-FABPc de *Schistosoma japonicum* (Becker et al., 1994; Yuan et al., 2007), SbFABP de *Schistosoma bovis* (número de acceso del GenBank: AY615730), Fh15 de *Fasciola hepatica* (Rodríguez-Pérez et al., 1992; López-Abán et al., 2007), FgFABP de *Fasciola gigantica* (Estuningish et al., 1997), EgFABP1 y EgFABP2 de *Echinococcus granulosus* (Esteves et al., 1993; Esteves et al., 2003a), MvFABPa y MvFABPb de *Mesocestoides vogae* (Alvite et al., 2008), y TsFABP de *Tenia solium* (número de acceso del GenBank: AN ABB76135), fueron aisladas y caracterizadas (ver Figura 6).

A nivel proteico, las FABPs de cestodos y trematodos presentan baja identidad y similitud entre ellas (Figura 6, Esteves et al., 1997). Sin embargo, sus estructuras tridimensionales son similares a la estructura de barril beta descrita para las FABPs de vertebrados (Jakobsson et al., 2003; Angelucci et al., 2004). Respecto a la estructura génica, los genes de vertebrados están organizados en cuatro exones y tres intrones que, aunque varían en tamaño, se localizan en posiciones conservadas. Los intrones de las FABPs de invertebrados están localizados en la misma posición que en los genes de vertebrados, pero difieren en su número y tamaño (Esteves et Ehrlich, 2006).

Las reconstrucciones filogenéticas agrupan a las FABPs de platelmintos en el mismo *cluster* que las FABPs de vertebrados de tipo cardíacas (Esteves et al., 1997; Angelucci et al., 2004; Esteves et Ehrlich, 2006) (ver Figura 6). Como se menciona previamente, se ha planteado la hipótesis de que la FABP de tipo cardíaco, muy frecuente en invertebrados, podría ser considerada cercana a la FABP ancestral (Esteves et Ehrlich, 2006). Además, las FABPs de platelmintos son las más antiguas conocidas hasta el momento. En este sentido, es probable que la FABP ancestral pudiera satisfacer todas las funciones de las FABPs de vertebrados actuales y la especialización funcional habría sido el resultado de pequeños cambios producidos en la cavidad interior o en la superficie de la proteína favoreciendo la interacción con blancos específicos, dando lugar así a los doce tipos de FABPs identificados en los

vertebrados. Se propone un rol general y fundamental para las H-FABPs mediante el transporte de ácidos grasos en los tejidos que presentan metabolismo lipídico anabólico y catabólico (Liu et al., 2003).

	$\alpha_{3,10}$	$\beta 1$	αI	αII	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 4$	$\beta 5$	$\beta 6$	$\beta 7$												
H-FABP (Hs)	MVDAFLGTWKLVDSKNPDYMKSLGVGFATRQVASMTKPTTII	IEKNGD-	ILTLKTHSTFKNTEISFKLGVFDETTADDRKVKSI	VTLDG-	GKLVHLQKW	98																
Sm14 (Sm)	-MSSFLGKWKLSSEHNFDVMSKLGVS	SWATRQIGNTVTPVTFTMDGD-	KMTMLTESTFKNLSCTFKFGEEFDEKTS	DGRNVKSVVEKNSES	SKLTQTQVD	98																
SjFABPc (Sj)	-MSSFLGKWKLSSEHNFDVMSKLGVS	SWATRQIGNTVTPVTFTMDGD-	TMTMLTESTFKNLSVTFKFGEEFDEKTS	DGRSVKSVVTKDSES	KITHTQKD	98																
SbFABP (Sb)	-MSTFLGKWKLSSEHNFDVMSKLGVS	SWATRQIGNTVTPVTFTMDGD-	KMTMLTESTFKNLSCTFKFGEEFDEKTS	DGRNVKSVVEKNSES	SKLTQTQVD	98																
ShFABP (Sh)	-MSSFLGKWKLSSEHNFDVMSKLGVS	SWATRQIGNTVTPVTFTMDGD-	KMTMLTESTFKNLSCTFKFGEEFDEKTS	DGRNVKSVVEKNSES	SKLTQTQVD	98																
Fh15 (Fh)	-MANFVGSWKLQSENMDAVLQKLG	INVIKRKLITSSKPEITFTLEGN-	KMTMKTVSALKTTV	ISFTFGEEFKEETADGR	VTMTFTTKDSDSKI	SQVQKC	98															
FgFABP (Fg)	-----	SWKYGDSENMEAYLKKLGISSDMV	DKILNAKPEFTFTLEGN-	QMTIKMVSSLTKITFTFTFGEEFKEETADG	KTAMTTVT	KDSESKMTQVTTG	92															
EgFABP1 (Eg)	-MEAF	LVTWKMEKSEGF	DKIMERLGVDFVTRKMG	NLVKPNLIIVTDLGGG	KYMRSESTFKTTECS	FKLGEKFKVTRFTRGHFFMITVEN-	GVMKHEQDD	98														
EgFABP2 (Eg)	-MEPF	IGTWKMEKSEGF	DKIMERLGVDFVTRKMG	NMMKPNLIISDLGD	GRYMRSESKFKTSEFS	FKLGEQFKEVTPDSREVM	SMLTVED-	GVLKQE	QVG	98												
TsFABP (Ts)	-MEPF	IGTWKMEKSEGF	DKIMERLGVDFVTRKMG	NLMKPSLIVS	DLGDGKYSRSESKFKTTEFTFKLGEKFKETTP	DSREVTSLITVEN-	GVMKQE	QVG	98													
MvFABPa (Mv)	-----	EKSEHPDEV	MQLKGVGFLTRQAG	LKAPTLIVSCLGDG	KYMRSESTFKNTEF	EFKLGEKFKETTPDGR	VTQSTITLDG-	DTLKQ	VQVG	88												
MvFABPb (Mv)	-----	SKSEGFDEV	MRHLGVNFIARKAG	NLTKPTVTIT	TSVGDGRYHMKLESTFKNTEFTFKLGE	ECEVTDADGR	KVKSTITMDG-	STMKH	VQVG	88												
Consenso	.	*. : :	:	** : .	.	.	*	.	*	:	* : *	.	* : *	.	*	:	.	:	.	:	:	:

	$\beta 8$	$\beta 9$	$\beta 10$																		
H-FABP (Hs)	DGQETTLVRE	LIDGKLILTL	HGTAVCTR	TYEKEA- 133																	
Sm14 (Sm)	PKNTTVIVRE	VDGDTMKT	TVTVDVTA	IRNYKRLS- 133																	
SjFABPc (Sj)	SKNTTVIVRE	IVGDTMKT	TVTVDVTA	IRNYKR-- 132																	
SbFABP (Sb)	PKNTTVIVRE	VDGDTMKT	TVTVDVTA	IRNYKRLS- 133																	
ShFABP (Sh)	PKNTTVIVRE	VDGDTMKT	TVTVDVTA	IRNYKRLP- 133																	
Fh15 (Fh)	PENTTHVVRE	VTGGKMIAT	VTVDVKAV	NNYHKV-- 132																	
FgFABP (Fg)	PEYTHVVRE	VVDGDKMIAT	WTVDVKAV	TLLKA-- 126																	
EgFABP1 (Eg)	KTKVTYIER	VVEGNE	LKATVKVDEV	VCVRTYYSKVA 134																	
EgFABP2 (Eg)	KDKTTYIDR	VVDGNE	LRATVKADEL	VLCVRTYSRGM- 133																	
TsFABP (Ts)	KGKTTYIDR	VIEGNE	LKTTVKVDEL	VLCVRTYVKAA- 133																	
MvFABPa (Mv)	-EKT	TYIDRVIEG	NELKTI	VKVDDV	VSTRIYVKI-- 121																
MvFABPb (Mv)	-EKT	THIERVIEG	DKMLTT	VTVDL	VSKREYTRC-- 121																
Consenso	*	:	*	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:

Figura 6. Alineamiento de secuencias de FABPs de platelmintos y comparación con la H-FABP humana. Secuencias alineadas: H-FABP, FABP cardíaca de *Homo sapiens* (Hs); Sm14 de *S. mansoni* (Sm); SjFABPc de *S. japonicum* (Sj); SbFABP de *S. bovis* (Sb); ShFABP de *S. hematobium*; Fh15 de *F. hepatica* (Fh); FgFABP de *F. gigantica* (Fg); EgFABP1 y EgFABP2 de *E. granulosus* (Eg); TsFABP de *T. solium* (Ts) y MvFABPa y MvFABPb de *M. vogae* (Mv). Se indica la estructura secundaria referida a H-FABP (Hs) (1G5W.pdb): α , hélice α ; β , cadena β ; los números indican el largo de cada secuencia. Debajo de cada bloque se muestra la secuencia consenso de acuerdo al algoritmo Clustal X usando la matriz Gonnet Pam 250: (*) identidad; (:) alta similitud, (.) baja similitud. Figura tomada y modificada de Esteves, 2009.

En un intento de elucidar cómo las FABPs de platelmintos están involucradas en la captura de lípidos del hospedero y en su transporte a los organelos, se investigó el mecanismo mediante el cual rSj-FABPc, de *S. japonicum*, transfiere los ligandos hacia membranas aceptoras artificiales (McDermott et al., 2002). El mecanismo sería colisional (mencionado anteriormente), similar al de las H-FABPs.

Además de la captura y transporte de AG, no podemos descartar la existencia de funciones específicas de estas proteínas dependiendo de las necesidades particulares de cada organismo. En este sentido, existen reportes que podrían involucrar a SjFABPc en el secuestro de drogas. La proteína fue detectada en las glándulas vitelinas femeninas, estructuras relacionadas con el proceso mencionado (Erasmus, 1975; Gobert, 1998). La FABP de adultos de *F. hepatica* se encontró en un complejo nativo multimérico y altamente inmunogénico que consiste de por lo menos ocho moléculas. El rol de este complejo todavía no es claro (Espino et Hillyer., 2001).

2.4.1. FABPs en los organismos de estudio

En *E. granulosus* se han identificado dos proteínas de unión a ácidos grasos, EgFABP1 y EgFABP2, que comparten 76% de residuos idénticos y presentan 96% de similitud. Asimismo, ambas presentan una importante similitud de secuencia con la FABP cardíaca de mamíferos (Esteves et al., 1997; Esteves et Ehrlich, 2006). La estructura cristalográfica de la proteína recombinante EgFABP1 reveló la estructura característica de la familia consistente en un barril beta, indicando como posible ligando un ácido graso saturado de 16C y espacio suficiente para ligandos mayores (Jakobsson et al., 2003) (ver Figura 1). Es interesante que tanto rEgFABP1 como rSm14 acomodan el ácido graso en una conformación similar en forma de U, parecida a la observada para las H-FABPs (Jakobsson et al., 2003; Angelucci et al., 2004). Mediante comparación con las estructuras de las FABPs caracterizadas se determina que los aminoácidos conservados total o parcialmente se localizan en los giros del barril beta, en la hélice alfa I y en el final de la hélice II (Esteves, 2009). Los residuos implicados en la unión del grupo carboxilato del ligando, descritos para las H-FABPs de vertebrados, también están conservados en estas dos proteínas (Arg107, Arg127, Tyr129).

Estudios de expresión indican la presencia de la proteína EgFABP1 en el tegumento de los protoescoléces, siendo indetectable en la capa germinativa de la larva metacestode (Esteves et al., 1993). Se han estudiado las propiedades de unión de rEgFABP1, detectándose alta afinidad por ácidos grasos de cadena larga insaturados como son el ácido araquidónico y ácido oleico (Alvite et al., 2001). Esta proteína ha sido también analizada en su capacidad inmunogénica (Chabalgoity et al., 1997; 2000; Alvite, 2006). Se realizaron ensayos donde se inmunizaron perros con una construcción de *Salmonella* recombinante que expresa a EgFABP1; los perros generaron una buena respuesta humoral contra el antígeno pero una respuesta

inmune celular pobre (Chabalgoity et al., 2000). Resultados *in vitro* muy alentadores se han obtenido usando la proteína recombinante EgFABP1 combinada con los antígenos de *E. granulosus* rEgTrp (Esteves et al., 2003b) y rEgA31 (Fu et al., 1999). Esta combinación genera una respuesta celular del tipo citoquinas Th1/Th2 (Fraize et al., 2004). EgFABP1 ha sido recientemente identificada en el líquido hidático y como proteína de excreción-secreción, mediante estudios *in vivo* e *in vitro* (Aziz et al., 2011; Virginio et al., 2012). A partir de estos experimentos consideramos la posibilidad de que esta proteína interaccione con las células del hospedero cercanas a la pared del quiste, ya sea para adquirir lípidos necesarios para el parásito o incluso, para entregar sus ligandos a los tejidos del hospedero para modular la respuesta inmune del mismo.

Por otro lado, se determinó que la región promotora de EgFABP2 presenta varias regiones consenso encontradas en promotores eucarióticos (caja TATA, sitio de unión Sp1, caja CAAT), así como elementos respuesta específicos en posiciones proximales (PPRE, medio sitio GRE) y remotas (GATA, AP2, medios sitio GRE). Vale la pena mencionar que en base a análisis computacionales, la presencia de los sitios probables de elementos respuesta a glucocorticoides y a proliferadores de peroxisomas (GRE y PPRE) se correlaciona con la presencia de elementos funcionales similares en promotores de FABPs previamente reportados (Esteves et cols., 2003, y referencias incluidas). La presencia de elementos putativos de respuesta a hormonas en el gen de EgFABP2 sugiere un mecanismo interesante de adaptación hospedero-parásito involucrando la regulación de la expresión de este gen de *E. granulosus*.

Al adoptar a *Mesocestoides vogae* como modelo alternativo de estudio de cestodos debido a las ventajas que presenta, nuestro grupo de investigación ha aislado a MvFABPa y MvFABPb determinando que las proteínas correspondientes comparten 62% de identidad y 91% de similitud entre ellas y alta similitud con FABPs de cestodos. Estas proteínas están relacionadas filogenéticamente con las subfamilias H-FABP y A-FABP de vertebrados. La expresión de dichas proteínas, al igual que las FABPs de *E. granulosus*, fue observada mayormente a nivel del tegumento de los tetratiridios (Alvite et al., 2008). Esta localización sugiere que las FABPs podrían estar involucradas en la captura de ácidos grasos del hospedero a través del tegumento. En esta primera instancia se clonaron los ADNc de MvFABPa y b truncos, faltando la región 5' que codifica para los primeros 10 aminoácidos. A posteriori nuestro grupo de investigación logró clonar los extremos faltantes de ambas proteínas mediante PCR inversa (manuscrito en preparación).

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis de Trabajo

En base a la información disponible, parece factible plantear como hipótesis de trabajo que las proteínas de unión de ácidos grasos de *Echinococcus granulosus* y *Mesocestoides vogae* participan en la incorporación desde el hospedero de moléculas indispensables en la supervivencia de estos parásitos, y en el transporte intracelular hacia y desde distintos destinos intracelulares. En este recorrido interactúan con la membrana plasmática y/o con las subcelulares transfiriendo el ligando hacia y desde los compartimentos intracelulares. Asimismo, estas FABPs interactúan con proteínas involucradas en el metabolismo lipídico y/o en la regulación de la expresión génica cediéndoles su ligando y regulando así la actividad de enzimas y/o de receptores nucleares. Por estos motivos cumplen roles fundamentales en la biología del parásito.

3.2. Objetivo general

Este trabajo se enmarca en una línea general seguida por nuestro laboratorio desde tiempo atrás, basada en el estudio, a nivel molecular, de la biología de los parásitos *Echinococcus granulosus* y *Mesocestoides vogae*.

En estos estudios han surgido varias moléculas que podrían ser claves en la supervivencia de *E. granulosus* y *M. vogae*, que son en sí mismas todo un desafío. Las FABPs son un grupo de ellas ya que estos organismos son incapaces de sintetizar *de novo* ácidos grasos. Las mismas son proteínas muy conservadas a lo largo de la escala zoológica para las cuales la elucidación de su función es uno de los temas aún no resuelto por la comunidad científica internacional. En este contexto, nuestro objetivo general es profundizar en el conocimiento de la biología molecular de los cestodos a través de la comprensión de los mecanismos moleculares de acción de las FABPs de *E. granulosus* y *M. vogae*.

De esta manera, no sólo se aportarán elementos para la comprensión de un tema no resuelto como lo es la función de las FABPs, sino que también permitirá conocer su rol fisiológico en los parásitos en estudio, aportando, además, nuevos blancos potenciales para diagnóstico, drogas anti-parasitarias y vacunas.

3.3. *Objetivos específicos*

A través del presente trabajo, buscamos estudiar los destinos subcelulares de las EgFABPs y las MvFABPs utilizando dos estrategias experimentales distintas. Por un lado, aplicaremos electroforesis uni y bidimensionales a fracciones subcelulares e identificaremos estas proteínas mediante *Western Blot* y espectrometría de masa, y por otro lado, realizaremos inmunolocalizaciones *in toto* y sobre criosecciones, buscando colocalización con marcadores subcelulares fluorescentes. Asimismo, nos proponemos determinar si estos organismos son capaces de capturar un análogo de ácido graso fluorescente *in vivo*.

Además, planeamos abordar el estudio de las interacciones FABP-membrana y FABP-proteínas. Primero, nos planteamos analizar el mecanismo de transferencia de ligandos desde las EgFABPs y las MvFABPs hacia membranas modelo utilizando ensayos de Transferencia de Energía de Resonancia de Förster (FRET). Finalmente, nos proponemos identificar las proteínas del parásito capaces de interactuar con las FABPs, utilizando dos métodos complementarios, captura de ligando (“pull down”) e inmunoprecipitación, y posterior identificación mediante espectrometría de masa.

4. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE EgFABPs Y MvFABPs

4.1. Materiales y métodos

Para explorar el destino de los ácidos grasos transportados por las EgFABPs y las MvFABPs nos propusimos determinar la localización subcelular de éstas proteínas a través de dos estrategias diferentes. La primera consiste en fraccionamiento subcelular asociado a separación mediante electroforesis bidimensionales e identificación usando *Western Blot* y espectrometría de masa, y la segunda en estudios de inmunomicroscopía de fluorescencia confocal utilizando marcadores fluorescentes específicos de organelos y un análogo de ácido graso fluorescente BODIPY FL C₁₆.

4.1.1. Fraccionamiento subcelular, electroforesis uni y bidimensional, Western Blot y espectrometría de masa.

4.1.1.1. Colecta de material parasitario

Se emplean protoescólices (PE) de *E. granulosus* extraídos de quistes hidáticos fértiles de hígados y pulmones de ovejas o vacas infectadas, colectados en frigoríficos locales. Las vesículas hijas que se encuentran son mecánicamente rotas y los PE se recuperan y juntan con aquellos que se encuentran libres en el líquido hidático. Los PE son lavados en PBS e inmediatamente homogeneizados para el fraccionamiento subcelular.

En todos los casos, los tetratiridios de *M. vogae* se extraen de la cavidad intraperitoneal de ratones CD1 de 6 meses de edad, por aspiración y son lavados exhaustivamente en solución de Hank's (SIGMA, USA). Los ratones son criados, infectados y amablemente cedidos por la Dra. Jenny Saldaña del laboratorio de experimentación animal (LEA) de Facultad de Química. Los mismos son sacrificados mediante dislocación cervical a cargo de la Dra. Verónica Fernández (categoría C2 CHEA), utilizando protocolo autorizado por la CHEA (N° 16-02-08).

Luego de los lavados, los tetratiridios son cultivados durante dos a cinco días en medio RPMI-1640 con suero fetal bovino (SIGMA, USA) como se describe previamente (Britos y cols., 2000) y son utilizados para fraccionamiento subcelular o microscopía.

4.1.1.2. Fraccionamiento subcelular

Dado que las FABPs transportan ácidos grasos, las mismas podrían estar asociadas a las mitocondrias, a la fracción microsomal o al núcleo. En este sentido, llevamos a cabo la separación de dichas fracciones mediante centrifugación secuencial de acuerdo al protocolo desarrollado por Agorio y colaboradores (Agorio et al., 2003) con algunas modificaciones. Brevemente, 0.5 ml de larvas de *E. granulosus* o *M. vogae* se homogenizan en 2.5 ml de amortiguador de homogeneización (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM EDTA, 250 mM sacarosa, 5 µg/ml benzamidina, 5 µg/ml iodoacetamida, 1 mM PMSF) en frío. Luego se centrifuga a 300 x g durante 15 min. para separar restos celulares y células enteras. El sobrenadante se somete a centrifugación secuencial: a) centrifugación del extracto a 900 x g por 30 min.; b) centrifugación del sobrenadante a 10000 x g durante 30 min; c) ultracentrifugación del sobrenadante a 105000 x g por 2 hs. El segundo, tercer y cuarto residuo se consideran como la fracción nuclear, mitocondrial y microsomal, respectivamente, mientras que la solución remanente es la fracción citosólica (ver figura 7). Las fracciones nuclear, mitocondrial, microsomal son lavadas con amortiguador de homogeneización.

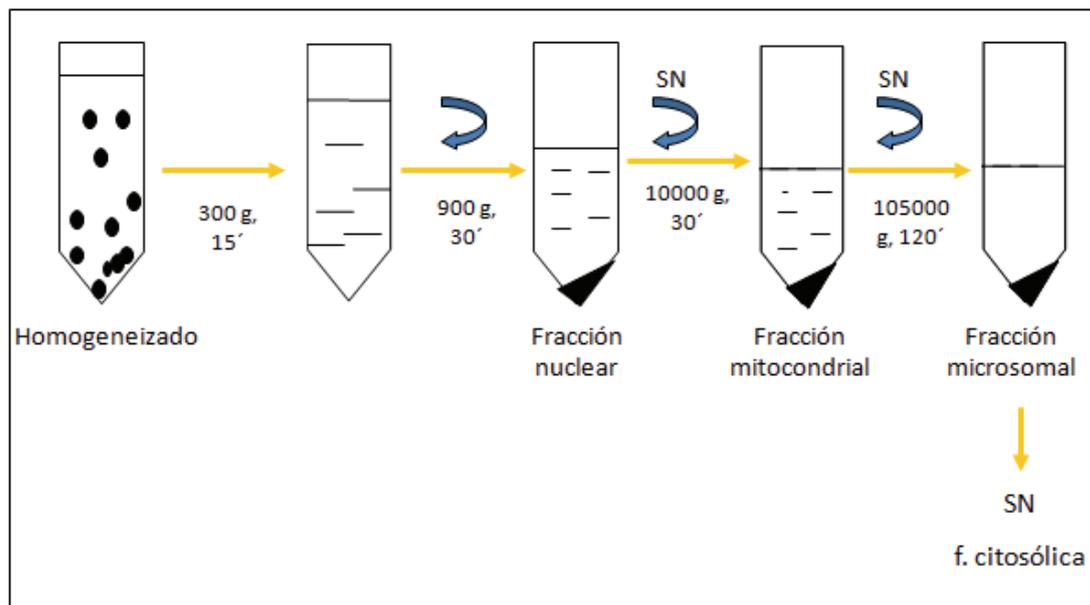


Figura 7. Esquema del proceso de fraccionamiento subcelular de larvas de *E. granulosus* y *M. vogae*.

4.1.1.3. Verificación del enriquecimiento de las fracciones

El enriquecimiento de las fracciones subcelulares se verifica midiendo actividades enzimáticas marcadoras de cada fracción. Se determina la actividad de la Lactato deshidrogenasa (enzima citosólica) (Lowry, 1957), la Succinato deshidrogenasa

(enzima mitocondrial) (Cooper et Beevers, 1969) y la peroxidasa (enzima del peroxisoma) (Aebi, 1984). Brevemente, la actividad lactato deshidrogenasa es determinada a través de la medida del aumento de la absorbancia a 340 nm debida a la transformación de Lactato y NAD^+ en piruvato y NADH, catalizada por esta enzima ($\epsilon_{340\text{nm}} = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La actividad succinato deshidrogenasa se monitorea mediante la disminución de la absorbancia a 600 nm debida a la reducción del diclorofenolindofenol (cambia de azul a incoloro, $\epsilon_{600\text{nm}} = 20.5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) consecuencia de la oxidación del succinato. Para medir actividad peroxidasa se utiliza 10 mM de peróxido de hidrógeno como sustrato ($\epsilon_{240\text{nm}} = 43.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), determinándose la disminución de la absorbancia del mismo a 240 nm. En todos los casos se realizan controles sin sustrato. Las actividades enzimáticas reportadas son el promedio de 3 a 5 repeticiones. La concentración proteica de cada fracción y del homogeneizado se determina utilizando el método del BCA (QuantiPro BCA Assay Kit, SIGMA) y se calcula las actividades específicas y el factor de purificación de las mismas para cada actividad enzimática medida. El enriquecimiento en núcleos de la fracción nuclear es observado directamente por microscopía de fluorescencia (Microscopio de fluorescencia Nikon, Microphot-FX) utilizando tinción con DAPI (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, USA).

4.1.1.4. Electroforesis 1D y 2D

Pevio a las electroforesis, las fracciones subcelulares obtenidas son purificadas con PlusOne 2-D Clean-Up Kit (Amersham Biosciences, USA). Las mismas son luego, concentradas con dispositivos de Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices (Millipore, corte 10 kDa) o Vivaspin 500 (SartoriusStedim, Alemania, corte 10 kDa), siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

Se analizan los extractos proteicos de cada fracción mediante electroforesis unidimensional (1D) en geles de poliacrilamida discontinuos desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) al 15%. Los mismos son teñidos con *Coomassie brilliant blue R* (Sigma) o transferidos para *Western Blot*. En cada caso se indica la concentración de poliacrilamida y los marcadores de masa molecular utilizados.

Las electroforesis bidimensionales (2D) se realizan en el servicio UByPA del Instituto Pasteur de Montevideo. El isoelectroenfoque se realiza usando el sistema IPGphor (Amersham Biosciences) en tiras IPG strip de 7 cm, con un rango de pH de 3-10. Se utiliza 20 μg o 100 μg de proteínas totales de cada fracción o del homogeneizado, en 125 μl de amortiguador de rehidratación (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 2%, 0.5% IPG Buffer 3-10, azul de bromofenol 0.002%, DTT 17 mM), por cada tira de

isoelectroenfoco. Se carga la muestra por rehidratación pasiva, durante toda la noche a temperatura ambiente. Se utiliza el siguiente programa: a) 300 V, 30 min; b) 1000 V, 30 min (gradiente); c) 5000 V, 1 h 20 min (gradiente); d) 8000 V, hasta 2000 V. Las tiras se equilibran en amortiguador de equilibración (urea 6 M, Tris 75 mM pH 8.8, glicerol 29.3 %, SDS 2 %, azul de bromofenol 0.002%) con DTT 10 mg/ml, 15 min. a temperatura ambiente con agitación. Por último se incuban con el mismo amortiguador con iodoacetamida 25 mg/ml, en las mismas condiciones.

La segunda dimensión consiste en electroforesis SDS-PAGE con poliacrilamida al 15 % (gel 10 x 10 x 0.1 cm). Se realizan dos electroforesis bidimensionales en paralelo, un gel es teñido con nitrato de plata para identificar *spots* por espectrometría de masa y el otro es transferido para *Western Blot*. La tinción con nitrato de plata consiste en fijación por 1 h en 45 % etanol/10% ácido acético, incubación durante 1 min. en tiosulfato de sodio 0.02%, tres lavados con agua desionizada, tinción por 30 min. en nitrato de plata 0.15%, tres lavados con agua y visualización con carbonato de sodio 2% y formaldehido 0.04%. En los geles 2D a ser transferidos se utiliza el marcador de masa molecular *Full Range Rainbow Molecular Weight Markers* (Amersham).

4.1.1.5. *Western Blot*

Para llevar a cabo los ensayos de *Western Blot*, los geles productos de SDS-PAGE son electrotransferidos a membranas de PVDF Hybond-P (Amersham Biosciences), utilizando el dispositivo de transferencia húmeda miniVE (Amersham Biosciences) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las membranas son bloqueadas con TBST (25 mM Tris, 8 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 0.05% Tween20) con 3% de seroalbúmina bovina (SIGMA) y 2% de glicina (SIGMA), durante toda la noche a 4° C, con agitación. Posteriormente, las mismas se incuban dos horas a temperatura ambiente con un suero policlonal de conejo anti-rEgFABP1 purificado diluído 1/1000 en solución de bloqueo. Luego de tres lavados de 15 min con TBST las membranas se incuban con un anticuerpo de cabra contra IgGs de conejo conjugado a fosfatasa alcalina (SIGMA) diluido 1/30000, durante una hora. Luego de tres lavados en las mismas condiciones, las *spots* o bandas son reveladas utilizando los reactivos NBT y BCIP (SIGMA).

4.1.1.6. Espectrometría de masa

A partir de los geles 2D teñidos con nitrato de plata se seleccionan *spots*, que coinciden (masa molecular y punto isoeléctrico) con las *spots* marcadas en los *Western blots*, para ser escindidas y enviadas al servicio UByPA del Instituto Pasteur

de Montevideo. En el servicio las muestras son desteñidas y son digeridas con tripsina en el amortiguador apropiado. Los péptidos resultantes de la digestión proteolítica son extraídos y analizados por espectrometría de masa MALDI TOF-TOF (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight) (MS) en el equipo 4800 MALDI TOF-TOF Analyzer (Applied Biosystem) provisto de una fuente láser de 337 nm. De los espectros de masa que presentan buena resolución y buena relación señal/ruido se seleccionan componentes para ser fragmentados por descomposición post-fuente (PSD). El espectrómetro se opera en el modo MS/MS generándose un espectro de masa iónica que se agrega al valor de masa original.

La información obtenida (PMF, *peptide mass fingerprint*) se compara con la información disponible en las bases de datos usando el programa MASCOT (Matrix Science http://www.matrixscience.com/search_form_select.html), se incluye en la búsqueda una tolerancia de masa isotópica de 0.05 Da, la oxidación parcial de metioninas, la carbamidometilación de cisteínas y la falta de un corte tríptico. Los criterios para la identificación proteica incluyen: los scores del Mascot, la cobertura de secuencia, y la concordancia entre la masa molecular y el punto isoelectrico teórico con los valores calculados de los geles 2D.

4.1.2. *Inmunomicroscopía de fluorescencia confocal*

En una primera instancia realizamos inmunolocalizaciones *in toto* con el anticuerpo contra rEgFABP1 purificado que reconoce a MvFABPa y MvFABPb con alta especificidad. A posteriori decidimos generar sueros policlonales de conejos contra rMvFABPa y rMvFABPb para ser utilizados en inmunolocalizaciones en criosecciones de tetratiridios. Para esto clonamos la secuencia codificante completa de dichas proteínas y obtuvimos las proteínas recombinantes puras. Luego de generar los respectivos sueros, los mismos son purificados para poder ser utilizados en las inmunohistoquímicas.

Todos los ensayos de microscopía se realizan con tetratiridios de *M. vogae* debido al escaso material de *E. granulosus*. La colecta y el cultivo previo se explican anteriormente.

4.1.2.1. Clonado de las secuencias codificantes completas de MvFABPa y MvFABPb

Se extrae ARN total de tetratiridios de *Mesocestoides vogae* utilizando Tri-reagent (Sigma) siguiendo el protocolo aconsejado por el fabricante con una relación de larvas/reactivo de 1:10. La transcripción inversa se lleva a cabo con la transcriptasa inversa Superscript II RNase H (Invitrogen, Life technologies) usando 250 ng de cebadores al azar y 4.6 µg de ARN total, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El producto de la reacción se mantiene a -20 °C hasta su uso. Se realiza PCR usando cebadores directos que contienen las regiones 5' codificantes de MvFABPa o b (MvFABPaPetfw: 5'-CATATGGAGGCGTTTCTGGGG-3' o MvFABPbPetFw: 5'-CATATGGATGCTTTTCTGGGTTC-3'), un cebador reverso con las regiones 3' correspondientes (MvFABPaPetRv: 5'-CCCGGAATTCTTATATATTTTCGAC-3' o MvFABPbPetRv: 5'-GAATTCCTAACATCTGGTGTATTC-3') y ADNc de *M. vogae* como molde. Se utilizan las siguientes condiciones en las PCRs: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos de desnaturalización del ADN a 94 °C por 45 seg, hibridación de cebadores a 59°C por 45 seg y elongación del ADN a 72 °C por 45 seg.. Se lleva a cabo un paso final de elongación a 72°C durante 10 min.. La reacción se realiza en 25 µl de volumen total con 1.25 unidades de *Taq* polimerasa recombinante (Fermentas, Hanover, MD, USA). Los productos de PCR se separan mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y se escinden del gel. A posteriori se purifican usando GFX gel band purification kit (GE Healthcare, Buckinghamshire UK) y se ligan en el vector pJET 1.2 (CloneJET™ PCR Cloning Kit, Fermentas, Thermo Fisher Scientific) para transformar bacterias *Escherichia coli* XL1. Se realizan 6 minipurificaciones de plásmido (AxyPrep Plasmid Miniprep Kit, Axygen Biosciences, USA) eligiéndose 3 clones para secuenciar. Luego, se digieren las secuencias codificantes correspondientes con las enzimas de restricción NdeI y EcoRI (Promega, Wisconsin, USA) (sitios de restricción incluidos en cebadores) a partir de los plásmidos pJET recombinantes y son clonadas en el vector pET5a (Promega, Wisconsin, USA) para transformar bacterias *E. coli* BL21 Star. Se secuencian ambas hebras de los plásmidos pET5a-MvFABPa y pET5a-MvFABPb de las colonias de *E. coli* BL21 Star seleccionadas. Todas las reacciones de secuenciación se realizan en el Servicio de Secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo.

4.1.2.2. Expresión y purificación de rMvFABPa y rMvFABPb

Bacterias *E. coli* BL21 Star conteniendo los plásmidos pET5a-MvFABPa o pET5a-MvFABPb se cultivan toda la noche a 37°C en medio 2TY conteniendo 100 µg/ml de ampicilina. El cultivo se diluye 1/34 en 800 ml del mismo medio, se incuba hasta $A_{600} = 0.5-0.7$ y se induce con 0.5 mM de isopropil β-D-tiogalactopiranosido. Luego de 2 horas de inducción se cosechan las células y se resuspenden en 30 mM Tris-HCl pH 8.3, 1mM EDTA, 1mM DTT. La lisis se lleva a cabo mediante tres ciclos de congelado y descongelado a -20°C y seis ciclos de sonicación (1.5 A x 30 seg.). La solución se centrifuga a 15000 x g durante 30 min a 4°C. El residuo y el sobrenadante se consideran la fracción insoluble y soluble respectivamente. El sobrenadante se concentra por ultrafiltración con membranas Millipore (Sigma-Aldrich) con tamaño de poro de 3000 Da y posteriormente se realiza una cromatografía de gel filtración en condiciones similares a las reportadas en la purificación de rEgFABP1 (Alvite et al., 2001). En la cromatografía de gel filtración se utiliza la matriz Sephadex G-50 (Sigma-Aldrich) en una columna de 1 m de alto por 1.6 cm de diámetro ocupando un volumen total de 180 ml, y se somete a un flujo constante de 15 ml/hora. Se colectan 2.5 ml por tubo cada 10 minutos. Las fracciones conteniendo rMvFABPa o b se colectan y se someten a cromatografía de intercambio iónico utilizando una columna con 30 ml del intercambiador aniónico SOURCE 15Q (Amersham Biosciences) y un flujo constante de 48 ml por hora. Se colecta 4.8 ml por tubo. La elución se realiza en pasos de fuerza iónica creciente en amortiguador 30 mM Tris-HCl pH 8.3 (20, 40, 100 y 2000 mM NaCl), en cada paso se colectan los tubos hasta que la absorbancia a 280 nm sea 0. Ambas proteínas eluyen en el rango de 20-40 mM de NaCl. La identificación de las proteínas recombinantes se realiza mediante SDS-PAGE al 15% (Laemmli, 1970) y tinción con *Coomassie brilliant blue R* (Sigma). La concentración de las proteínas rMvFABPa y rMvFABPb puras se determina mediante la medida de absorbancia a 280 nm utilizando los coeficientes de extinción molar 9970 y 8480 M⁻¹cm⁻¹ respectivamente, calculados a partir del recurso informático Expasy usando la herramienta ProtParam.

4.1.2.3. Purificación del suero anti-rEgFABP1

El suero policlonal de conejo anti-rEgFABP1 se purifica mediante depleción de anticuerpos contra proteínas de *E. coli* y precipitación de IgGs. Brevemente, 1,5 ml de un cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo el plásmido pET-5a e inducido durante 2 hs con IPTG 0.5 mM, se centrifuga durante 1 min. a 10000 x g. El residuo se

resuspende en 200 µl de amortiguador de inmunoprecipitación (10 mM Tris-HCl pH 8, 140 mM NaCl, 1 % Tritón X-100), se congela y descongela 3 veces y se centrifuga 15 min a 15000 x g. Se agitan 100 µl de suero con 200 µl de extracto bacteriano con 700 µl de amortiguador de inmunoprecipitación durante toda la noche a 4° C. Por último, se centrifuga durante 20 min. a 12000 x g y se recupera el suero depletado. Luego se precipitan las IgGs con sulfato de amonio al 33 % siguiendo el protocolo convencional (Oppermann, 1992). De forma resumida, se agrega lentamente y con agitación 0.5 ml de una solución de sulfato de amonio saturada por ml de suero. Luego de agitar durante 2 horas se centrifuga durante 30 min. a 5000 x g. El residuo se resuspende con una solución de sulfato de amonio al 33% y se centrifuga por 30 min a 5000 x g. El residuo se resuspende en el menor volumen posible de PBS y se dializa contra PBS. Por último se mide la absorbancia a 280 nm y se cuantifica utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{IgGs de conejo (mg/ml)} = 0.625 \times \text{Abs}_{280}$$

4.1.2.4. Producción de sueros contra rMvFABPa y rMvFABPb

La producción de sueros policlonales contra rMvFABPa y rMvFABPb en conejos se lleva a cabo por la Dra. Verónica Fernández (Cátedra de Inmunología, Instituto de Higiene) de acuerdo al protocolo aprobado por la CHEA N° 101900-000510-11. A cada conejo se le aplica una primera inoculación intradérmica con 500 µg de rMvFABPa o 380 µg de rMvFABPb, emulsionadas con adyuvante completo de Freund. A los 30 días se realiza un refuerzo con 400 µg de cada proteína vía intramuscular, emulsionadas con adyuvante incompleto de Freund. A los 40 días, los conejos son sangrados de la vena de la oreja. El suero se colecta permitiendo que la sangre coagule a 4° C durante 16 hs, siendo conservado a -20° C hasta su uso.

4.1.2.5. Purificación de sueros contra rMvFABPa y rMvFABPb

En primera instancia, los sueros anti-rMvFABPa y anti-rMvFABPb son precipitados con sulfato de amonio al 33% para purificar las IgGs (Oppermann, 1992). A continuación son purificados por cromatografía de afinidad utilizando sefarosa activada con bromuro de cianógeno (SIGMA). Mediante *Western Blot* detectamos que el suero anti-rMvFABPa reconoce a la proteína recombinante MvFABPa y en menor grado a rMvFABPb, mientras que el suero anti-rMvFABPb no presenta reconocimiento cruzado con la proteína rMvFABPa. Para evitar la reacción cruzada sembramos el suero anti-rMvFABPa en una columna conteniendo la resina sefarosa unida a rMvFABPb.

Colectamos el percolado, descartando el producto de elución conteniendo aquellas IgGs que reconocen a ambas proteínas. A pesar de que no se observa reconocimiento cruzado del suero anti-rMvFABPb, decidimos purificarlo de la misma manera para asegurarnos su pureza. En esta instancia utilizamos una resina unida a rMvFABPa. Brevemente, 0.5 g de sefarosa activada con bromuro de cianógeno se mezcla con 3 ml de HCl 1mM durante 2 hs. Luego de colocarse en una columna, es lavada con 10 vol. de agua destilada y con 1.25 ml de amortiguador de unión (0.1 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl, pH 8.3-8.5). Inmediatamente después se pone en contacto con el ligando en amortiguador de unión y se agita suavemente durante 2 hs a temperatura ambiente. Se eluye la solución de ligando no unida y se lava con buffer de unión. Luego se bloquean los sitios remanentes con amortiguador glicina 0.2 M, pH8 o etanolamina 1 M, pH 8, durante toda la noche a 4° C, con agitación. Se realizan cinco ciclos de lavados, primero con amortiguador de unión y segundo con amortiguador acetato 0.1 M pH4, NaCl 0.5 M. Luego de equilibrar las columnas con amortiguador de trabajo (0.1 M glicina, 0.15 M NaCl, pH 8.2), se siembra la muestra. Por último, se lava con amortiguador de trabajo hasta absorbancia a 280 nm cercana a 0 y se eluye con amortiguador de elución (0.1 M glicina, 0.5 M NaCl) a pH 2.6. Inmediatamente se agrega 0.1 vol. de amortiguador Tris-HCl 1M pH 8.3 a las fracciones colectadas para neutralizarlas.

4.1.2.6. Producción de extractos proteicos de protoescólices y tetratiridos

Se utilizan extractos proteicos totales de protoescólices y tetratiridos para evaluar mediante *Western blot*, la especificidad de los anticuerpos en cada etapa de purificación. Para preparar extractos conteniendo proteínas de protoescólices, se agrega un volumen de amortiguador Tris 50 mM pH 8.5, 0.15 M NaCl, complementado con inhibidores de proteasas. Cada 500µl del amortiguador se agrega 5 µl de los inhibidores de proteasas leupeptina, pepstatin, aprotinina, EDTA-Na₂, 10 µl de PMSF 0.8% y 5 µl de Tritón X100. Se homogeneiza con microhomogeneizador para tubos eppendorf (Pellet Pestle Motor, Kontes) y se centrifuga 5' a 8000 x g, separándose el sobrenadante.

Para generar extracto proteico de tetratiridos se homogeneizan 200 µl de los mismos en 200 µl de buffer de lisis (10 mM amortiguador fosfato pH 7.4, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Tritón X-100, 1 mM PMSF) con un microhomogeneizador para tubos eppendorf (Pellet Pestle Motor, Kontes). Se centrifuga durante 15 min. a 15000 x g a 4° C, se separa el sobrenadante y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones.

Ambos extractos se dosifican mediante el método del BCA (QuantiPro BCA Assay Kit, SIGMA) y se utiliza 40 µg de extracto proteico por carril de mini-gel en una electroforesis SDS-PAGE.

4.1.2.7. Inmunolocalizaciones *in toto*

Realizamos inmunolocalizaciones *in toto* utilizando tetratiridios de *M. vogae* y el anticuerpo policlonal contra rEgFABP1 previamente purificado. Esta actividad se desarrolló en el Departamento de Proteínas y Ácidos Nucleicos del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) bajo la orientación de la Dra. Alejandra Kun. Los tetratiridios son cultivados como se describe anteriormente y son mantenidos un día más en cultivo en las mismas condiciones pero sin suero fetal bovino. Luego, los parásitos se incuban con 0.2 µM BODIPY FL C₁₆ (análogo de ácido graso) durante 15 min. a 37 °C, o con 0.2 µM de MitoTracker Orange CMTMRos (marcador específico de mitocondria) por 15 min. a 37 °C, o con 15 µM BODIPY TR C5-ceramida formando complejo con BSA (marcador específico del aparato de Golgi) durante 15 min. a 4 °C, estos reactivos fluorescentes se adquieren en Molecular Probes (Invitrogen, Eugene, OR, USA). Luego de los tratamientos de marcado los organismos vivos son lavados de acuerdo a lo indicado por el fabricante para cada caso. A continuación, los tetratiridios son fijados con paraformaldehído 3% en amortiguador PHEM pH 7.5 (25 mM Hepes, 60 mM Pipes, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂) durante 60 min. con agitación orbital a temperatura ambiente, y son lavados tres veces con el mismo amortiguador. A posteriori, las larvas se permeabilizan con 50 µg/ml proteinasa K, 0.1% Tween 20 en amortiguador PHEM durante 10 min. a 37° C y la enzima es inactivada mediante 3 lavados con glicina 2 mg/ml en el mismo amortiguador. Luego el material es incubado con el anticuerpo contra rEgFABP1 purificado diluido 1/50 en solución de bloqueo (200 mM glicina, 0.2% BSA, 3.5% suero normal de cabra en amortiguador PHEM) por 1 h a 37° C. Después de 4 lavados de 5 min con PHEM a temperatura ambiente, los tetratiridios se incuban con un anticuerpo de cabra contra IgGs de conejo marcado con Alexafluor 488 o con Alexafluor 546 (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, USA) diluido 1/1000 y To-Pro 3 iodide (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, USA) diluido 1/1000 en amortiguador PHEM, durante 45 min a 37° C. Se realizan inmunolocalizaciones control sin anticuerpo contra rEgFABP1, o sin anticuerpo anti-IgGs de conejo o sin ningún anticuerpo para ver autofluorescencia. Luego de 4 lavados de 10 min con PHEM, las muestras son montadas con ProLong Gold antifade reagent (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, USA). Los cubreobjetos son sellados con esmalte de uñas y

los portaobjetos montados se protegen de la luz y se almacenan a 4° C hasta ser observados al microscopio.

4.1.2.8. Inmunohistoquímicas sobre criosecciones

Las inmunohistoquímicas sobre criosecciones se llevan a cabo utilizando tetratiridios de *M. vogae* y los anticuerpos policlonales contra rMvFABPa y contra rMvFABPb, previamente purificados. Esta actividad se desarrolló en el Departamento de Proteínas y Ácidos Nucleicos del IIBCE bajo la orientación de la Dra. Alejandra Kun. El cultivo de los parásitos y el marcado con BODIPY FL C₁₆, MitoTracker Orange CMTMRos y BODIPY TR C5-ceramida se realiza como se describe en las inmunolocalizaciones *in toto*. Luego los parásitos son fijados con paraformaldehído al 3% en amortiguador PHEM durante 1h a 4° C, con agitación. Se realizan 6 lavados con PHEM de 10 min. y el material se impregna en sacarosa al 30% en PHEM durante toda la noche a 4° C con agitación. A posteriori, los tetratiridios se infiltran con medio de criopreservación (Jung, Leica Microsystems, Alemania) mediante una primera incubación en una solución de 50% sacarosa 30% y 50% de medio durante 1 h, seguida de una segunda incubación con medio puro por 1 h, con agitación en ambos casos. Se hace un último cambio del medio de criopreservación y se hacen moldes que son cortados con criostato obteniéndose cortes por congelación de 10 micras de espesor. Luego de marcar las regiones con lápiz de cera se bloquean los sitios de unión inespecíficos con amortiguador de bloqueo [amortiguador de incubación (0.1% BSA y 150 mM Glicina en PHEM) y 5% suero normal de cabra] durante 30 min. a temperatura ambiente. Las secciones se incuban con los anticuerpos específicos contra rMvFABPa y contra rMvFABPb previamente purificados diluidos 1/200 en amortiguador de incubación, durante 1 hora a 37° C. Después de tres lavados de 5 min. con amortiguador de incubación, las secciones son incubadas con anticuerpos de cabra contra IgGs de conejo conjugados al fluorocromo Alexafluor 488 o Alexafluor 546 (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, USA) diluidos 1/1000 en amortiguador de incubación, durante 45 min. a 37° C. En algunos casos se incluye también DAPI diluido 1/1000 (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, USA) que une preferencialmente ADN doble hebra. Por último los preparados se lavan 3 veces durante 5 min. con amortiguador de incubación y 3 veces con amortiguador PHEM por 5 min., para ser montados con ProLong Gold antifade reagent (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, USA). Los cubreobjetos son sellados con esmalte de uñas y los portaobjetos montados se protegen de la luz y se almacenan a 4° C hasta ser observados al microscopio. Se

realizan controles con suero normal de conejo previamente purificado mediante precipitación de IgGs, como se indica anteriormente, y sin anticuerpo específico.

4.1.2.9. Microscopía de fluorescencia confocal

Las imágenes de fluorescencia se capturan utilizando el microscopio confocal de escaneo laser Olympus BX61 y las imágenes son procesadas con el programa FLUOVIEW 300 version 4.3 (IIBCE). El BODIPY FL C₁₆ se observa utilizando el laser Argón/Kriptón de 488 nm con un filtro de 510-530 nm de ancho de banda. El Mitotracker y el BODIPY TR ceramida se detectan con un laser Helio/Neón verde de 543 nm con un filtro de emisión de 560-600 nm de ancho de banda. El marcador To-Pro 3 se visualiza usando el laser Helio/Neón rojo de 633 nm con un filtro de emisión de 660-700 nm de ancho de banda y el marcador DAPI fluoresce excitando con un laser UV (405 nm) con un filtro de emisión de 410-430 nm. Los especímenes se observan a través del objetivo de inmersión de aceite 60X y se colectan fotos con distintos aumentos especificados en cada caso. Las proteínas en estudio se detectan con el laser de 488 nm para el fluorocromo Alexafluor 488, o con el laser de 543 nm para Alexafluor 546. Las fotos se registran a partir de un único plano focal de 1 micra en el caso de las inmunolocalizaciones *in toto* y a partir de planos únicos o seriados (z) de distinto espesor (0.5 – 1.5 micras) especificado en cada caso, para las inmunohistoquímicas en criosecciones. Tanto en las inmunolocalizaciones *in toto* como en las inmunohistoquímicas sobre criosecciones se toman varias micrografías de 6 a 10 organismos en cada condición.

4.2. Resultados

Con la intención de dilucidar las funciones de las FABPs aisladas de los cestodos en estudio, comenzamos analizando la colocalización de las MvFABPs con un análogo de ácido graso fluorescente y la localización subcelular de las mismas. Abordamos el estudio de la localización subcelular utilizando tres aproximaciones experimentales complementarias. En primer lugar, se llevan a cabo inmunomicroscopías de fluorescencia confocal de tetratiridios *in toto*, usando marcadores específicos subcelulares. En una segunda instancia realizamos el fraccionamiento subcelular de protoescolices de *E. granulosus* y de tetratiridios de *M. vogae* para realizar electroforesis uni y bidimensionales, y así poder identificar las FABPs mediante *Western Blot* (WB) y espectrometría de masa MALDI TOF-TOF (MS). Por último, realizamos inmunolocalizaciones sobre criosecciones de tetratiridios utilizando anticuerpos específicos y marcadores subcelulares. Lamentablemente no pudimos realizar los ensayos de inmunolocalización con protoescolices de *E. granulosus* debido a la dificultad en la obtención del material parasitario.

4.2.1. Purificación del suero anti-rEgFABP1

Para llevar a cabo los ensayos de inmunolocalización utilizamos el suero anti-rEgFABP1 disponible en ese momento. Anteriormente nuestro grupo generó un suero policlonal de conejo anti-rEgFABP1 y en esta instancia se purifica para asegurarnos el reconocimiento de las MvFABPs.

Dicha purificación involucra depleción de anticuerpos contra proteínas de *E. coli* y posterior precipitación de inmunoglobulinas G. Cabe destacar que *E. coli* no expresa FABPs. Luego de este doble proceso de purificación del suero, la concentración de las IgGs de conejo es de 1.14 mg/ml.

Tanto el suero sin purificar como el purificado reconocen a las proteínas rEgFABP1 (masa molecular teórica 15065.4 Da, punto isoelectrico teórico 7.7) y a EgFABP2 recombinante con cola de 6 histidinas (His-EgFABP2: masa molecular teórica 16231.5 Da) (Figura 8A y 8B). Destacamos que la proteína rEgFABP2 sin etiquetado tendría una masa molecular teórica 15408.7 Da y punto isoelectrico teórico de 6.37. Debido a la dificultad en su purificación, utilizamos lisados bacterianos expresando dicha proteína. Por otro lado, este suero purificado detecta una banda intensa que correspondería a las EgFABPs, en el extracto proteico de protoescolices de *E.*

granulosus. Dada la alta similitud de secuencia entre las FABPs de los dos cestodos en estudio, el suero purificado también reconoce a dos bandas de aproximadamente el mismo tamaño que rMvFABPa (masa molecular teórica 14844.0 Da, punto isoeléctrico teórico 5.54) y que rMvFABPb (masa molecular teórica 14726.8 Da, punto isoeléctrico teórico 6.91) en el extracto proteico de tetratiridios de *M. vogae* (Figura 8C).

En la figura 8B y 8C se aprecia el éxito de la purificación del suero policlonal anti-rEgFABP1 a través de la desaparición del marcado de bandas inespecíficas, habilitándose así su uso en las inmunolocalizaciones *in toto*.

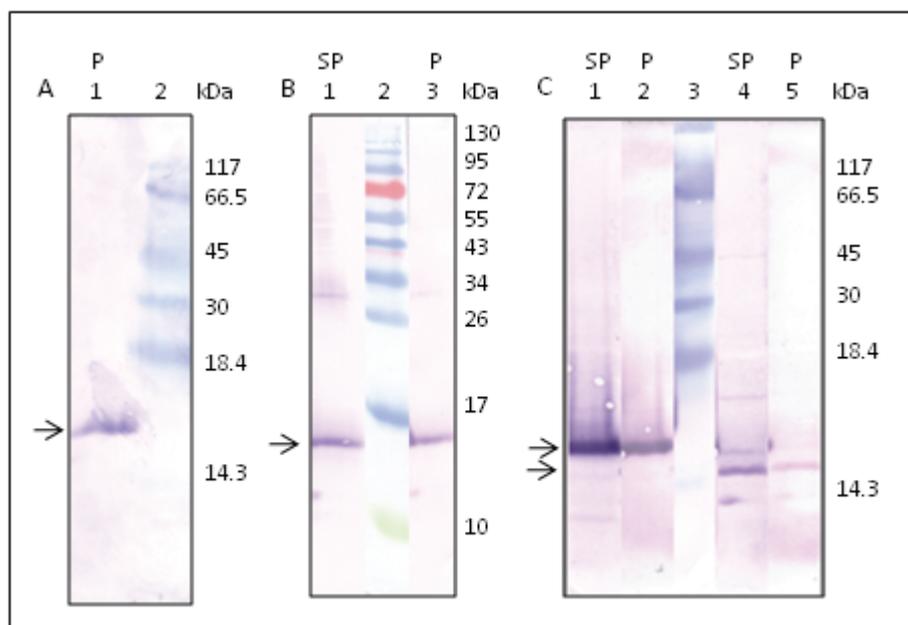


Figura 8. Confirmación de la purificación del suero policlonal contra rEgFABP1 mediante *Western Blots*. A: 1) 2 μ g de rEgFABP1 purificada, 2) marcador de masa molecular preteñido Fermentas (SM0441). B: 1 y 3) lisado celular de *E. coli* M15 pREP4-pQ-EgFABP2 inducido, 2) marcador de masa molecular preteñido Fermentas (SM0671). C: 1 y 2) 50 μ g de extracto proteico de protoescolices, 4 y 5) 50 μ g extracto proteico de tetratiridios, 3) marcador de masa molecular preteñido Fermentas (SM0441). En todos los casos se realiza SDS-PAGE al 15%; el suero sin purificar (SP) se diluye 1/1000 y el purificado (P) 1/500.

4.2.2. Inmunolocalización *in toto* de MvFABPs en tetratiridios

Para estudiar la distribución intracelular de las MvFABPs se llevan a cabo inmunolocalizaciones *in toto* en tetratiridios, empleando además del suero anti-rEgFABP1 purificado, marcadores subcelulares fluorescentes. Analizamos también, la capacidad de estas larvas de capturar ácidos grasos *in vivo*, y buscamos colocalización entre las FABPs y un análogo de ácido graso fluorescente (BODIPY FL-C₁₆).

La mayoría de las micrográficas fueron tomadas de la región media-caudal de los tetratiridios cercana al tegumento, para así asegurarnos la ausencia de ruido de fondo.

Luego de poner a punto las condiciones de la inmunolocalización *in toto* y de los marcados subcelulares fluorescentes *in vivo*, realizamos el doble marcado de MvFABPs y de ácidos nucleicos con To PRO-3. Cabe mencionar que la sonda fluorescente To PRO-3 se une tanto a ADN como ARN pero presenta preferencia de unión por el ADN. Por este motivo no podemos descartar que parte del marcado se deba a la presencia de ARN. Sin embargo, pudimos detectar varias estructuras marcadas que por sus dimensiones y forma corresponderían a núcleos, algunas de ellas están marcadas con flechas amarillas en la Figura 9. En estas regiones se aprecia claramente la localización de una o ambas MvFABPs en los núcleos, detectada por la superposición de la marca de las proteínas (rojo) con la tinción de ácidos nucleicos (verde) revelada por una coloración amarilla. Luego de analizar varias micrográficas podemos afirmar que las MvFABPs colocalizan parcialmente con los núcleos, observándose una importante proporción de núcleos de coloración verde que no presentan la doble tinción.

Continuamos nuestro estudio analizando la localización de las MvFABPs y de un marcador fluorescente específico de mitocondrias (MitoTracker), al igual que la de otro específico del aparato de Golgi (BODIPY TR-ceramida). Nos centramos en el estudio de las señales puntiformes correspondientes al marcado de las proteínas, de mitocondrias y de regiones del Golgi, debido a que en todos los casos se observa una señal generalizada tenue posiblemente debida a la importante distribución citosólica de las FABPs y de los organelos en estudio.

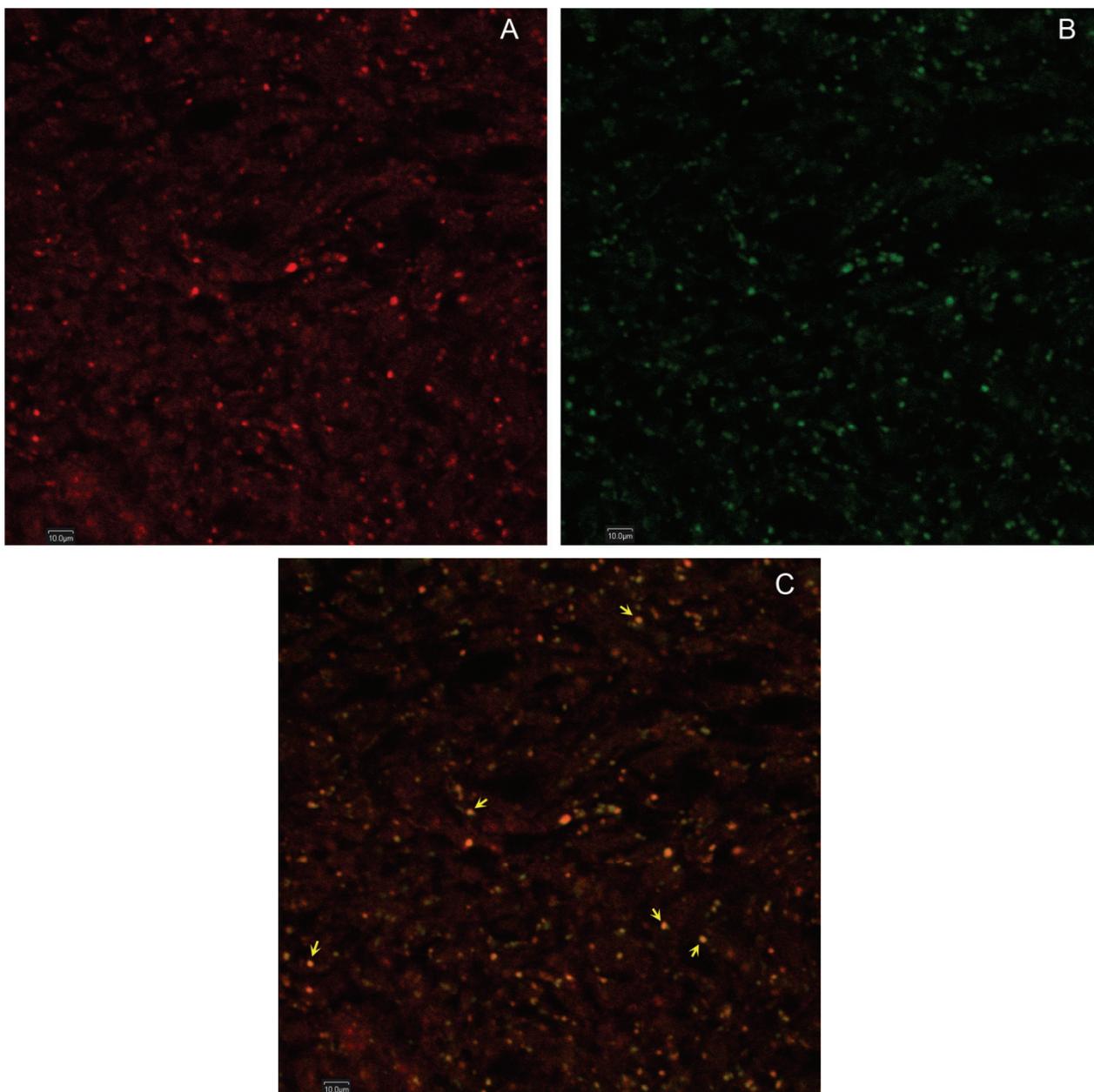


Figura 9. Inmunolocalización *in toto* en tetratridios, colocalización MvFABPs-núcleo. A) MvFABPs (rojo); B) ácidos nucleicos (To PRO-3, verde); C) superposición MvFABP-ácidos nucleicos (amarillo). Aumento 60X, plano focal único. La barra indica 10 micras. Las flechas amarillas indican regiones de colocalización MvFABPs-núcleos.

Observamos la colocalización parcial de las MvFABPs con mitocondrias, ya que se visualizan regiones con marcado exclusivo de MvFABPs o de mitocondrias (Figura 10C). Si bien la expresión de las MvFABPs es bastante homogénea (Figura 10A), el marcado de proteínas colocaliza parcialmente con la tinción de mitocondrias. En la figura 10B se marca con MitoTracker estructuras más grandes que el tamaño de mitocondrias aisladas que pueden deberse a acumulaciones de las mismas.

Es necesario que estos resultados sean confirmados mediante técnicas más precisas ya que el tamaño de la mitocondrias, que oscila entre 0.2 a 1 μm de diámetro y hasta 7 μm de longitud, se encuentra en el límite de resolución del microscopio óptico.

La figura 11 muestra una colocalización parcial MvFABPs-Golgi, existiendo regiones de Golgi donde no está presente la proteína y sitios donde solo se observa el marcado de las proteínas. En la región analizada nos llama la atención que la expresión de las MvFABPs a nivel subtegumentario es tenue, volviéndose más fuerte a medida que avanzamos hacia el interior de la larva. Sin embargo, la tinción del Golgi no parece ser diferente en estas dos regiones. Recuérdese que en el análisis no se considera la tinción tenue y generalizada, centrándonos en las señales puntiformes.

Por último analizamos si las larvas de *M. vogae* son capaces de capturar *in vivo* ácidos grasos del medio. Este experimento es muy relevante ya que nuestro grupo de investigación propone que debido al metabolismo lipídico restringido que estos parásitos poseen, es necesario que los mismos adquieran estas moléculas del hospedero para su supervivencia. Es así como luego de incubar a los tetratiridios con un análogo de ácido graso fluorescente, BODIPY FL-C₁₆, se realizan inmunolocalizaciones *in toto*, estudiando en primer lugar la capacidad de captura del lípido por las larvas y en segunda instancia la localización de las MvFABPs y el ácido graso.

Las figuras 12 y 13 nos muestran claramente que el análogo de ácido graso fluorescente es captado por estas larvas, encontrándose ampliamente distribuido en el organismo. Sin embargo, la señal de este lípido es mayoritaria a nivel del tegumento y de la región apical. Se aprecia que la expresión de las MvFABPs ocurre a lo largo de la larva siendo también de mayor intensidad a nivel del tegumento y en la región apical. Observamos a mayor aumento, que existe colocalización parcial entre las MvFABPs y el lípido fluorescente, detectándose regiones pequeñas donde solamente

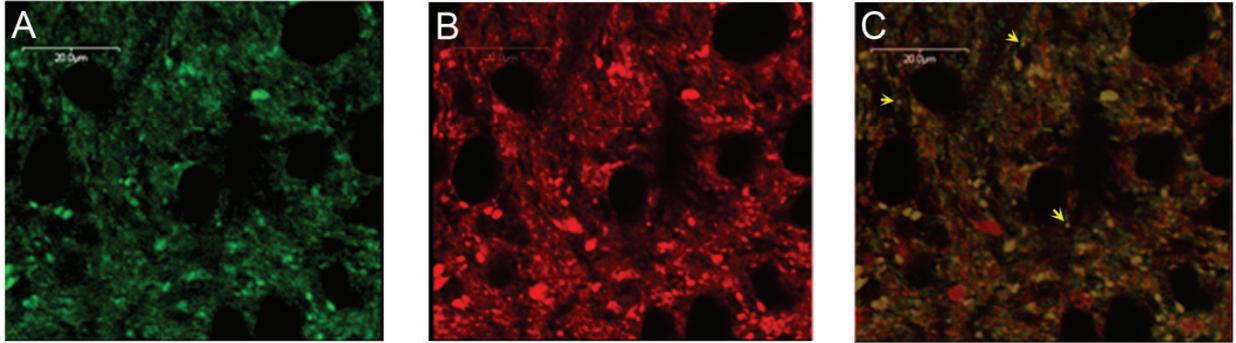


Figura 10. Inmunolocalización *in toto* en tetratiridios, colocalización MvFABPs-mitocondrias. Las micrografías corresponden a la región media-caudal. A) MvFABPs (verde), B) mitocondrias (MitoTracker, rojo), C) superposición MvFABPs-mitocondrias (amarillo). Aumento 120X, plano focal único. Las barras en A, B, y C indican 20 micras. Las flechas amarillas señalan sitios de colocalización MvFABP-mitocondria.

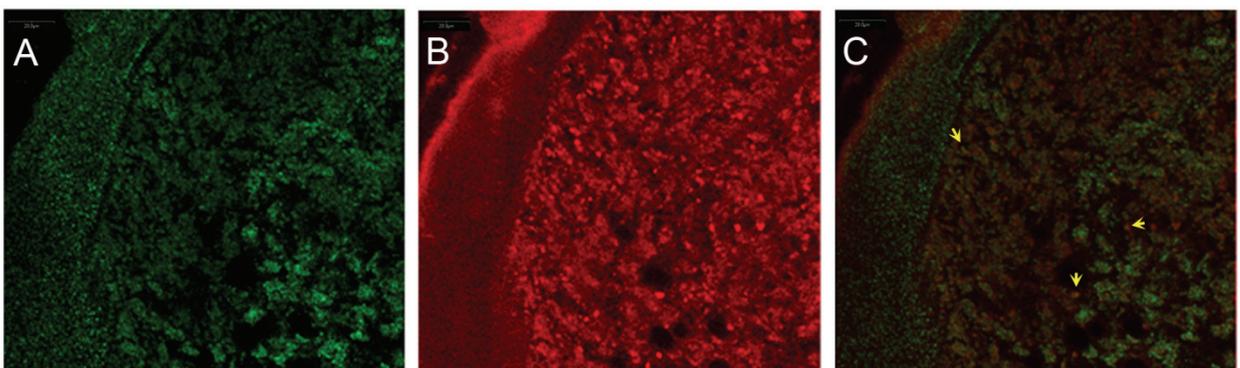


Figura 11. Inmunolocalización *in toto* en tetratiridios, colocalización MvFABPs-Golgi. Las micrografías corresponden a la región media-caudal. A) MvFABPs (verde), B) aparato de Golgi (BODIPY TR-ceramide, rojo), C) superposición MvFABPs-Golgi (amarillo). Aumento 60X, plano focal único. Las barras indican 20 micras. Las flechas amarillas señalan regiones de colocalización MvFABP-Golgi.

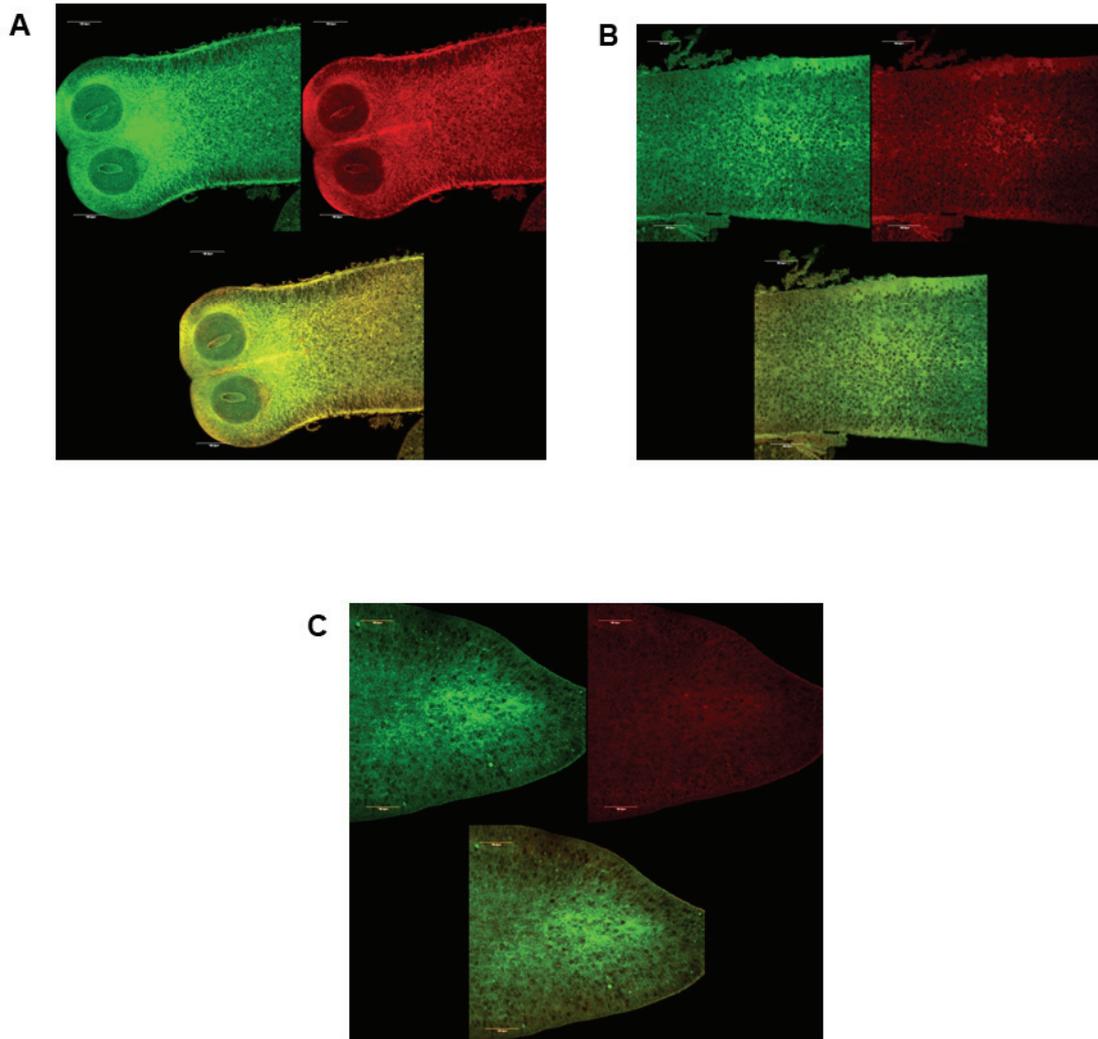


Figura 12. Inmunolocalización *in toto* en tetratridios, colocación MvFABPs-análogo de ácido graso a lo largo de la larva. A) región anterior; B) región media, C) región caudal. Verde: BODIPY FL-C16, rojo: MvFABPs, amarillo: superposición MvFABP-ácido graso. Aumento 20X, las barras indican 10 micras.

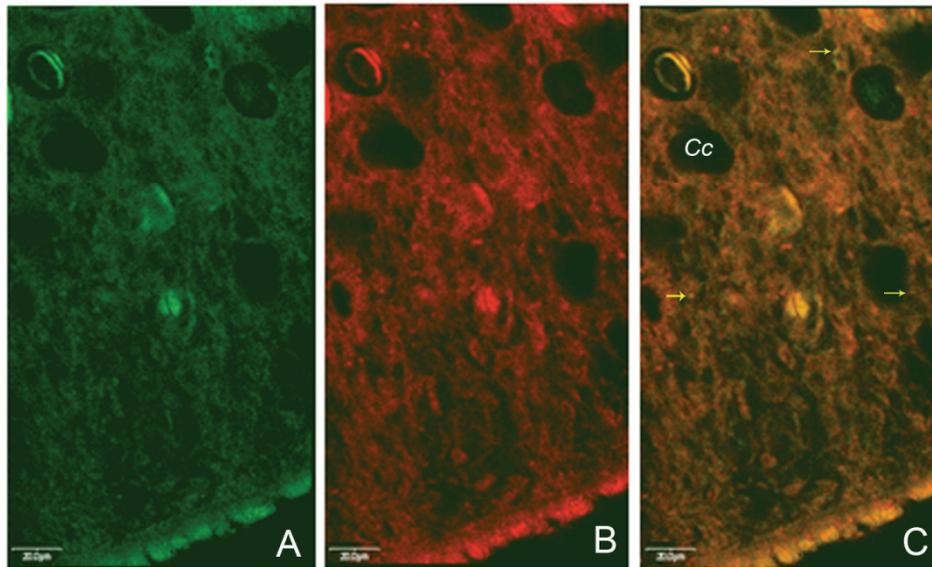


Figura 13. Inmunolocalización *in toto* en tetratiridios (región media), colocalización MvFABPs-análogo de ácido graso. A) Análogo de ácido graso (BODIPY FL-C16, verde); B) MvFABPs (rojo); C) superposición análogo de ácido graso-proteína (amarillo). Aumento 120 X, plano focal único. Las barras indican 20 micras. Las flechas amarillas indican regiones de colocalización MvFABPs-ácido graso. Cc: corpúsculo calcáreo.

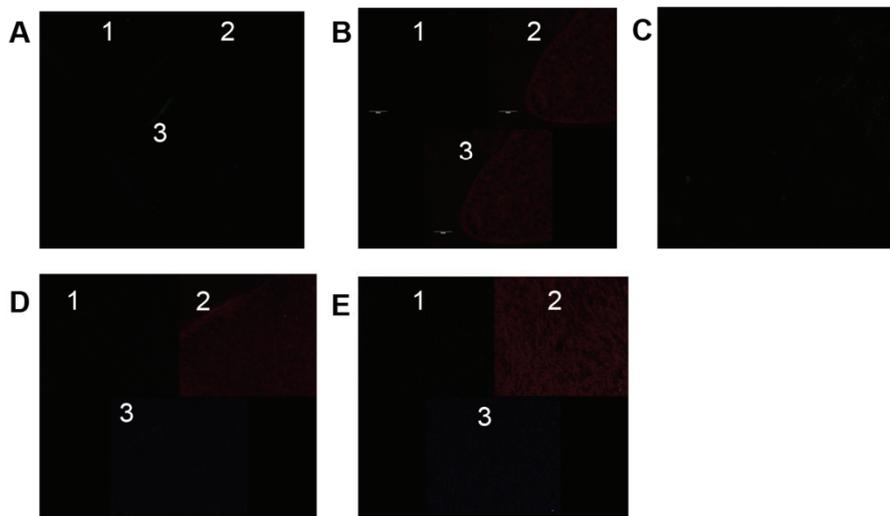


Figura 14. Controles de las inmunolocalizaciones *in toto* en tetratiridios. A) Control de autofluorescencia, láseres 488 nm (1), 543 nm (2), 633 nm (3), voltaje de los fotomultiplicadores (PM) 705 V, aumento 20X; B) control sin anticuerpo secundario (Alexafluor 488, 543) (PM 488 (1): 775 V, PM 543 (2): 750 V, superposición (3), aumento 40X; C) control sin anticuerpo contra-EgFABP1 con anticuerpo Alexafluor 543, superposición de los 3 canales (PM 488: 748 V, PM 543: 673 V, PM 633: 673 V), aumento 60X; D) control sin anticuerpo contra-EgFABP1 con anticuerpo Alexafluor 488 (PM 488 (1), 543 (2), 633 (3): 730 V), aumento 60X; E) control sin anticuerpo secundario (Alexafluor 488, 543) (PM 488 (1), 543 (2), 633 (3): 730 V), aumento 60X.

está presente el lípido o la proteína (Figura 13). Cabe mencionar que mediante esta metodología no podemos afirmar que las MvFABPs unen este ligando fluorescente. Es interesante la presencia del análogo de ácido graso en un corpúsculo calcáreo (Figura 13A), estas son estructuras donde no se marcan MvFABPs.

Los controles realizados se muestran en la figura 14 e incluyen experimentos llevados a cabo en las mismas condiciones que las inmunolocalizaciones presentadas previamente, donde el anticuerpo contra-rEgFABP1, o alguno de los anticuerpos contra-IgGs de conejo (Alexafluor 488 o 543), o ambos anticuerpos (autofluorescencia) están ausentes. Estas micrografías control se adquirieron con voltajes de los fotomultiplicadores de los distintos láseres mayores a los utilizados para tomar las micrografías de los distintos experimentos presentados anteriormente. En la figura 14 solamente se observa un poco de autofluorescencia en el canal 543 y una señal aún menor en el canal 633 (Figura 14B, D y E). De esta manera consideramos validadas las inmunolocalizaciones realizadas.

Resumiendo los resultados obtenidos en esta sección, podemos afirmar que las MvFABPs colocalizan parcialmente con núcleos, mitocondrias y el aparato de Golgi. Asimismo, demostramos que las larvas de *M. vogae* capturan un análogo de ácido graso *in vivo* y, además, las MvFABPs colocalizan parcialmente con este lípido siendo ambas señales más intensas en el tegumento y la región apical.

4.2.3. *Fraccionamiento subcelular e identificación mediante electroforesis 1D y 2D asociadas a WB y MS*

A continuación realizamos fraccionamientos subcelulares tanto de protoescólecce de *E. granulosus* como de tetratiridios de *M. vogae*, y sometimos los extractos proteicos generados a electroforesis uni y bi-dimensionales para identificar a las FABPs en estudios mediante *Western Blot* y espectrometría de masa. Con esta estrategia pretendemos estudiar la localización subcelular de EgFABP1 y EgFABP2 de *E. granulosus* ya que no pudimos llevar a cabo inmunolocalizaciones. Asimismo, nos proponemos confirmar los resultados obtenidos de las inmunolocalizaciones previas con tetratiridios, tratando de identificar en cada fracción la/s MvFABP/s presente/s.

4.2.3.1. Determinación de actividades enzimáticas marcadoras

Luego de someter a protoescoleces y a tetratiridios al proceso de fraccionamiento subcelular, es necesario confirmar que efectivamente se obtienen las fracciones deseadas para así poder validar la presencia de las proteínas en estudio en los compartimentos analizados. De esta manera, utilizamos como marcador citosólico la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa, como marcador mitocondrial la actividad de la succinato deshidrogenasa y como marcador peroxisomal la actividad peroxidasa, en todas las fracciones obtenidas y en el homogeneizado.

La tabla 1 muestra el resultado del análisis de las fracciones obtenidas a partir de tetratiridios de *M. vogae*. La fracción citosólica presenta un enriquecimiento importante en la actividad específica lactato deshidrogenasa comparada con el homogeneizado de partida, mientras que la misma es nula en el resto de las fracciones (núcleos, mitocondrias y microsomas) indicando que si existieran restos citosólicos estarían poco representados.

Respecto a la actividad específica succinato deshidrogenasa, la misma se encuentra ampliamente aumentada en la fracción mitocondrial, siendo nula en la fracción nuclear y citosólica y mínima en la microsomal. Esto demuestra que la fracción nuclear y citosólica estarían libres de mitocondrias, mientras que la fracción microsomal posee una leve contaminación mitocondrial probablemente debida a la presencia de mitocondrias rotas, de menor tamaño que las intactas.

Por último, la actividad específica peroxidasa, característica de los peroxisomas, se encuentra aumentada en la fracción microsomal, mientras la misma es nula en la fracción nuclear y muy baja y baja en la fracción mitocondrial y citosólica respectivamente. Estos resultados indican que existe una leve contaminación de la fracción mitocondrial por microsomas seguramente producto de lavados insuficientes del segundo residuo y una contaminación mayor de la fracción citosólica debida probablemente a la ruptura de peroxisomas.

Cabe mencionar que de acuerdo a la metodología utilizada en el fraccionamiento subcelular, la fracción microsomal está constituida de vesículas heterogéneas pequeñas formadas a partir del retículo endoplásmico (liso y rugoso), del aparato de Golgi y membrana plasmática, y de peroxisomas y lisosomas.

Tabla 1. Actividad específica y factor de purificación de las enzimas marcadoras en las fracciones obtenidas de tetratiridios.

<i>Lactato Deshidrogenasa</i>	Act. Enz. (U/ml)	[Prot] (mg/ml)	Act. Esp. (U/mg)	F. Purific.
Homogeneizado	0.043 ± 0.003	1.907	0.023 ± 0.002	1.00 ± 0.09
F. nuclear	0	0.739	0	0
F. mitocondrial	0	2.323	0	0
F. microsomal	0	3.843	0	0
F. citosólica	0.053 ± 0.003	0.723	0.073 ± 0.004	3.20 ± 0.18
<i>Succinato Deshidrogenasa</i>	Act. Enz. (U/ml)	[Prot] (mg/ml)	Act. Esp. (U/mg)	F. Purific.
Homogeneizado	0.0068 ± 0.0010	1.907	0.0036 ± 0.0005	1.00 ± 0.14
F. nuclear	0	0.739	0	0
F. mitocondrial	0.0283 ± 0.0019	2.323	0.0122 ± 0.0008	3.39 ± 0.22
F. microsomal	0.0010 ± 0.0015	3.843	0.0003 ± 0.0004	0.08 ± 0.11
F. citosólica	0	0.723	0	0
<i>Peroxidasa</i>	Act. Enz. (U/ml)	[Prot] (mg/ml)	Act. Esp. (U/mg)	F. Purific.
Homogeneizado	3.89 ± 0.45	1.907	2.04 ± 0.24	1.00 ± 0.12
F. nuclear	0	0.739	0	0
F. mitocondrial	0.45 ± 1.03	2.323	0.19 ± 0.44	0.09 ± 0.21
F. microsomal	13.53 ± 0.34	3.843	3.52 ± 0.09	1.73 ± 0.04
F. citosólica	0.22 ± 0.22	0.723	0.30 ± 0.30	0.15 ± 0.15

Se muestra la actividad enzimática (Act. Enz.), la actividad específica (Act. Esp.) y el factor de purificación (F. Purific.) con la desviación estándar. [Prot]: concentración proteica.

El resultado del análisis de las fracciones obtenidas a partir de protoescoleces de *E. granulosus* se resume en la tabla 2. Según los mismos, la fracción citosólica muestra un importante aumento en la actividad específica lactato deshidrogenasa en comparación con el homogeneizado inicial, siendo nula en el resto de las fracciones. Esto indica que no hay contaminación citosólica apreciable en las fracciones nuclear, mitocondrial y microsomal.

Por otro lado, como es esperable, la actividad específica succinato deshidrogenasa está aumentada en la fracción mitocondrial pero se observa una leve contaminación tanto en la fracción nuclear como en la microsomal. Esta última podría explicarse mediante la ruptura de algunas mitocondrias como se menciona anteriormente.

Respecto a la actividad específica peroxidasa, la misma se encuentra aumentada en la fracción microsomal debido a la presencia de peroxisomas en la misma. En el resto de las fracciones esta actividad es imperceptible indicando que en el fraccionamiento de protoescléces no se aprecia ruptura de peroxisomas.

Tabla 2. Actividad específica y factor de purificación de las enzimas marcadoras en las fracciones obtenidas de protoescléces.

<i>Lactato Deshidrogenasa</i>	Act. Enz. (U/ml)	[Prot] (mg/ml)	Act. Esp. (U/mg)	F. Purific.
Homogeneizado	0.0080 ± 0.0016	1.68	0.0048 ± 0.0010	1.00 ± 0.21
F. nuclear	0	0.688	0	0
F. mitocondrial	0	0.943	0	0
F. microsomal	0	1.143	0	0
F. citosólica	0.0169 ± 0.0007	0.871	0.0194 ± 0.0008	4.04 ± 0.17
<i>Succinato Deshidrogenasa</i>	Act. Enz. (U/ml)	[Prot] (mg/ml)	Act. Esp. (U/mg)	F. Purific.
Homogeneizado	0.0089 ± 0.0005	1.68	0.0053 ± 0.0003	1.00 ± 0.06
F. nuclear	0.0005 ± 0.0007	0.688	0.0007 ± 0.0010	0.13 ± 0.19
F. mitocondrial	0.0190 ± 0.0010	0.943	0.0201 ± 0.0011	3.79 ± 0.21
F. microsomal	0.0014 ± 0.0003	1.143	0.0012 ± 0.0003	0.22 ± 0.06
F. citosólica	0	0.871	0	0
<i>Peroxidasa</i>	Act. Enz. (U/ml)	[Prot] (mg/ml)	Act. Esp. (U/mg)	F. Purific.
Homogeneizado	9.7 ± 0.27	1.68	5.77 ± 0.16	1.00 ± 0.03
F. nuclear	0	0.688	0	0
F. mitocondrial	0	0.943	0	0
F. microsomal	12.45 ± 0.34	1.143	10.89 ± 0.30	1.89 ± 0.05
F. citosólica	0	0.871	0	0

Se muestra la actividad enzimática (Act. Enz.), la actividad específica (Act. Esp.) y el factor de purificación (F. Purific.) con la desviación estándar. [Prot]: concentración proteica.

En los casos en los que se observa contaminación, el nivel de ésta es suficientemente bajo como para validar los resultados presentados a posteriori.

4.2.3.2. Microscopía de fluorescencia de la fracción nuclear

La presencia de núcleos en la fracción nuclear es visualizada mediante microscopía de epifluorescencia de la misma luego de ser teñida con DAPI.

En la figura 15 se observa el enriquecimiento en núcleos de la fracción nuclear tanto en el fraccionamiento subcelular células de tetratiridios de *M. vogae* (A) como en el de células de protoescólecas de *E. granulosis* (B).

4.2.3.3. Detección de FABPs mediante SDS-PAGE 1D y *Western Blot*

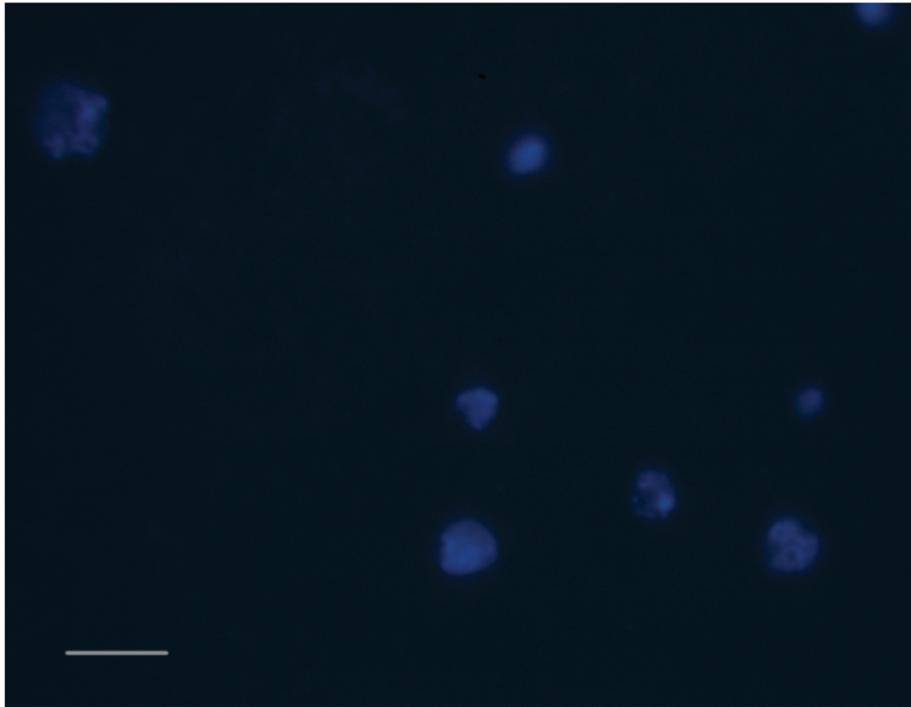
Los extractos proteicos obtenidos de las fracciones subcelulares son sometidos, en una primera instancia, a electroforesis en gel desnaturizante en una dimensión para luego llevar a cabo ensayos de *Western Blot* utilizando el suero anti-rEgFABP1, único suero disponible en esta etapa. Estos estudios se realizan con la finalidad de identificar las fracciones subcelulares en las cuales las FABPs están presentes.

En la figura 16A se aprecia la presencia de una banda de tamaño similar al de las FABPs de *Echinococcus granulosis* en la fracción nuclear, mitocondrial, microsomal y citosólica. En la fracción microsomal la banda marcada presenta un tamaño un poco superior al esperado, probablemente debido a impurezas lipídicas aportadas por el gran contenido de membranas de esta fracción.

Para *Mesocostoides vogae* (figura 16B) el anticuerpo reconoce ya sea una o dos bandas de tamaño similar a las FABPs de este organismo, en las fracciones analizadas.

Estos resultados indican que una o más FABPs de los cestodos *E. granulosis* y *M. vogae* estarían localizadas o asociadas a núcleos, mitocondrias, citosol, retículo endoplásmico y/o golgi y/o lisosomas y/o peroxisomas.

A



B

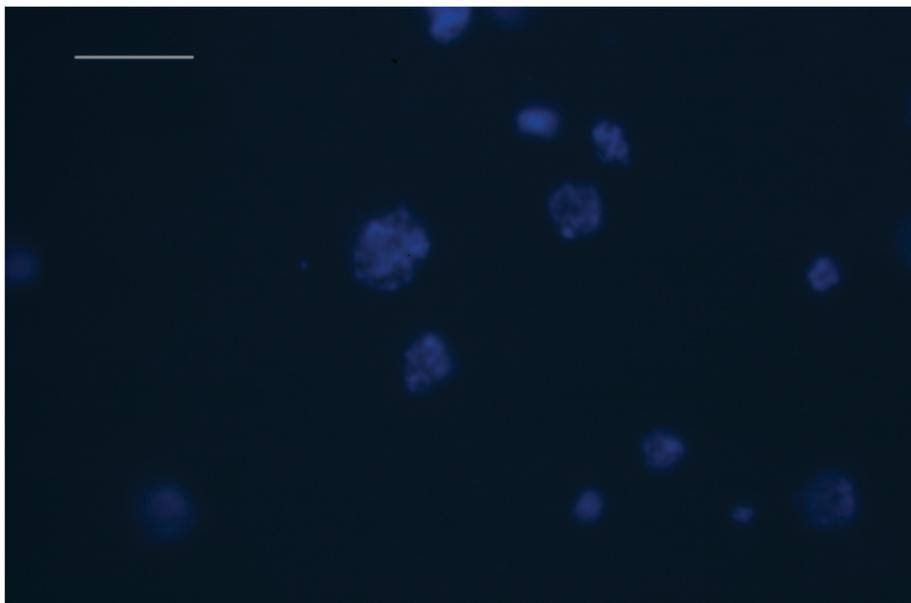


Figura 15. Micrografías de epifluorescencia de las fracciones nucleares obtenidas a partir de tetratridios (A) y de protoescoléces (B). La barra corresponde a 5 micras, el aumento es 100X.

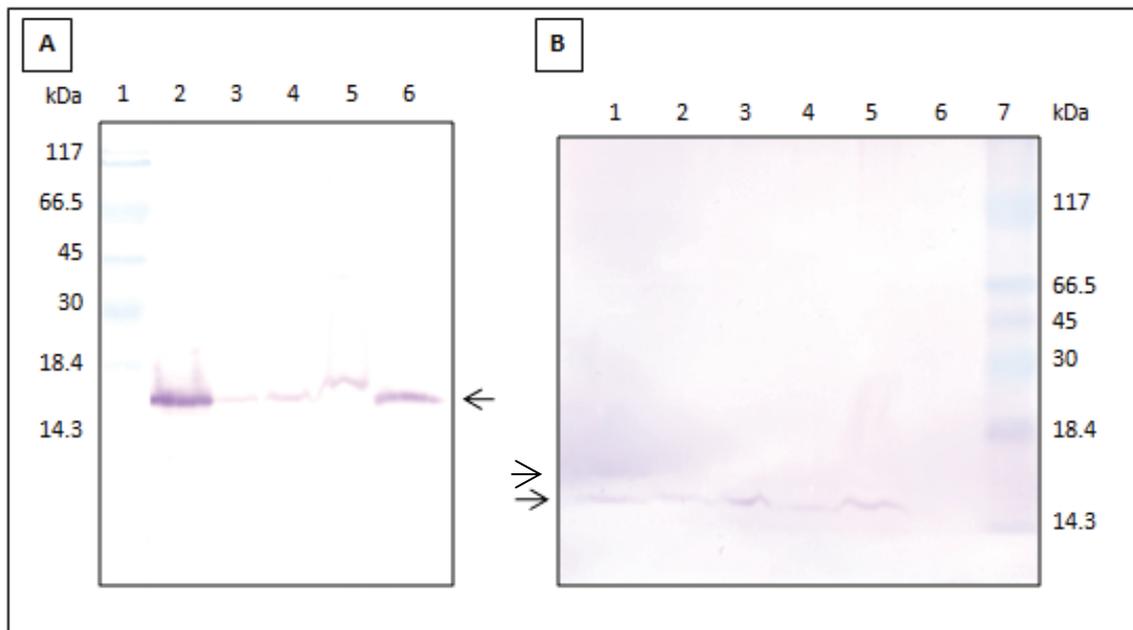


Figura 16. Identificación de EgFABPs (A) y MvFABPs (B) en fracciones subcelulares de protoescólecce y tetratiridios, mediante SDS-PAGE 15%-*Western Blot* utilizando el suero anti-rEgFABP1 purificado diluido 1/1000. A) Fracciones de protoescólecce: 2) homogeneizado total, 3) fracción nuclear, 4) fracción mitocondrial, 5) fracción microsomal, 6) fracción citosólica. B) Fracciones de tetratiridios: 1) fracción citosólica, 2) fracción microsomal, 3) fracción mitocondrial, 4) fracción nuclear, 5) homogeneizado total. En todos los carriles se siembra 30 μ g de extracto proteico de la fracción subcelular correspondiente. A1 y B7: marcador de masa molecular preteñido (Fermentas SM0441).

4.2.3.4. Identificación de FABPs en fracciones subcelulares de protoescólecce

Para identificar cuáles serían las FABPs presentes en las fracciones subcelulares decidimos someter a los extractos provenientes de cada fracción a electroforesis bidimensional. En todos los casos se realizan electroforesis bidimensionales en paralelo, un gel se tiñe con nitrato de plata mientras que el otro es transferido para *Western Blot* (WB). Las proteínas reconocidas por el anticuerpo son localizadas y escindidas en el otro gel para ser analizadas mediante espectrometría de masa MALDI-TOF (MS). En este punto decidimos utilizar el suero anti-rEgFABP1 sin purificar ya que el mismo es específico en el rango de masas moleculares a analizar, y solo seleccionaremos aquellas *spots* del tamaño y punto isoeléctrico (pI) buscado para luego ser identificadas mediante MS. El suero purificado se reserva para ser utilizado a posteriori en los estudios de inmunolocalización.

El suero utilizado en estos experimentos reconoce en la fracción citosólica, nuclear, mitocondrial y microsomal a tres *spots* del tamaño esperado y de punto isoeléctrico de 8 (15 kDa), 7.7 (15 kDa) y 6.5 (15.2 kDa) (Figuras 17, 22 y 24). En la fracción citosólica se repite el ensayo con mayor cantidad de proteínas para así obtener *spots* con concentración suficiente para ser analizada por MS (Figura 17C). Es así que logramos identificar en esta fracción, mediante MS y de manera estadísticamente significativa, a las tres proteínas reconocidas en el WB como EgFABP1, usando base de datos locales y públicas (Figuras 18-20). Asimismo, la proteína de pI 7.7 de la fracción nuclear también pudo ser identificada mediante MS como EgFABP1 (Figuras 22 y 23). Cabe recordar que la masa molecular y el punto isoeléctrico teórico de EgFABP1 y EgFABP2 son 15065.4 Da y 7.7, y 15408.7 Da y 6.37, respectivamente.

En la fracción nuclear, las proteínas de pI 8 y de pI 6.5, si bien fueron marcadas en el WB (flechas verdes en figura 22B), no pudieron ser detectadas en el gel bidimensional revelado con nitrato de plata debido a que se encuentran en baja concentración (Figura 22A). Por tales motivos, se considera que son isoformas de EgFABP1 ya que, además de ser reconocidas por el suero, sus parámetros son idénticos a las *spots* identificadas por MS en la fracción citosólica. En el caso de la fracción mitocondrial y microsomal, la intensidad de las *spots* de los geles 2D revelados con nitrato de plata, es menor que las de las fracciones citosólica y nuclear, y solo podemos visualizar al *spot* correspondiente con la isoforma de pI 7.7 (Figura 24A y C). De forma similar, identificamos a las tres proteínas marcadas en los WBs de estas fracciones como EgFABP1, basándonos en la localización en los geles 2D (pI y masa molecular), así como en las identificaciones previas mediante MS.

Con la finalidad de identificar a la proteína EgFABP2, se somete al análisis mediante MS a seis proteínas de la fracción citosólica (Figura 17C) y a dos de la fracción nuclear (Figura 22A), teniendo en cuenta la masa molecular y el punto isoeléctrico teóricos de dicha proteína. De estas ocho proteínas sólo una perteneciente a la fracción citosólica, de pI y masa molecular de 6.3 y 16.3 kDa aproximadamente, es identificada de manera estadísticamente significativa como una proteína similar a la proteína hipotética de la capa germinativa de *E. multilocularis* "Em_CW_03A07_T7 *Echinococcus multilocularis* germinative layer" (flecha celeste en figura 17C y figura 21). Asimismo, esta proteína es similar a la Cu/Zn superóxido dismutasa citosólica de *Taenia solium* (Q8WRF5), confirmando el enriquecimiento de la fracción citosólica. La

masa molecular nominal de esta proteína hipotética es 17824 Da y el punto isoeléctrico es 6.44. Este resultado surge utilizando las bases de datos EST others. Las proteínas restantes (flechas negras en figura 17C y 22A) no pudieron ser identificadas mediante esta metodología.

En base a estos resultados, podemos confirmar la presencia de tres isoformas de EgFABP1 en la fracción citosólica, nuclear, mitocondrial y microsomal de protoescóceles, las mismas presentan distinto punto isoeléctrico y masa molecular similar. La proteína con pI de 7.7 es la más abundante y debido a su punto isoeléctrico probablemente corresponda a la proteína EgFABP1 sin modificaciones postraduccionales. Las isoformas con pI de 8 y 6.5 podrían poseer alguna modificación que explique la variación del pI y de la masa.

Cabe destacar que las dos señales más importantes del espectro obtenido a partir del *spot* de pI 8 de la fracción citosólica (Figura 19), no se pudieron asignar a ninguna proteína ni en bases de datos locales ni en las públicas, aún cuando se fragmentaron, sugiriéndonos la existencia de modificaciones postraduccionales.

Por otro lado, intentamos identificar sin éxito a EgFABP2 en las regiones analizadas; esto nos sugiere que su expresión es baja o nula en el estadio de protoescóceles.

Lamentablemente, no pudimos repetir los ensayos de la fracción nuclear, mitocondrial y microsomal con mayor cantidad de proteína y así completar la identificación mediante MS, debido a la dificultad en la obtención de protoescóceles.

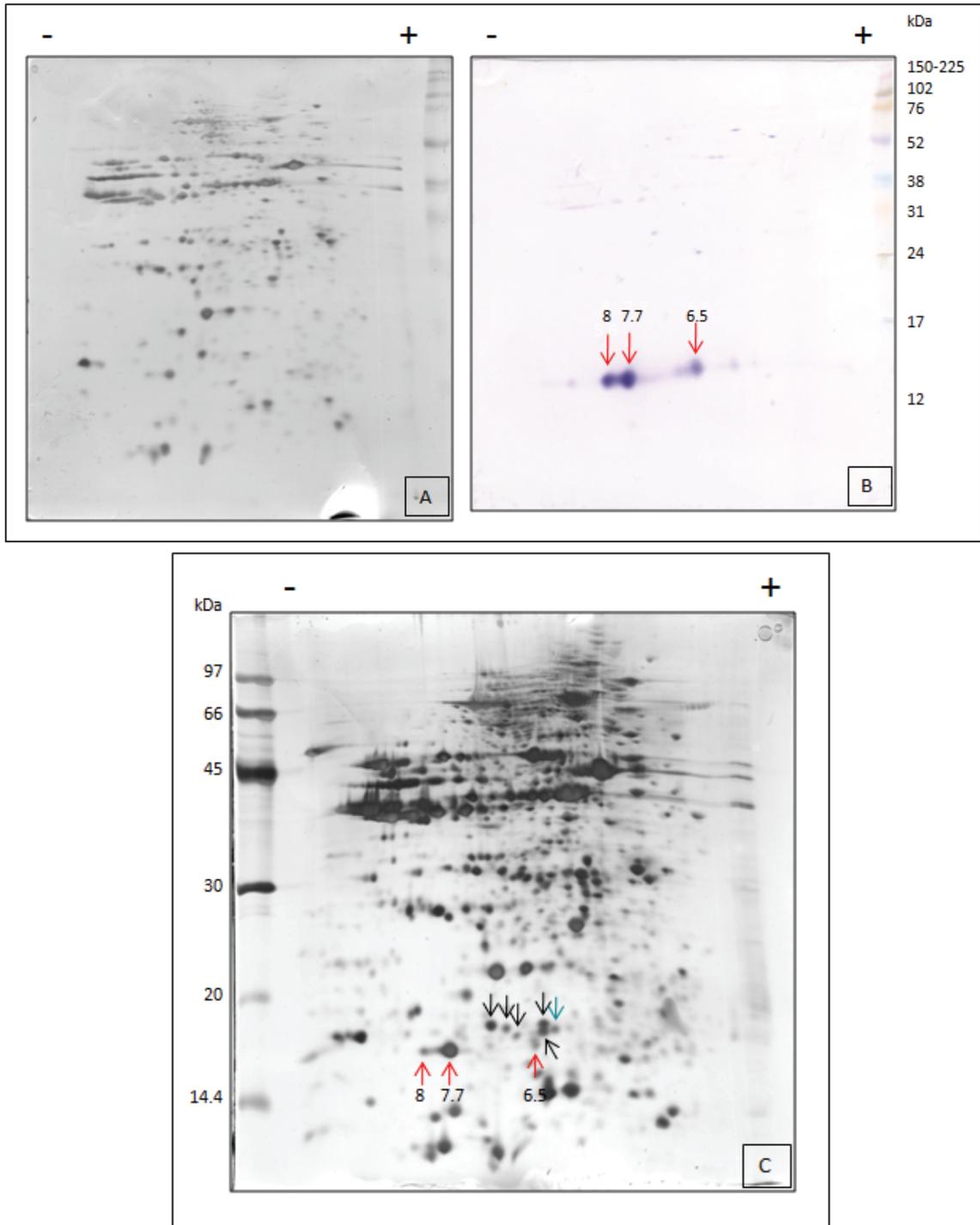
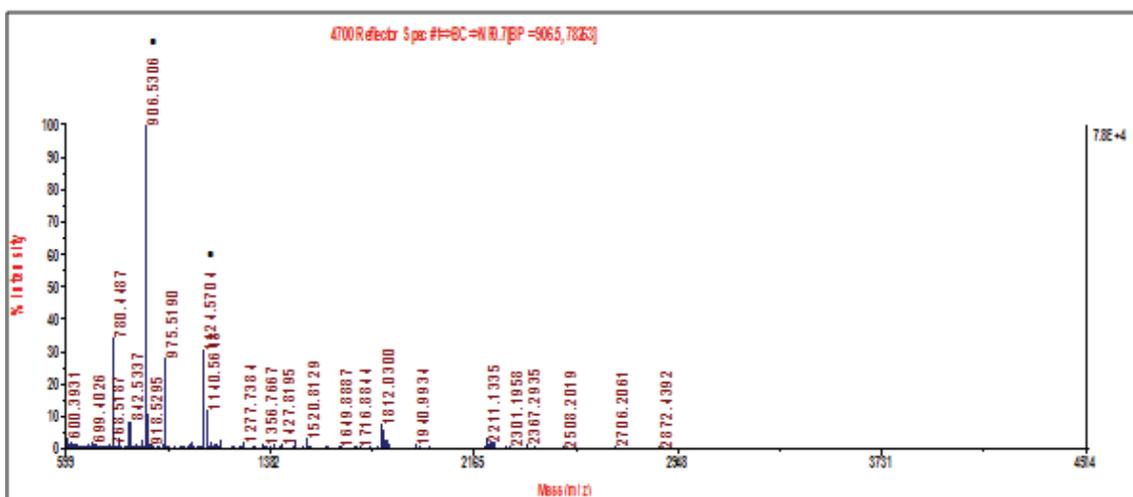


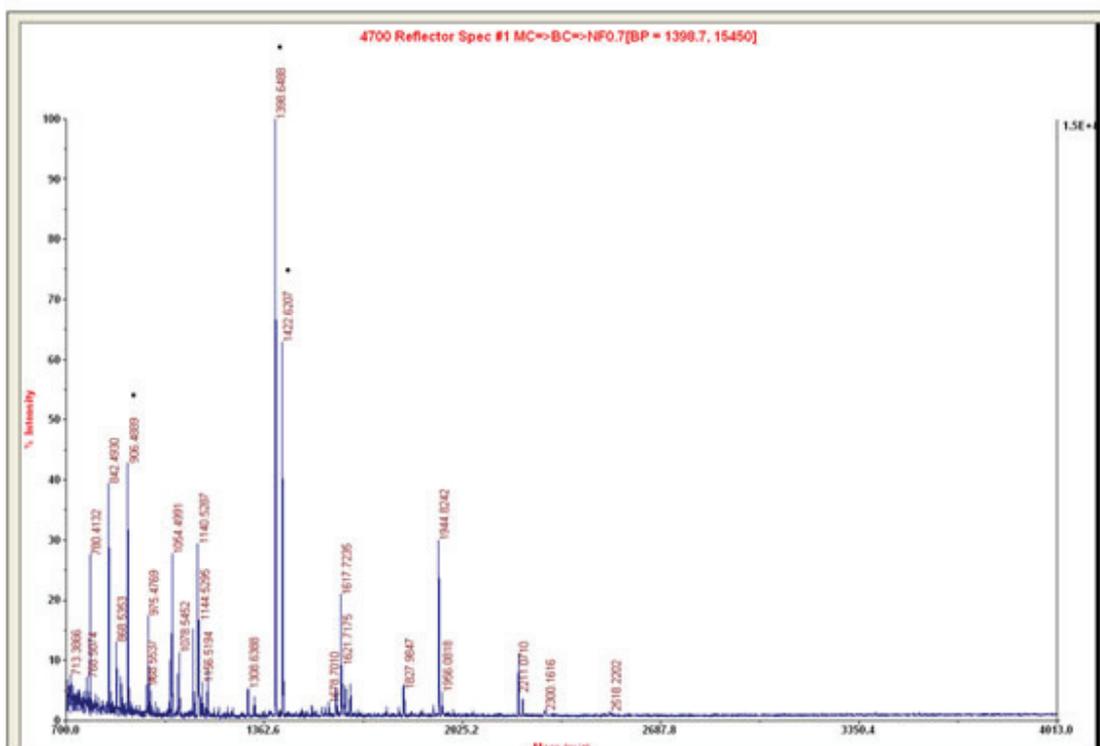
Figura 17. Selección de *spots* para espectrometría de masa de la fracción citosólica de *E. granulosus*, mediante electroforesis 2D y *Western Blot*. A y B) electroforesis en paralelo con 20 μ g de extracto proteico, marcador *Full Range Rainbow Molecular Weight Markers* (Amersham), el gel B es transferido para realizar *Western Blot* utilizando el suero anti-rEgFABP1 sin purificar diluido 1/1000. C) 100 μ g de extracto proteico, marcador *Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS electrophoresis* (Amersham). A y C: revelado con nitrato de plata. Las flechas rojas indican las *spots* identificadas como EgFABP1, las negras proteínas sin identificar y la celeste proteína hipotética de la capa germinativa de *E. multilocularis*. En B y C se indica el punto isoelectrico experimental de las proteínas identificadas como EgFABP1.



Lista de masas de MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

699.4026, 705.3987, 768.5187, 780.4487, 803.4159, 842.5337, 888.4960, 906.5306 ions(70.0713, 72.0883, 86.0974, 112.0905, 120.0888, 129.1147, 157.1064, 158.0893, 171.1092, 175.1163, 201.1154, 219.1344, 247.1347, 259.1324, 261.1404, 263.0950, 270.1712, 272.1130, 276.1552, 339.1945, 340.1882, 348.1639, 358.1866, 362.1547, 367.1654, 375.2175, 385.1824, 391.1791, 419.1717, 433.1881, 439.2144, 463.1893, 484.2556, 486.2348, 487.2325, 490.2350, 504.2586, 518.2373, 522.2770, 532.2529, 586.3063, 602.2621, 603.3065, 619.2791, 620.2708, 631.3074, 637.2984, 647.2668, 696.2943, 714.3658, 719.2952, 732.3894, 736.3684, 749.3090, 750.3605, 758.2903, 776.3727, 793.3765, 842.5624, 844.3577, 847.4775, 861.3124, 862.3330), 918.5295, 975.5190, 1078.5907, 1124.5704 ions(147.1100, 159.1031, 260.1046, 290.0779, 303.1029, 315.1952, 316.1485, 318.0411, 332.1220, 333.1681, 374.1216, 376.1135, 391.2242, 401.1840, 416.2081, 419.2296, 430.2527, 434.2230, 472.2516, 473.2430, 490.2949, 491.2357, 503.1536, 518.2590, 521.1804, 531.2677, 577.1980, 586.2603, 587.2431, 601.2889, 604.3148, 619.3134, 634.2709, 640.0616, 646.2430, 646.6547, 663.2827, 691.2844, 733.4084, 751.3777, 755.3907, 761.3481, 772.4208, 774.3320, 776.2012, 792.3374, 822.4344, 932.4708, 934.3232, 935.3605, 951.4402, 960.3978, 970.4399, 977.3701, 993.4825, 995.4848, 1036.2153, 1037.4484, 1054.4590, 1060.5259, 1062.4684, 1063.4846, 1078.4163, 1106.9723, 1120.3552), 1140.5648, 1156.5607, 1172.5653, 1179.6327, 1193.6073, 1277.7384, 1356.7667, 1398.6920, 1427.8195, 1475.7900, 1519.8265, 1520.8129, 1530.7985, 1536.7927, 1649.8887, 1707.8245, 1716.8844, 1731.8058, 1812.0300, 1828.0237, 1838.9645

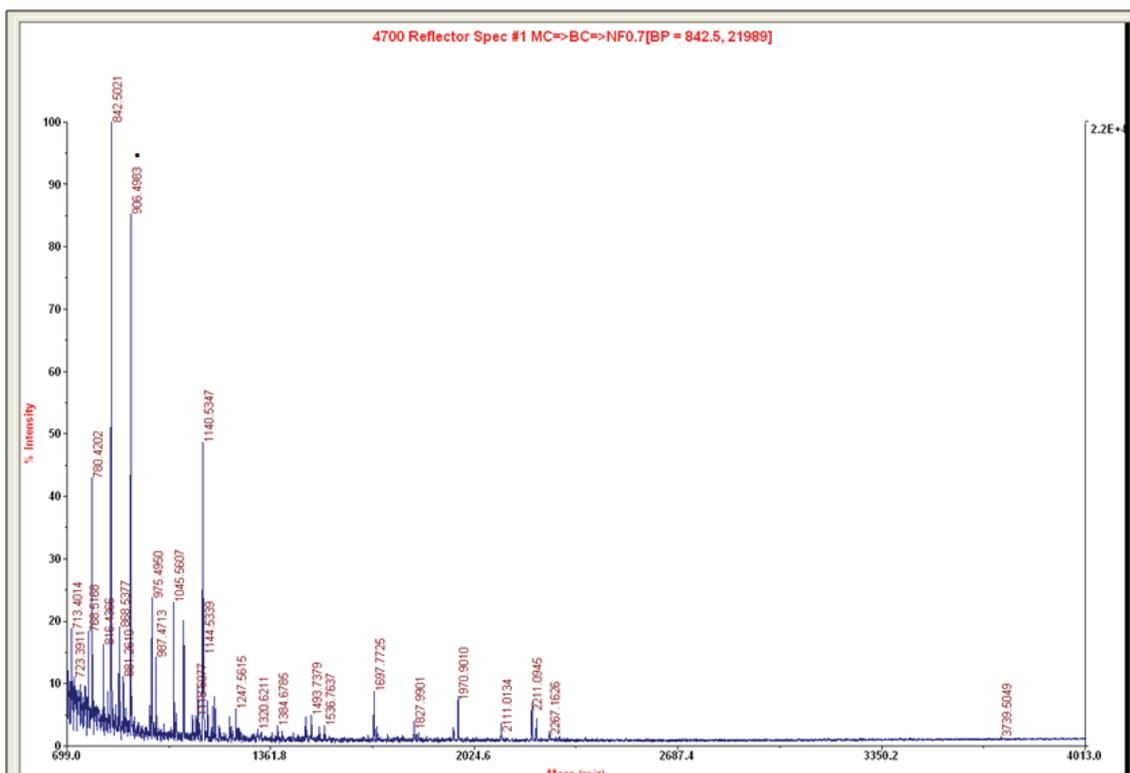
Figura 18. Análisis mediante espectrometría de masa de la proteína de pl 7.7 y 15 kDa aproximadamente, de la fracción citosólica de protoescoleces. En la parte superior de la figura se muestra el espectro de masas obtenido por MALDI-TOF. Se marca con un punto los péptidos elegidos para fragmentación. En la parte inferior se presenta la lista de masas de los péptidos obtenidas experimentalmente.



Lista de masas de MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

713.386597, 768.507446, 780.413208, 868.535339, 906.488892 ions(72.091194, 86.104263, 112.093857, 113.099068, 120.096161, 129.124298, 157.114365, 158.104156, 171.109589, 175.130264, 198.114502, 201.136520, 210.158325, 215.102432, 219.148209, 225.187820, 233.218933, 234.190002, 237.194061, 245.182755, 247.164276, 259.147522, 263.127441, 270.193665, 272.129669, 276.183075, 339.201538, 358.229279, 362.181122, 367.202271, 375.231720, 385.221405, 419.187561, 433.229767, 484.270050, 490.250488, 504.265594, 518.272034, 522.299500, 532.263428, 603.347534, 620.307251, 631.361328, 637.321594, 736.380066, 862.236938), 968.553711, 975.476929, 982.581604, 1054.499146, 1071.518311, 1078.545166, 1124.528198, 1144.529541, 1151.726563, 1156.519409, 1172.516968, 1328.480225, 1398.648804 ions(86.121407, 112.101784, 120.109871, 129.130829, 133.147385, 158.100021, 175.143982, 201.451996, 218.033890, 228.179001, 233.186920, 238.136551, 255.094955, 261.181458, 271.178345, 272.149963, 275.116608, 285.189453, 289.166534, 312.147400, 346.164307, 368.220367, 385.255585, 402.279755, 410.189941, 413.180542, 424.248291, 425.269135, 432.199280, 438.181549, 460.220520, 482.281189, 499.287567, 516.340149, 532.333191, 538.238892, 555.311584, 556.300537, 557.262756, 566.251282, 567.207275, 573.325073, 585.253540, 596.297607, 623.306458, 630.290222, 640.279541, 659.360352, 670.301636, 671.254700, 684.420837, 687.340698, 692.347778, 701.407227, 711.388672, 715.341614, 720.282227, 737.301575, 826.407715, 827.372803, 844.405396, 861.424011, 867.431458, 883.392822, 901.422852, 918.437256, 958.471436, 975.500793, 997.514099, 998.489868, 1110.526855, 1121.562012, 1138.516724, 1251.492920, 1307.608398), 1422.620728 ions(110.072380, 112.086426, 129.123596, 175.127304, 255.126633, 261.176849, 272.144928, 289.173889, 299.089935, 328.109802, 355.112030, 400.185211, 417.211060, 438.134888, 469.154205, 497.200470, 499.346954, 514.227356, 531.259033, 546.308350, 551.258850, 552.188293, 555.198486, 557.153503, 568.257874, 571.228516, 583.188904, 588.301514, 632.214539, 670.299011, 691.265442, 708.304260, 716.321838, 725.313965, 787.358887, 807.392273, 808.756897, 809.505005, 825.211060, 835.361450, 835.660034, 836.329712, 868.307495, 874.541199, 885.342651, 892.330139, 925.355652, 942.395386, 982.387146, 999.408569, 1006.415039, 1106.463379, 1134.470215, 1136.442139, 1145.381470, 1162.437500, 1248.501953, 1264.490112, 1266.461304, 1268.363770, 1313.481689, 1331.460815, 1361.259521), 1578.701050, 1601.727173, 1603.739624, 1617.723511, 1621.717529, 1631.721680, 1633.731079, 1649.713867, 1811.957520, 1827.984741, 1926.817871, 1944.824219, 1956.081787, 2300.161621, 2518.220215

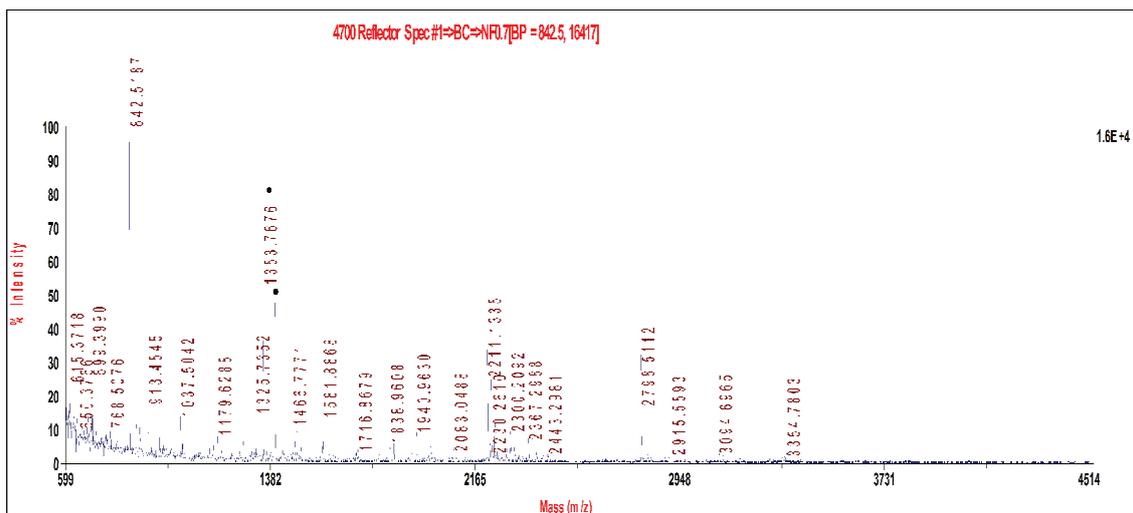
Figura 19. Análisis mediante espectrometría de masa de la proteína de pl 8 y 15 kDa aproximadamente, de la fracción citosólica de protoescoleces. En la parte superior de la figura se muestra el espectro de masas obtenido por MALDI-TOF. Se marca con un punto los péptidos elegidos para fragmentación. En la parte inferior se presenta la lista de masas de los péptidos obtenidas experimentalmente.



- Lista de masas de MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:**
- 768.516846, 780.420166, 832.439392, 868.537659, 881.261047, 906.498291 ions(72.084724, 112.105362, 120.093933, 129.135742, 137.098267, 157.110809, 158.101212, 171.103577, 175.130859, 199.092010, 201.116623, 202.134567, 209.131546, 215.097107, 241.195343, 259.137085, 263.105957, 273.179230, 276.156647, 358.185974, 362.274933, 376.235413, 385.208282, 419.203125, 434.191803, 445.186554, 464.258575, 504.274109, 522.300293, 532.290649, 595.340393, 620.318176, 637.274597, 824.339722, 845.248108), 974.523010, 987.471252, 1078.550903, 1118.607666, 1124.537231, 1144.533936, 1156.534302, 1172.524414, 1227.566284, 1247.561523, 1384.678467, 1473.776367, 1519.761719, 1535.759766, 1697.772461, 1827.990112, 1842.823730, 1957.086670, 1970.901001, 2111.013428, 2267.162598

Figura 20. Análisis mediante espectrometría de masa de la proteína de pl 6.5 y 15.2 kDa aproximadamente, de la fracción citosólica de protoescólec.

En la parte superior de la figura se muestra el espectro de masas obtenido por MALDI-TOF. Se marca con un punto los péptidos elegidos para fragmentación. En la parte inferior se presenta la lista de masas de los péptidos obtenidas experimentalmente.



Lista de masas de MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

699.3990, 713.4163, 768.5076, 913.4545, 1001.5960, 1037.5042, 1165.6082, 1179.6288, 1234.6967, 1264.7341, 1325.7352, 1353.7676 ions(110.0683, 112.0817, 129.1083, 175.1117, 213.1840, 225.1081, 226.0612, 232.1449, 239.1465, 300.1675, 305.1755, 324.0582, 324.2121, 345.2150, 361.2389, 383.1259, 395.2660, 411.1198, 411.2388, 437.1687, 444.2787, 454.5923, 492.1562, 498.1178, 498.2777, 512.2471, 513.2979, 531.3407, 539.2055, 567.2627, 579.2197, 580.3318, 598.2822, 611.2993, 650.3657, 651.3124, 651.4165, 659.0998, 668.3952, 693.4131, 698.2740, 710.4135, 774.2906, 777.3680, 778.5386, 780.5124, 795.4543, 797.6628, 798.3035, 808.5603, 823.4110, 854.4825, 882.4196, 885.3189, 892.5032, 893.4673, 898.8896, 910.4528, 913.6708, 924.4557, 941.5106, 981.5822, 991.5198, 991.7101, 993.2371, 1003.2087, 1003.5367, 1008.0904, 1009.2778, 1009.6028, 1021.8414, 1024.3123, 1054.5894, 1122.6307, 1125.0410, 1141.5435, 1179.6475, 1197.6299, 1213.7380), 1365.6675, 1398.7539 ions(228.0924, 230.0588, 256.1665, 263.1472, 333.1536, 359.0762, 394.1152, 400.1222, 412.0874, 419.1391, 419.2315, 430.2474, 431.2008, 448.1935, 501.1503, 505.2112, 522.2129, 538.2517, 541.1527, 566.2102, 569.2992, 587.2504, 604.2489, 611.1953, 619.2380, 639.2484, 649.2813, 667.3073, 678.2710, 684.2152, 684.4052, 697.2738, 714.3578, 716.1912, 732.3430, 738.3754, 747.3207, 777.3251, 779.0240, 795.3868, 812.3555, 814.2082, 816.3254, 833.3647, 876.3814, 878.9202, 894.3698, 905.3782, 944.7159, 947.5471, 950.6005, 953.4551, 962.3751, 980.4321, 998.4522, 1006.1348, 1042.7343, 1052.4548, 1066.4172, 1067.8136, 1125.5095, 1127.4635, 1128.2699, 1135.5430, 1136.4415, 1143.4933, 1146.6838, 1153.5134, 1224.5038, 1227.8323, 1242.5659, 1244.7490, 1252.5719, 1308.6987), 1427.8019, 1466.7771, 1482.8169, 1498.8014, 1581.8868, 1708.7863, 1716.8679, 1854.9238, 2443.2981, 2798.5112

Figura 21. Análisis mediante espectrometría de masa de la proteína de pl 6.3 y 16.3 kDa aproximadamente, de la fracción citosólica de protoescoleces.

En la parte superior de la figura se muestra el espectro de masas obtenido por MALDI-TOF. Se marca con un punto los péptidos elegidos para fragmentación. En la parte inferior se presenta la lista de masas de los péptidos obtenidas experimentalmente.

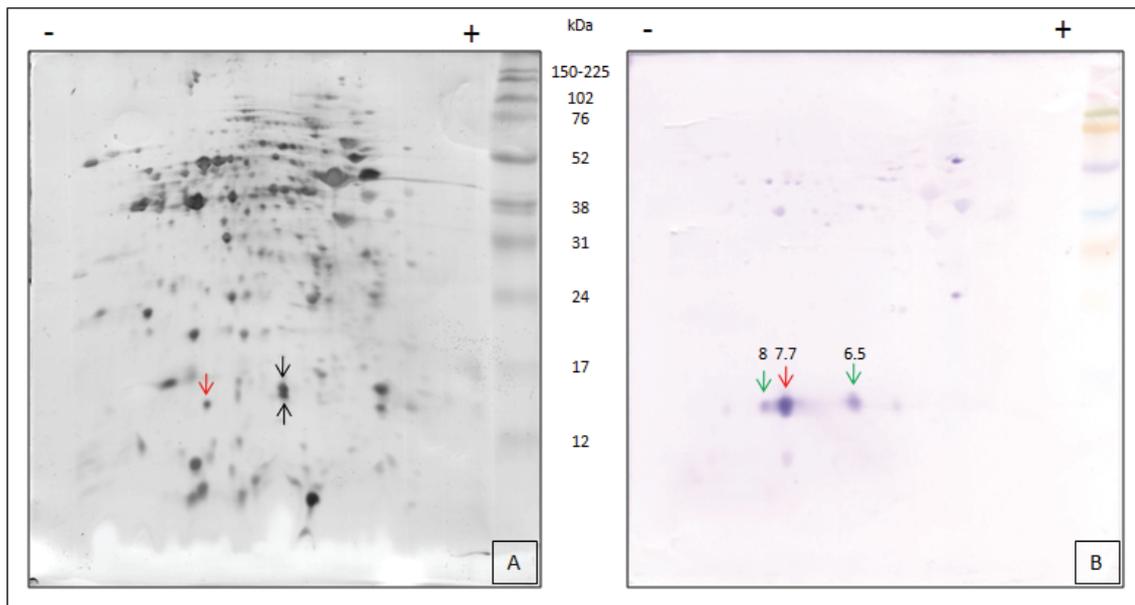


Figura 22. Identificación de FABPs en la fracción nuclear de protoescólecce mediante electroforesis 2D-*Western Blot*. A y B) geles de electroforesis en paralelo con 20 µg de extracto proteico. A: revelado con nitrato de plata, B: *Western Blot* utilizando el suero anti-EgFABP1 sin purificar diluido 1/1000. La flecha roja indica la proteína identificada como EgFABP1 mediante MS, las flechas negras corresponden a proteínas sin identificar y las verdes muestran a las proteínas identificadas como EgFABP1 a partir de su ubicación en el *WB*. En B se indica el punto isoeléctrico de las proteínas marcadas.

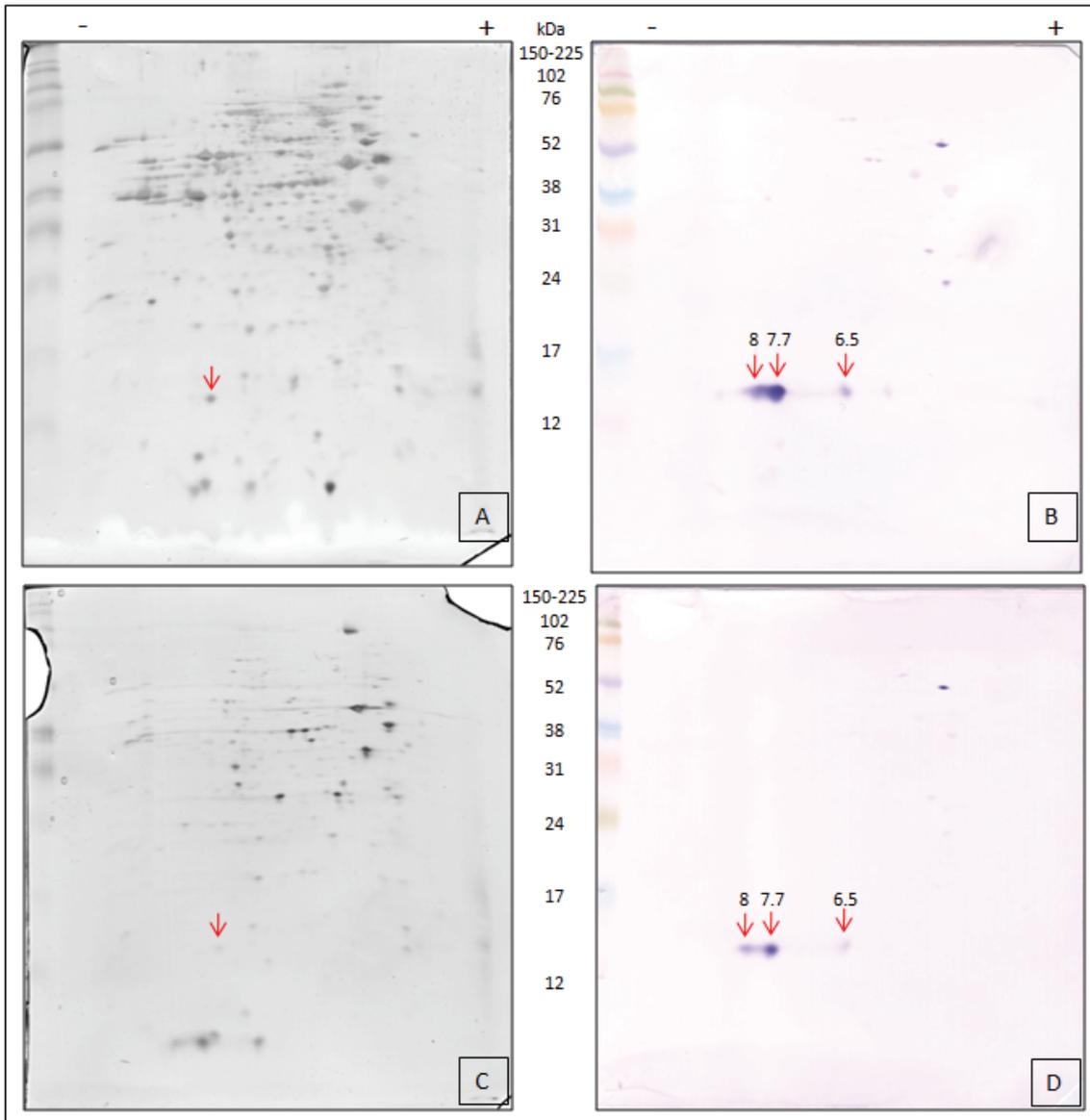


Figura 24. Identificación de FABPs en la fracción mitocondrial (A y B) y microsomal (C y D) de protoescoléces mediante electroforesis 2D-*Western Blot*. A y C: revelado con nitrato de plata, B y D: *Western Blot* utilizando el suero anti-EgFABP1 diluido 1/1000. Las flechas rojas indican las proteínas identificada como EgFABP1. En B y D se indica el punto isoelectrico de las proteínas marcadas.

4.2.3.5. Posibles modificaciones postraduccionales

En un intento de dilucidar las posibles modificaciones postraduccionales de las isoformas de EgFABP1 de pl 6.5 y 8, utilizamos la herramienta bioinformática *FindMod del Swiss Institute of Bioinformatics*. La misma permite comparar los péptidos potencialmente modificados de acuerdo a su masa con los péptidos generados conceptualmente a partir de la secuencia de EgFABP1 (Tabla 3 y 4). El estudio de las modificaciones postraduccionales es un tema muy complejo ya que hasta el momento se han identificado más de 400 modificaciones específicas de proteínas (Farley et Link, 2009).

Los resultados obtenidos en la Tabla 3 y 4 nos muestran una gran batería de posibles modificaciones postraduccionales que restan ser investigadas.

Tabla 3. Péptidos potencialmente modificados de la isoforma de pl 6.5, detectados por diferencia de masas y conforme a las reglas.

Masas exper.	Masas teoríc.	Difer. masas	Masa modif.	Δ masa (Dalton)	Modif. Potenc.	#CA	Péptido	posición	Modificación conocida
974.523	887.4832	87.0398	87.0684	0.029	HYPU	0	VVEGNELK	108-115	
1118.608	1009.5676	109.0404	109.0528	0.012	PYRK	1	TKVTYIER	100-107	
1124.537	1082.5339	42.0031	42.0106	0.007	ACET	0	MEAFGLTWK	1-9	
1124.537	1082.5339	42.0031	42.0470	0.044	TRIMETH	0	MEAFGLTWK	1-9	
1124.537	1082.5339	42.0031	42.0106	0.007	ACET	0	MEAFGLTWK	1-9	(1xTPO)
1124.537	1082.5339	42.0031	42.0470	0.044	TRIMETH	0	MEAFGLTWK	1-9	(1xTPO)
1144.534	1086.4772	58.0568	58.0419	-0.014	TRIMETK	1	MEKSEGF K DK	10-18	(MSO: 10)
1144.534	872.3818	272.1522	272.2504	0.098	GERA	0	TTECSFK	60-66	(Cys_CAM: 63)
1156.534	1098.5288	58.0052	58.0419	0.037	TRIMETK	0	MEAFGLTWK	1-9	(1xMSO)
1156.534	1098.5288	58.0052	58.0419	0.037	TRIMETK	0	MEAFGLTWK	1-9	(1xMSO, 1xTPO)
1156.534	1078.5527	77.9813	77.9105	-0.07	BROM	1	FKEVTPDSR	71-79	
1519.762	1505.7879	13.9741	14.0157	0.042	METH	0	EVASLITVENGV M K	80-93	(MSO: 92)

Se muestra en celeste la modificaciones postraduccionales potenciales de cada péptido y los aminoácidos que probablemente estén afectados. #CA: número de cortes ausentes permitidos. ACET: acetilación en K; BROM: brominación en H, F, o W; GERA: geranilación; HYPU: hipusina en K; METH: metilación; PYRK: pirrolisina; TRIMETH: trimetilación; TRIMETK: N6,N6,N6-trimetil-5-hidroxilisina.

Tabla 4. Péptidos potencialmente modificados de la spot de pl 8.0, detectados por diferencia de masas y conforme a las reglas.

Masas exper.	Masas teoríc.	Difer. masas	Masa modif.	Δmasa (Dalton)	Modif. Potenc.	#CA	Péptido	posición	Modif. conocida
1071.518	1070.4823	1.0357	0.9840	-0.051	FLAC	1	MEKSEGF ^{FLAC} DK	10-18	
1124.528	1082.5339	41.9941	42.0106	0.016	ACET	0	MEAF ^{ACET} LGTWK	1-9	
1124.528	1082.5339	41.9941	42.0470	0.053	TRIMETH	0	MEAF ^{TRIMETH} LGTWK	1-9	
1124.528	1082.5339	41.9941	42.0106	0.016	ACET	0	MEAF ^{ACET} LGTWK	1-9	(1xTPO)
1124.528	1082.5339	41.9941	42.0470	0.053	TRIMETH	0	MEAF ^{TRIMETH} LGTWK	1-9	(1xTPO)
1144.530	1086.4772	58.0528	58.0419	-0.01	TRIMETK	1	MEK ^{TRIMETK} SEGF ^{TRIMETK} DK	10-18	(MSO: 10)
1156.519	1098.5288	57.9902	58.0419	0.052	TRIMETK	0	MEAF ^{TRIMETK} LGTWK	1-9	(1xMSO)
1156.519	1098.5288	57.9902	58.0419	0.052	TRIMETK	0	MEAF ^{TRIMETK} LGTWK	1-9	(1xMSO, 1xTPO)
1156.519	1078.5527	77.9663	77.9105	-0.055	BROM	1	FKEVTPD ^{BROM} SR	71-79	
1328.480	872.3818	456.0982	456.1046	0.006	4FMNC	0	TTEC ^{4FMNC} SFK	60-66	(Cys_CAM: 63)
1328.480	872.3818	456.0982	456.1046	0.006	6FMNC	0	TTEC ^{6FMNC} SFK	60-66	(Cys_CAM: 63)
1398.649	1397.7093	0.9397	0.9840	0.044	CITR	1	VDEVV ^{CITR} CV ^{CITR} RTYSK	120-131	
1603.740	1494.6781	109.0619	109.0528	-0.008	PYRK	1	SESTF ^{PYRK} KTTECSFK	54-66	
1603.740	1374.7409	228.9991	229.0140	0.015	PLP	1	ATV ^{PLP} KVDEVV ^{PLP} CV ^{PLP} R	116-127	(Cys_CAM: 125)
1631.722	1551.6995	80.0225	79.9663	-0.055	PHOS	1	SESTF ^{PHOS} KTTECSFK	54-66	(Cys_CAM: 63)
2300.162	2242.1019	58.0601	58.0419	-0.017	TRIMETK	1	EVASLITV ^{TRIMETK} ENGVM ^{TRIMETK} KHEQDDK	80-99	
2300.162	2258.0968	42.0652	42.0106	-0.054	ACET	1	EVASLITV ^{ACET} ENGVM ^{ACET} KHEQDDK	80-99	(MSO: 92)
2300.162	2258.0968	42.0652	42.0470	-0.017	TRIMETH	1	EVASLITV ^{TRIMETH} ENGVM ^{TRIMETH} KHEQDDK	80-99	(MSO: 92)

Se muestra en celeste la modificaciones postraduccionales potenciales de cada péptido y los aminoácidos que probablemente estén afectados. #CA: número de cortes ausentes permitidos. ACET: acetilación en K; BROM: brominación en H, F, o W; CITR: citrulinación; FLAC: ácido 3-feniláctico, en F; FMNC: conjugación FMN (Cys); GERA: geranilación; HYPV: hipusina en K; METH: metilación; PHOS: fosforilación; PLP: piridoxal fosfato; PYRK: pirrolisina; TRIMETH: trimetilación; TRIMETK: N6,N6,N6-trimetil-5-hidroxilisina.

4.2.3.6. Identificación de FABPs en fracciones subcelulares de tetratiridios

Las fracciones de tetratiridios de *M. vogae* son analizadas aplicando la misma estrategia experimental empleada en el análisis de las fracciones de protoescoléces. Nuestros resultados indican que tanto MvFABPa como MvFABPb están presentes en las fracciones analizadas. En algunos casos se identifican mediante MS mientras que en otros por WB y el perfil electroforético, como se describe a continuación.

Los ensayos de *Western Blot* muestran en la fracción citosólica, nuclear y mitocondrial, el reconocimiento de dos *spots* (Figuras 25, 28 y 30) de pl 5.4 y masa molecular de 13.5 kDa, y pl de 6.8 y masa molecular de 13 kDa. El WB de la fracción microsomal no arroja ningún resultado posiblemente debido a problemas con los reactivos del revelado. Sin embargo, en este ensayo se analizan mediante MS a las *spots* cuyas masas moleculares y puntos isoeléctricos coinciden con el de las proteínas buscadas.

Es así como la proteína de pl 5.4 (flechas amarillas en figura 25 y 28) es identificada mediante MS de manera estadísticamente significativa, como la proteína de unión de ácidos grasos a de *M. vogae* (MvFABPa), en la fracción citosólica, nuclear y microsomal (Figuras 26, 29 y 31). Recordemos que dicha proteína presenta un punto isoeléctrico y una masa molecular teóricos de 5.54 y 14844.0 Da, respectivamente. Asimismo, la proteína de pl de 6.8 (flecha roja en figura 25 y 30) se identifica mediante MS de manera estadísticamente significativa, como la proteína de unión de ácidos grasos b de *M. vogae* (MvFABPb), en la fracción citosólica y microsomal (Figura 27 y 32). MvFABPb tiene un punto isoeléctrico y masa molecular teórico de 6.91 y 14726.8 Da respectivamente. Basándonos en los resultados del WB previamente mencionados y en los parámetros de las proteínas buscadas, así como en las identificaciones previas mediante MS, MvFABPb es identificada en la fracción mitocondrial y nuclear, mientras que MvFABPa es identificada en la fracción mitocondrial.

La marca observada en la membrana del WB correspondiente a la fracción citosólica, de pl 8.8 y masa molecular de 16 kDa aproximadamente, es un daño en la membrana producto de la manipulación de la misma durante el experimento. Igualmente analizamos por MS a la única spot de parámetros similares, detectándose solamente señales correspondientes a tripsina y queratina (flecha negra en figura 25A). Asimismo, se observa una tercera *spot* marcada en el WB de la fracción

mitocondrial (Figura 30B), su identidad no es investigada debido a la presencia de *spots* muy tenues en esa región. La misma podría ser producto de un marcado inespecífico o podría sugerir la presencia de una MvFABP modificada postraduccionalmente como sugerimos que ocurre en *E. granulosus*.

Cabe recordar que las estimaciones de masa molecular a partir del gel de la segunda dimensión son aproximadas debido a que se calculan a través de la comparación con el marcador de masa molecular preteñido. Este tipo de marcador suele presentar una pequeña desviación en las masas moleculares de las bandas proteicas respecto a las reales.

Recopilando los resultados obtenidos hasta el momento, referidos al estudio de la localización subcelular, podemos afirmar que tres isoformas de EgFABP1 son encontradas en la fracción nuclear, mitocondrial, microsomal y citosólica, de protoescoleces; mientras que EgFABP2 no ha sido identificada en las fracciones analizadas. Asimismo, MvFABPa y MvFABPb están localizadas en la fracción citosólica, nuclear, mitocondrial y microsomal de tetratiridios.

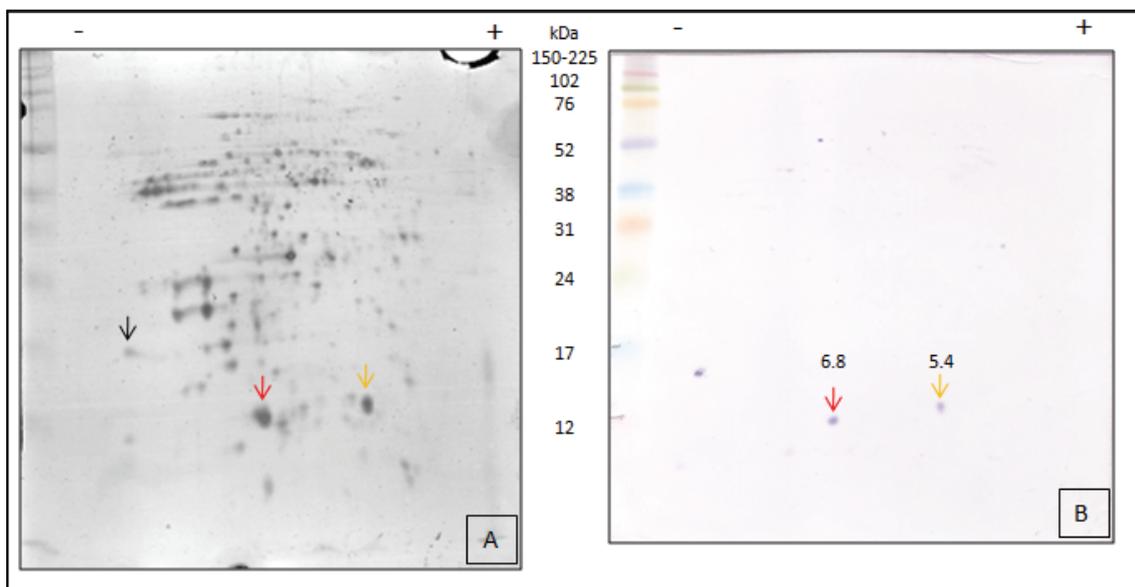
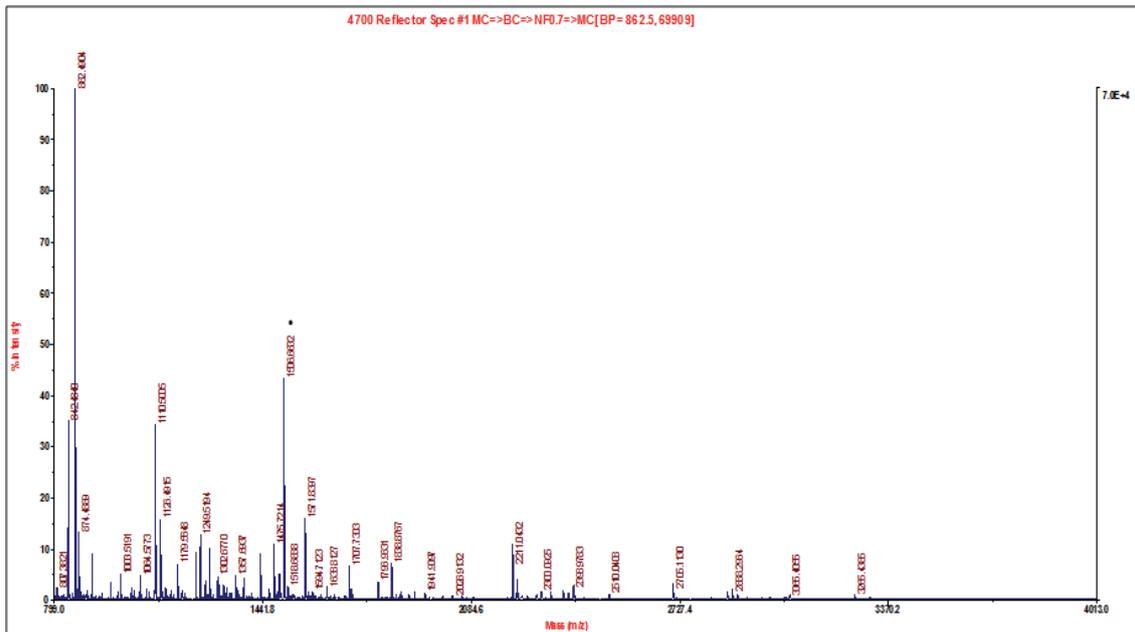


Figura 25. Identificación de FABPs en la fracción citosólica de tetratiridios mediante electroforesis 2D-Western Blot. A y B) gels de electroforesis en paralelo con 20 μ g de extracto proteico. A: revelado con nitrato de plata, B: *Western Blot* utilizando el suero anti-rEgFABP1 sin purificar diluido 1/1000. Las flechas roja y amarilla corresponden a las proteínas identificadas mediante MS como MvFABPb y MvFABPa respectivamente, la flecha negra indica la presencia de péptidos de tripsina y queratina. En B se indica el punto isoeléctrico de las proteínas marcadas.



Lista de masas de MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

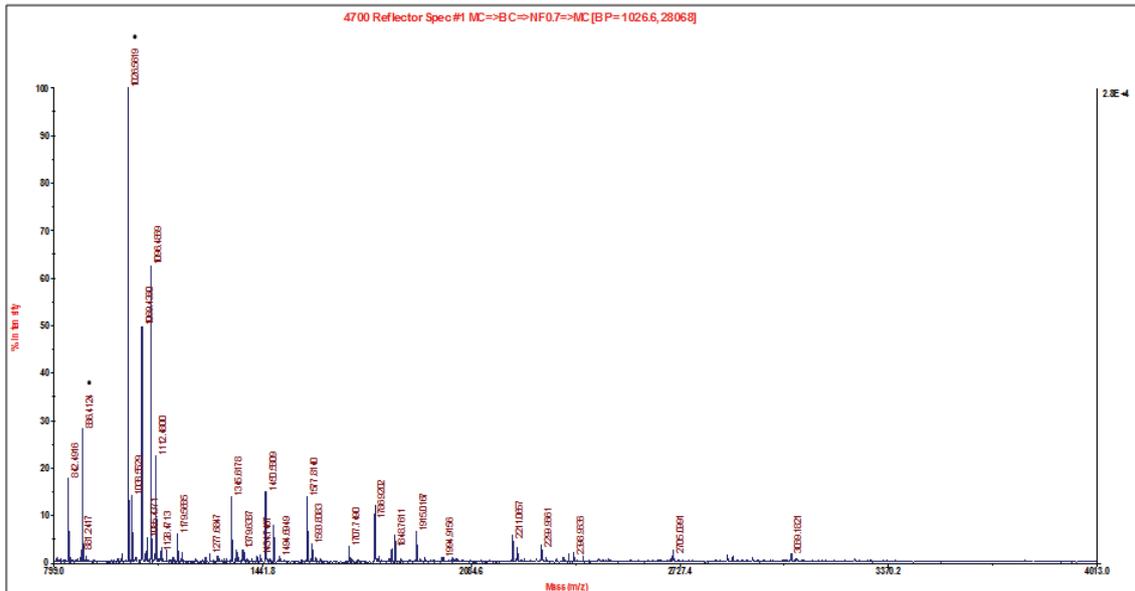
807.3821, 862.4904, 874.4889, 914.3996, 973.5053, 1003.5191, 1037.4944, 1064.5773, 1110.5005, 1126.4915, 1142.4908, 1179.5648, 1234.6422, 1248.6680, 1249.5194, 1263.6578, 1265.5255, 1307.6449, 1323.6357, 1329.6710, 1357.6937, 1379.6826, 1434.7362, 1460.7509, 1475.7214, 1491.7383, 1493.7217

1506.6632 ions(84.0706, 86.0837, 102.0224, 112.0633, 129.0797, 158.0543, 171.0703, 175.0791, 215.0742, 231.0675, 232.0849, 233.7614, 242.0553, 259.0272, 270.0061, 276.1004, 300.0969, 312.0817, 316.0601, 329.0672, 330.0758, 347.0696, 357.0575, 384.0276, 406.1142, 427.0736, 429.0905, 444.1158, 463.0685, 464.1406, 470.0504, 488.1243, 501.1241, 527.1346, 528.0889, 545.1414, 548.1027, 576.1713, 577.1082, 593.1036, 630.1601, 634.1406, 656.1445, 674.1600, 720.1392, 728.2151, 803.1410, 807.2059, 815.1727, 817.2496, 833.1819, 847.2329, 914.1097, 914.5057, 915.2222, 931.2125, 932.1835, 934.3376, 962.2170, 965.3189, 980.1932, 1019.2691, 1035.2124, 1045.2312, 1061.2220, 1063.2351, 1078.2394, 1161.3419, 1207.2797, 1209.4647, 1275.2233, 1332.2047, 1336.3109, 1350.1788, 1378.3833, 1393.2719, 1444.9957, 1445.8665, 1449.7865, 1461.8837)

1518.6888, 1571.8397, 1593.7123, 1638.8127, 1707.7303, 1716.8081, 1796.9631, 1838.8767, 1862.9840, 1867.8607, 1908.7566

Figura 26. Análisis mediante espectrometría de masa de la proteína de pl 5.4 y 13.5 kDa aproximadamente, de la fracción citosólica de tetratiridios.

En la parte superior de la figura se muestra el espectro de masas obtenido por MALDI-TOF. Se marca con un punto el péptido elegido para fragmentación. En la parte inferior se presenta la lista de masas de los péptidos obtenidas experimentalmente.



Lista de masas de MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

881.2417, 886.4124 ions(175.1008, 195.0869, 198.0750, 207.0155, 216.0857, 232.1281, 249.1018, 255.1072, 276.1519, 294.1633, 327.1154, 345.1161, 358.1744, 360.1204, 363.1239, 363.6226, 377.1684, 378.1288, 395.1963, 403.1296, 428.1622, 439.2510, 446.1521, 464.1561, 475.1930, 492.1710, 501.2471, 524.2232, 542.2468, 548.2029, 550.0456, 558.2000, 565.2194, 575.1786, 577.0596, 577.9098, 581.2516, 586.2072, 593.2042, 653.2932, 671.2637, 697.8549, 704.1841, 711.9418, 722.2634, 723.2485, 740.2486, 754.3118, 772.3192, 774.3101, 782.3116, 801.2307, 824.4494, 842.2367, 843.0779, 851.0608)

1026.5619 ions(70.0432, 86.0764, 110.0389, 112.0591, 129.0800, 138.0248, 157.0548, 158.0555, 175.0695, 223.0872, 229.0575, 234.0558, 246.0803, 251.0746, 261.0821, 262.0363, 270.1107, 271.0594, 290.0635, 308.0808, 342.1063, 357.1135, 359.1303, 361.0760, 375.0900, 379.1156, 382.0437, 384.0924, 390.0888, 407.1096, 418.0799, 424.1302, 486.1176, 489.1327, 490.1137, 503.1438, 504.0884, 506.1399, 521.1107, 531.1189, 586.1054, 603.1300, 620.1440, 621.1226, 630.1219, 640.1630, 642.9391, 651.1100, 668.1378, 716.1463, 719.1812, 735.1761, 742.1025, 753.2200, 755.9772, 759.1570, 776.1722, 781.2048, 789.0718, 824.1658, 826.9482, 852.1798, 854.0800, 854.9779, 869.1951, 869.3525, 870.1824, 889.2170, 967.1000, 984.0049, 990.9203, 1008.6237, 1008.9313)

1038.5529, 1069.4360, 1078.4913, 1081.4702, 1085.4371, 1096.4869, 1112.4800, 1128.4713, 1144.4908, 1179.5685, 1193.5905, 1277.6847, 1345.6178, 1361.6078, 1379.6387, 1383.6484, 1421.7150, 1434.7467, 1450.5809, 1475.7224, 1494.6949, 1577.8140, 1591.7681, 1593.8083, 1707.7490, 1786.9202, 1798.9556, 1838.8911, 1848.7611, 1915.0167

Figura 27. Análisis mediante espectrometría de masa de la proteína de pl 6.8 y 13 kDa aproximadamente, de la fracción citosólica de tetratiridios.

En la parte superior de la figura se muestra el espectro de masas obtenido por MALDI-TOF. Se marca con un punto el péptido elegido para fragmentación. En la parte inferior se presenta la lista de masas de los péptidos obtenidas experimentalmente.

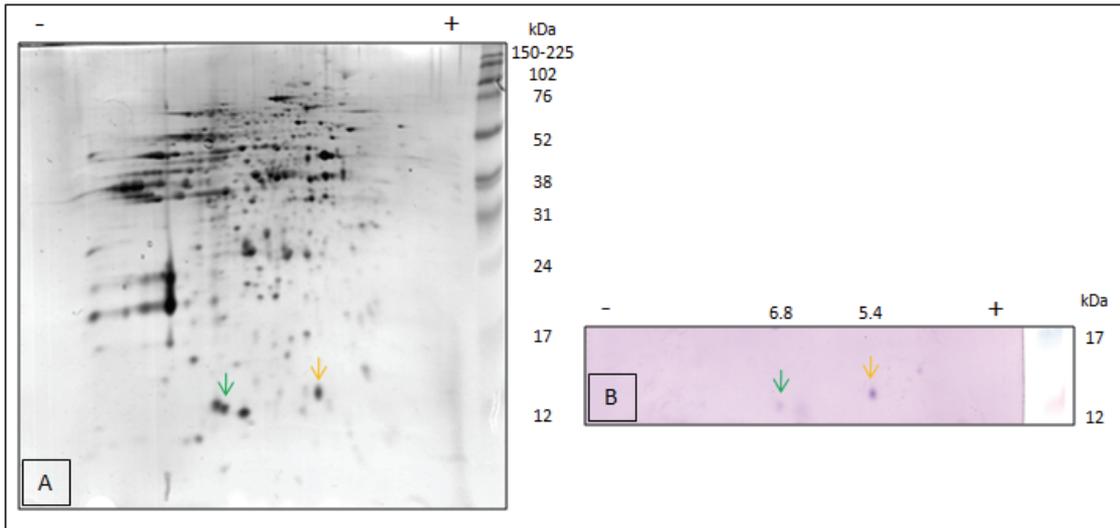
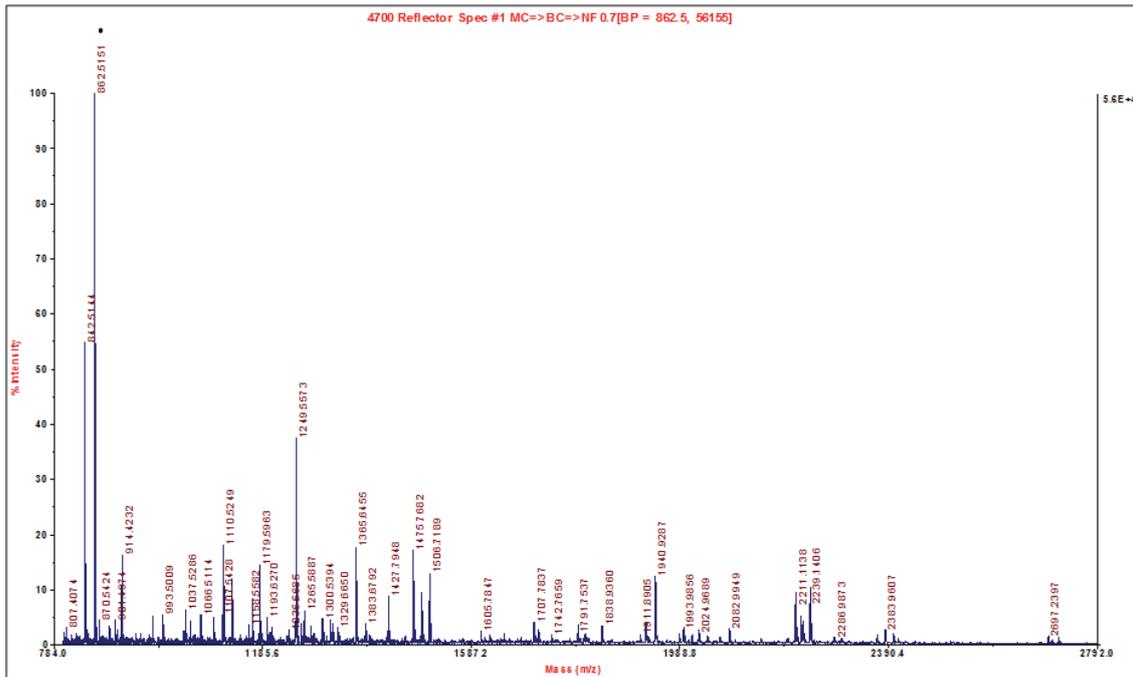


Figura 28. Identificación de FABPs en la fracción nuclear de tetratiridios mediante electroforesis 2D-*Western Blot*. A y B) imágenes de geles de electroforesis realizadas en paralelo con 20 µg de extracto proteico. A: revelado con nitrato de plata, B: *Western Blot* utilizando el suero anti-rEgFABP1 sin purificar diluido 1/1000. La flecha amarilla señala a la proteína identificada mediante MS como MvFABPa. La flecha verde correspondería a la proteína reconocida como MvFABPb debido a su ubicación. En B se indica el punto isoelectrico de las proteínas marcadas.



Lista de masas de MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

862.5151 ions(70.0879, 72.1040, 86.1204, 112.1135, 120.1061, 129.1377, 133.1270, 157.1375, 158.1172, 171.1387, 175.1466, 205.1199, 214.1504, 215.1706, 216.1552, 259.1701, 261.1905, 270.2135, 276.1980, 304.1960, 318.2164, 327.2380, 333.2327, 361.2304, 372.2620, 375.2451, 389.2846, 419.2736, 429.3032, 446.3226, 449.1386, 474.3253, 488.3351, 519.3497, 536.3595, 541.4047, 542.3885, 558.3928, 559.4187, 575.3641, 576.3664, 587.4138, 593.3953, 670.4940, 675.4537, 688.4809, 692.4528, 732.4657, 749.5097, 801.5442, 818.4488, 820.4616)

890.4578, 901.4974, 905.4759, 914.4232, 973.5241, 993.5009, 1037.5286, 1045.5709, 1066.5114, 1090.5470, 1107.5428, 1109.5177, 1110.5249, 1126.5443, 1158.5582, 1165.5941, 1179.5963, 1193.6270, 1202.6014, 1235.5685, 1249.5573, 1259.6591, 1265.5887, 1277.7035, 1300.5394, 1302.6318, 1316.7355, 1320.6080, 1329.6650, 1365.6455, 1383.6792, 1425.7388, 1427.7948, 1475.7682, 1491.7808, 1506.7189, 1605.7847, 1707.7837, 1709.7499, 1716.8429, 1742.7659, 1791.7537, 1805.9594, 1838.9360, 1911.8905, 1922.9397, 1940.9287, 1987.0892, 1993.9856, 1996.9976, 2011.9407, 2024.9689, 2042.0242, 2066.0208, 2082.9949, 2211.1138, 2221.1414, 2225.1204, 2239.1406, 2285.1665, 2286.9873, 2298.1897, 2367.2566, 2383.9607, 2399.0264, 2402.1433, 2409.0823, 2697.2397, 2705.1487, 2718.0530

Figura 29. Análisis mediante espectrometría de masa de la proteína de pl 5.4 y 13.5 kDa aproximadamente, de la fracción nuclear de tetratiridios.

En la parte superior de la figura se muestra el espectro de masas obtenido por MALDI-TOF. Se marca con un punto el péptido elegido para fragmentación. En la parte inferior se presenta la lista de masas de los péptidos obtenidas experimentalmente.

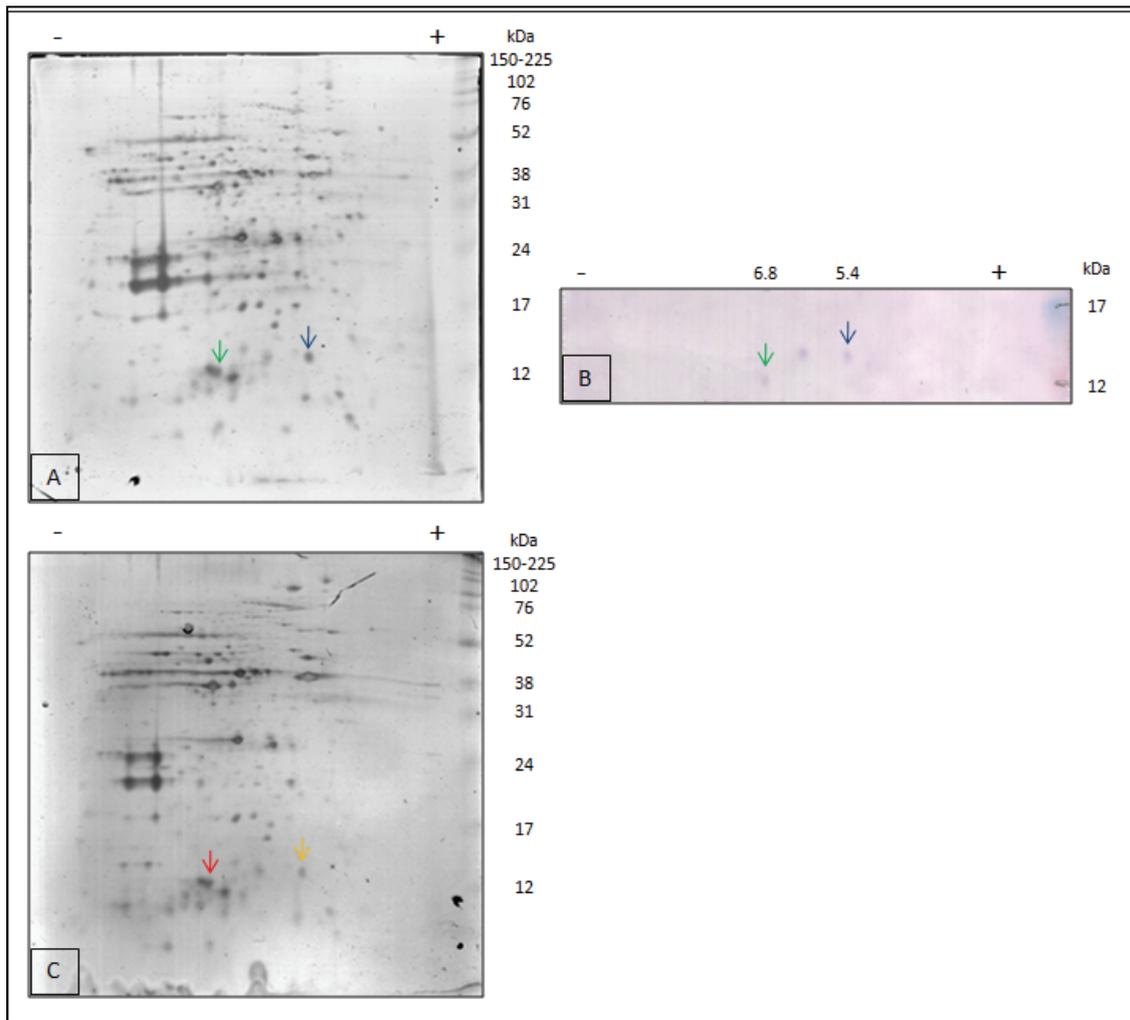
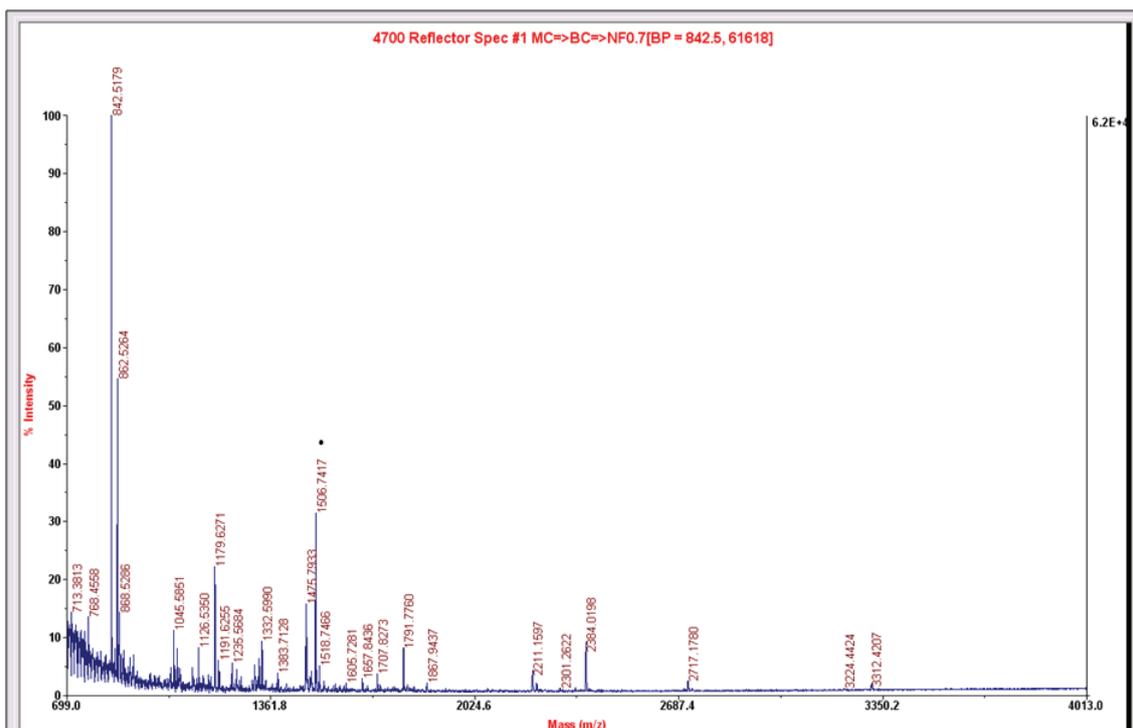


Figura 30. Identificación de FABPs en la fracción mitocondrial (A y B) y microsomal (C) de tetratridos mediante electroforesis 2D-*Western Blot*. A y C: revelado con nitrato de plata, B: *Western Blot* utilizando el suero anti-rEgFABP1 diluido 1/1000. Las flechas azules y la amarilla indican las proteínas identificada como MvFABPa, mientras que las verdes y la roja señalan a MvFABPb. En B se indica el punto isoeléctrico de las proteínas marcadas.



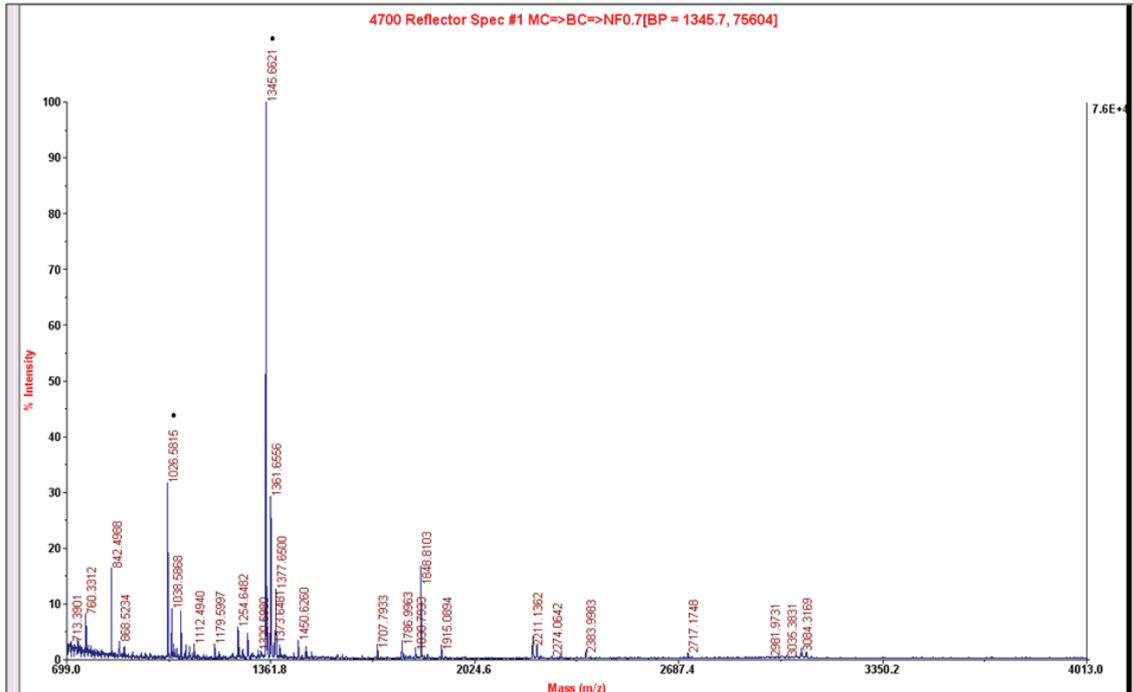
Lista de masas de MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

713.381348, 768.455811, 862.526367, 868.528564, 1057.569336, 1191.625488, 1194.625366, 1249.570313, 1323.684692, 1332.598999, 1346.651733, 1479.787109, 1488.755005, 1493.776489

1506.741699 ions(175.135513, 232.165039, 312.184174, 338.166901, 357.132874, 428.360138, 429.173370, 444.285706, 464.341003, 465.319702, 527.275513, 545.320129, 548.351379, 567.363342, 576.553528, 674.320007, 684.359558, 689.078857, 780.455688, 803.395386, 814.288086, 827.003113, 833.519470, 834.485107, 838.573914, 903.468140, 931.612610, 948.502625, 964.355469, 1046.783447, 1063.583496, 1065.581665, 1078.526855, 1079.509399, 1102.032227, 1207.628540, 1232.772339, 1275.536499, 1275.929810, 1311.216797, 1312.567017, 1317.745361, 1352.692627, 1360.575439, 1371.699951, 1373.624023, 1375.502197, 1446.230347, 1449.105591, 1463.323730, 1497.696289)

1518.746582, 1534.763306, 1571.907471, 1605.728149, 1657.843628, 1825.962158, 1867.943726, 2301.262207, 2351.128174, 2384.019775, 2396.068848, 2717.177979, 3223.442383

Figura 31. Análisis mediante espectrometría de masa de la proteína de pl 5.4 y 13.5 kDa aproximadamente, de la fracción microsomal de tetratiridios. En la parte superior de la figura se muestra el espectro de masas obtenido por MALDI-TOF. Se marca con un punto el péptido elegido para fragmentación. En la parte inferior se presenta la lista de masas de los péptidos obtenidas experimentalmente.



Lista de masas de MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

734.317688, 760.331238, 868.523438, 886.440186, 1026.581543 ions(102.104744, 110.087723, 112.099586, 129.104996, 156.062622, 158.088074, 175.134689, 187.105530, 202.144897, 216.135727, 219.153519, 223.168411, 225.812912, 235.196487, 246.150665, 251.215668, 256.214722, 262.152771, 271.117889, 308.196320, 325.203461, 340.231781, 341.270905, 353.156891, 359.271362, 368.152039, 375.231567, 379.250580, 390.253784, 398.270172, 407.246002, 418.239136, 422.208740, 424.211884, 448.212158, 464.424164, 485.276184, 486.278748, 488.136627, 493.219757, 506.301666, 521.316223, 531.326111, 532.259460, 543.318970, 572.362976, 575.331055, 603.298706, 605.380371, 616.308044, 617.182556, 620.333252, 621.337585, 637.352661, 640.317078, 641.398438, 645.513794, 668.351563, 669.477417, 719.543701, 776.461670, 781.510986, 807.374878, 852.487854, 950.527222, 984.220276), 1038.586792, 1051.664307, 1057.547607, 1069.467163, 1085.441528, 1096.502197, 1112.494019, 1254.648193, 1258.647095, 1269.640137, 1286.657471, 1328.712891, 1345.662109 ions(10.660108, 42.483948, 68.073845, 69.923332, 70.076736, 70.633202, 72.152916, 75.317558, 86.102097, 101.880913, 110.110497, 111.096260, 112.084435, 129.135773, 154.048447, 156.078552, 156.923706, 157.063507, 159.093201, 175.133820, 193.145950, 216.219330, 228.121735, 232.182343, 241.438202, 256.149628, 257.171051, 259.523468, 298.136139, 314.244598, 324.199219, 331.213654, 401.163879, 411.256897, 444.304657, 447.336395, 480.340393, 482.203766, 501.381104, 510.279938, 513.264099, 577.321350, 579.294556, 585.346863, 587.298767, 597.267700, 604.369385, 714.342163, 717.205078, 724.383240, 740.323364, 741.413391, 742.383728, 902.402222, 910.500061, 925.440247, 927.468750, 987.473267, 1010.534119, 1015.457764, 1108.603394, 1114.658691, 1125.546875, 1171.565552, 1182.605225, 1189.524292, 1191.566528, 1254.546265, 1286.412842, 1301.272461, 1303.152588), 1361.655640, 1375.659668, 1377.650024, 1389.658447, 1391.637207, 1450.625977, 1493.736816, 1786.996338, 1830.793335, 1848.810303, 1860.864258, 1869.825806, 1915.089355, 2274.064209, 2301.128418, 2717.174805, 2730.178467, 3035.383057, 3068.336426, 3084.316895, 3100.329102

Figura 32. Análisis mediante espectrometría de masa de la proteína de pl 6.8 y 13 kDa aproximadamente, de la fracción microsomal de tetratiridios. En la parte superior de la figura se muestra el espectro de masas obtenido por MALDI-TOF. Se marca con un punto el péptido elegido para fragmentación. En la parte inferior se presenta la lista de masas de los péptidos obtenidas experimentalmente.

4.2.4. Localización subcelular con anticuerpos específicos

En esta etapa buscamos realizar un estudio más profundo y detallado de la localización subcelular de las MvFABPs. Si bien los resultados de las electroforesis 2D son contundentes, buscamos determinar si existe una distribución diferencial dentro de cada compartimento estudiado. Asimismo, nos interesa discriminar el aparato de Golgi del resto de los componentes de la fracción microsomal. Para ello utilizamos secciones de tetratiridios, anticuerpos específicos de cada proteína y marcadores subcelulares.

Es así que clonamos las regiones codificantes completas de ambas y expresamos y purificamos las proteínas recombinantes respectivas sin ningún tipo de etiquetado, para generar sueros policlonales en conejos contra rMvFABPa y rMvFABPb. Posteriormente, estos sueros fueron purificados por cromatografía de afinidad y la especificidad de los mismos es verificada por *WB*.

4.2.4.1. Generación de MvFABPa y MvFABPb recombinantes

Con la finalidad de obtener a las proteínas rMvFABPa y rMvFABPb desde el extremo N-terminal, en primer lugar realizamos reacciones de RT-PCR. La figura 33 muestra los productos esperados de 400 pb aproximadamente. Los mismos son clonados en el vector pJET1.2 y secuenciados, para ser luego subclonados en el vector de expresión pET5a. Los plásmidos recombinantes seleccionados son utilizados para transformar bacterias *E.coli* BL21 Star. Las secuencias actualizadas se encuentran indexadas en el GenBank (MvFABPa: EF488511.3, MvFABPb: EF488510.3).

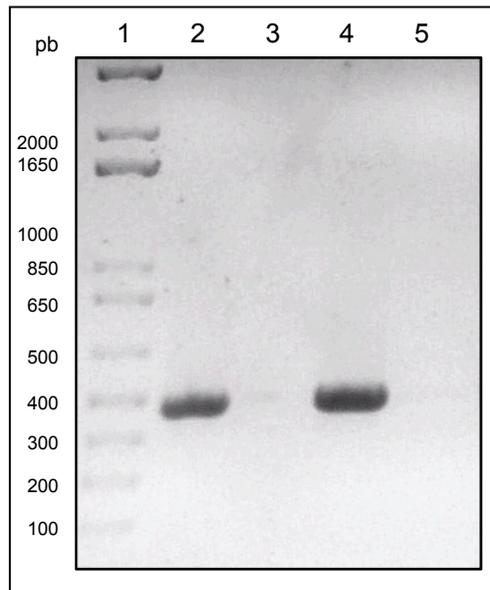


Figura 33. Amplificación de ADNc de MvFABPa y MvFABPb, visualizada mediante electroforesis en agarosa 2% teñido con bromuro de etidio. 1) Marcador de peso molecular *1kb plus DNA ladder* (Invitrogen); 2) producto de PCR de MvFABPa; 3) control negativo de PCR de MvFABPa; 4) producto de PCR de MvFABPb; 5) control negativo de PCR de MvFABPb.

Continuamos estudiando la expresión de las proteínas MvFABPa y MvFABPb recombinantes (Figura 34). A pesar que los niveles de inducción no son altos, al comparar las fracciones insolubles con las solubles observamos que éstas últimas se encuentran enriquecidas en las proteínas recombinantes respectivas (Figura 34). Es notorio que los carriles con extracto proteico no inducido (2 y 4) presentan mayor cantidad de proteína total que los carriles correspondientes inducidos (3 y 5), esto podría explicar porque no se aprecia una inducción clara. También podría estar ocurriendo una inducción basal fuerte que podría ser disminuida agregando glucosa a los medios de cultivos.

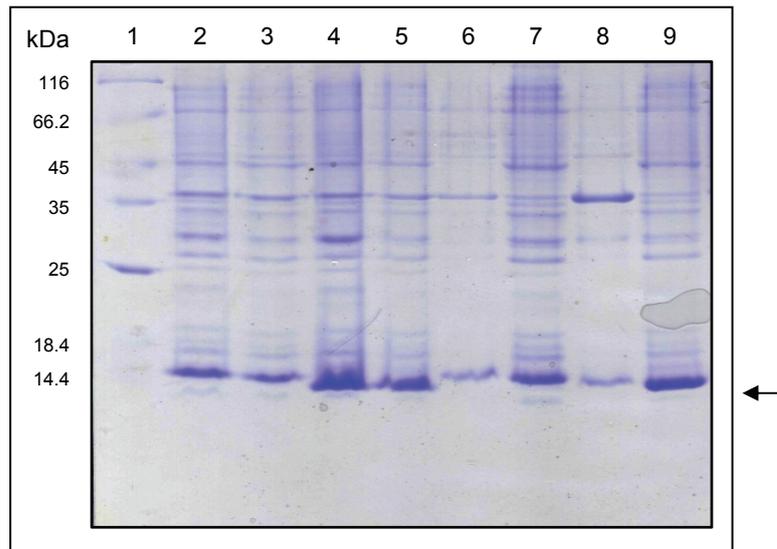


Figura 34. Inducción de MvFABPa y MvFABPb recombinantes, visualizada mediante SDS-PAGE 15% y tinción con *Coomassie brilliant blue R*. 1) Marcador de peso molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas); 2) BL21-pET-MvFABPa no inducido; 3) BL21-pET-MvFABPa inducido; 4) BL21-pET-MvFABPb no inducido; 5) BL21-pET-MvFABPb inducido; 6) fracción insoluble de BL21-pET-MvFABPa inducido; 7) fracción soluble de BL21-pET-MvFABPa inducido; 8) fracción insoluble BL21-pET-MvFABPb inducido; 9) fracción soluble de BL21-pET-MvFABPb inducido. La flecha indica las proteínas recombinantes.

Las proteínas recombinantes MvFABPa y MvFABPb son purificadas mediante cromatografía de gel filtración y de intercambio iónico. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 35.

Observamos que si bien estas proteínas presentan una masa molecular similar y las condiciones de los experimentos son idénticas, el perfil del cromatograma es distinto (Figura 35). rMvFABPa presenta un claro pico comprendido entre los 77 y 90 ml aproximadamente, que corresponde a la elución de la proteína recombinante. En cambio el cromatograma de rMvFABPb muestra una disminución constante de la absorbancia en este rango, con la excepción de la región próxima a los 90 ml, donde se enlentece la misma.

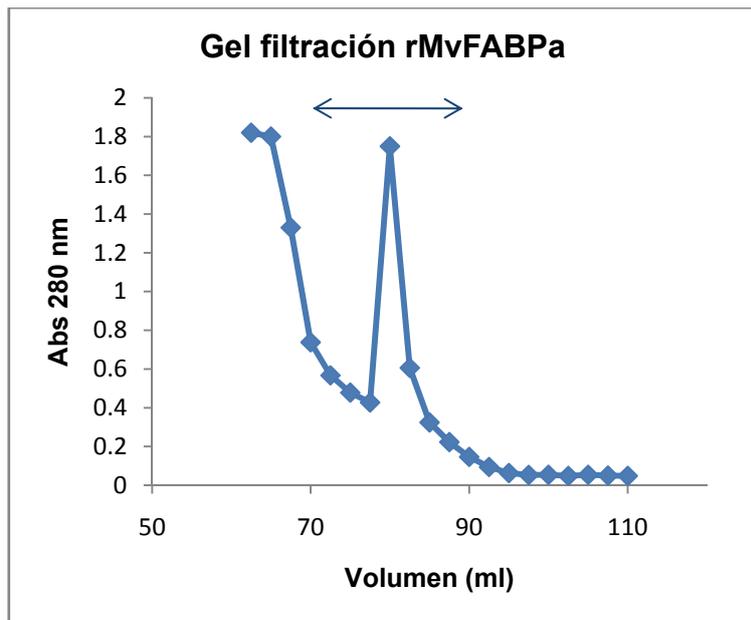
A posteriori, las muestras colectadas son sometidas a electroforesis SDS-PAGE para evaluar la presencia de la proteína recombinantes y su grado de pureza (Figura 36). En base a la figura 36, colectamos las fracciones de la cromatografía de gel filtración de MvFABPa comprendidas entre el tubo 3 al 15 (volumen: 67-97 ml),

dichas fracciones presentan una gran cantidad de proteína del tamaño esperado y en menor proporción algunas proteínas contaminantes. De la misma manera colectamos las fracciones de la cromatografía de rMvFABPb desde el tubo 1 al 16 (volumen: 62.5-100 ml), las mismas presentan un menor grado de proteínas contaminantes que las fracciones de rMvFABPa.

Continuando con las purificaciones sometimos las muestras colectadas a cromatografía de intercambio iónico con un intercambiador aniónico (Figura 37). En la cromatografía de intercambio iónico de rMvFABPa (figura 37A) se observa que dicha proteína eluye con 20 mM de NaCl, y al principio de la elución con 40 mM de NaCl. Mientras que en el resto de los tubos con 40 mM, y con 100 mM de NaCl, coeluye con una proteína de mayor peso molecular. Esta proteína de 29 kDa aproximadamente podría corresponder a la beta-lactamasa ya que es usual que se induzca en estos sistemas de expresión. Nos llama la atención que rMvFABPa eluya con distintas concentraciones de sales. Este hecho nos lleva a pensar en la posibilidad que exista más de una población de proteínas recombinantes que adoptan distinto plegamiento, exponiendo distintos residuos aminoacídicos que les otorgan distintas propiedades de unión a la matriz positiva. En base a estos resultados colectamos los 9 tubos de la elución con 20 mM de NaCl y los primeros 5 tubos de la elución con 40 mM de NaCl en donde no se observa la proteína de mayor tamaño.

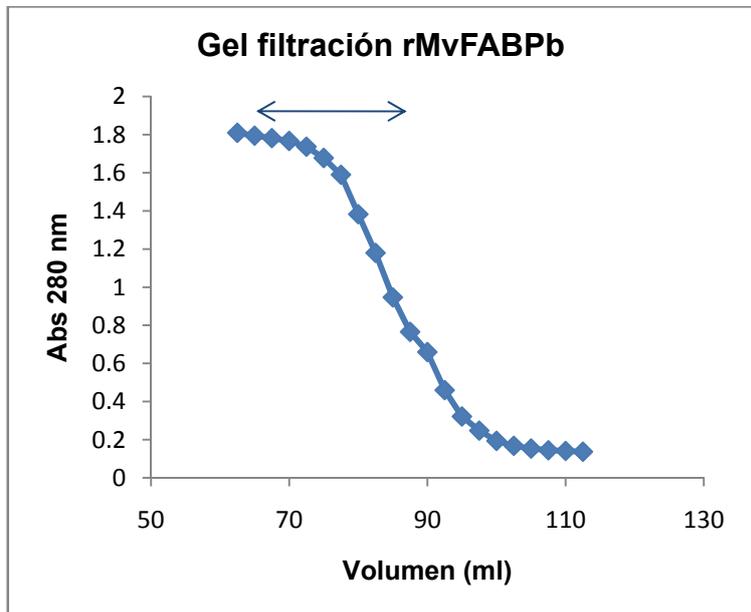
Con respecto a la cromatografía de rMvFABPb, a partir de la figura 37 B notamos que dicha proteína eluye a lo largo de las eluciones con 20 y 40 mM de NaCl, mientras que en la elución con 100 mM de NaCl si bien eluye una buena cantidad de rMvFABPb también lo hacen algunas proteínas minoritarias de mayor masa molecular. De manera similar a rMvFABPa, podemos sugerir que la elución de rMvFABPb en un amplio rango de concentración salina podría explicarse por la misma hipótesis planteada anteriormente para rMvFABPa. Es así como juntamos todos los tubos de la elución con 20 y 40 mM de NaCl.

N° de tubo	Volumen (ml)	Abs 280 nm
1	62.5	1.82
2	65	1.8
3	67.5	1.33
4	70	0.738
5	72.5	0.567
6	75	0.478
7	77.5	0.427
8	80	1.75
9	82.5	0.606
10	85	0.324
11	87.5	0.223
12	90	0.146
13	92.5	0.094
14	95	0.063
15	97.5	0.053
16	100	0.054
17	102.5	0.048
18	105	0.054
19	107.5	0.05
20	110	0.048



A

N° de tubo	Volumen (ml)	Abs 280 nm
1	62.5	1.81
2	65	1.795
3	67.5	1.782
4	70	1.767
5	72.5	1.737
6	75	1.678
7	77.5	1.59
8	80	1.383
9	82.5	1.18
10	85	0.947
11	87.5	0.766
12	90	0.66
13	92.5	0.46
14	95	0.322
15	97.5	0.248
16	100	0.194
17	102.5	0.168
18	105	0.154
19	107.5	0.145
20	110	0.141
21	112.5	0.137



B

Figura 35. Comatografía de gel filtración de MvFABPa (A) y MvFABPb (B). En cada caso se muestra la absorbancia a 280 nm de cada tubo y el cromatograma. El volumen muerto se corresponde con los primeros 60 ml (no mostrado). Las flechas horizontales indican el volumen de elución de las proteínas recombinantes.

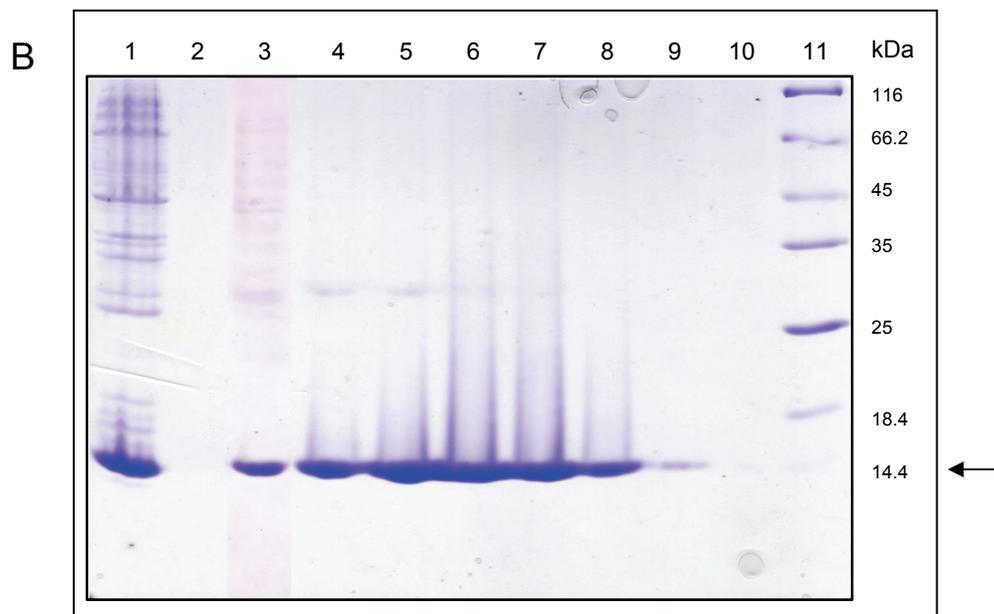
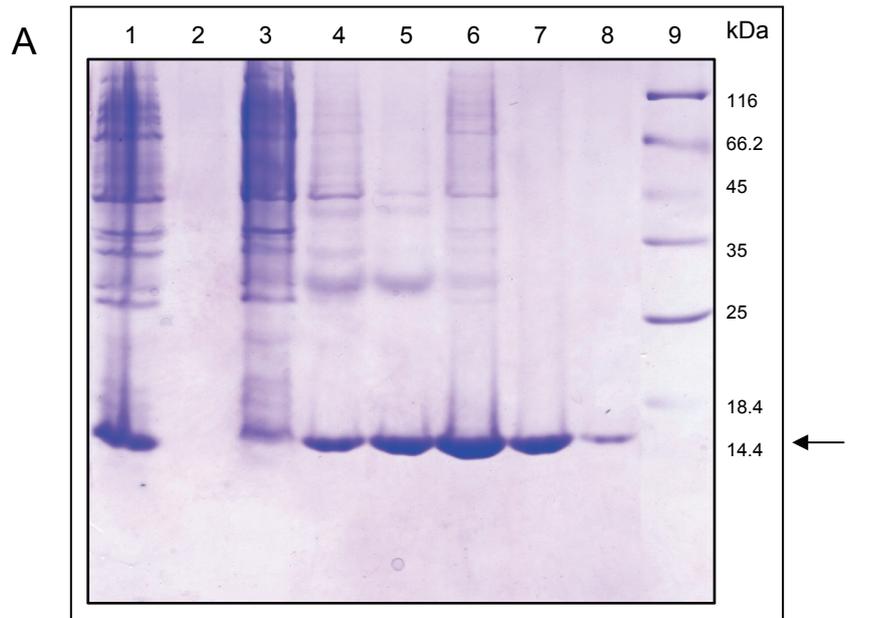


Figura 36. Evaluación de la cromatografía de gel filtración de rMvFABPa (A) y rMvFABPb (B) mediante electroforesis SDS-PAGE al 15%, tinción con *Coomassie brilliant blue R*. A: 1) material de carga; 2) volumen muerto; 3) tubo 1; 4) tubo 3; 5) tubo 5; 6) tubo 8; 7) tubo 11; 8) tubo 14; 9) marcador de peso molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas). B: 1) material de carga; 2) volumen muerto; 3) tubo 1; 4) tubo 4; 5) tubo 6; 6) tubo 8; 7) tubo 10; 8) tubo 12; 9) tubo 15; 10) tubo 18; 11) marcador de peso molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas). La flecha negra indica la presencia de las rMvFABPs respectivas.

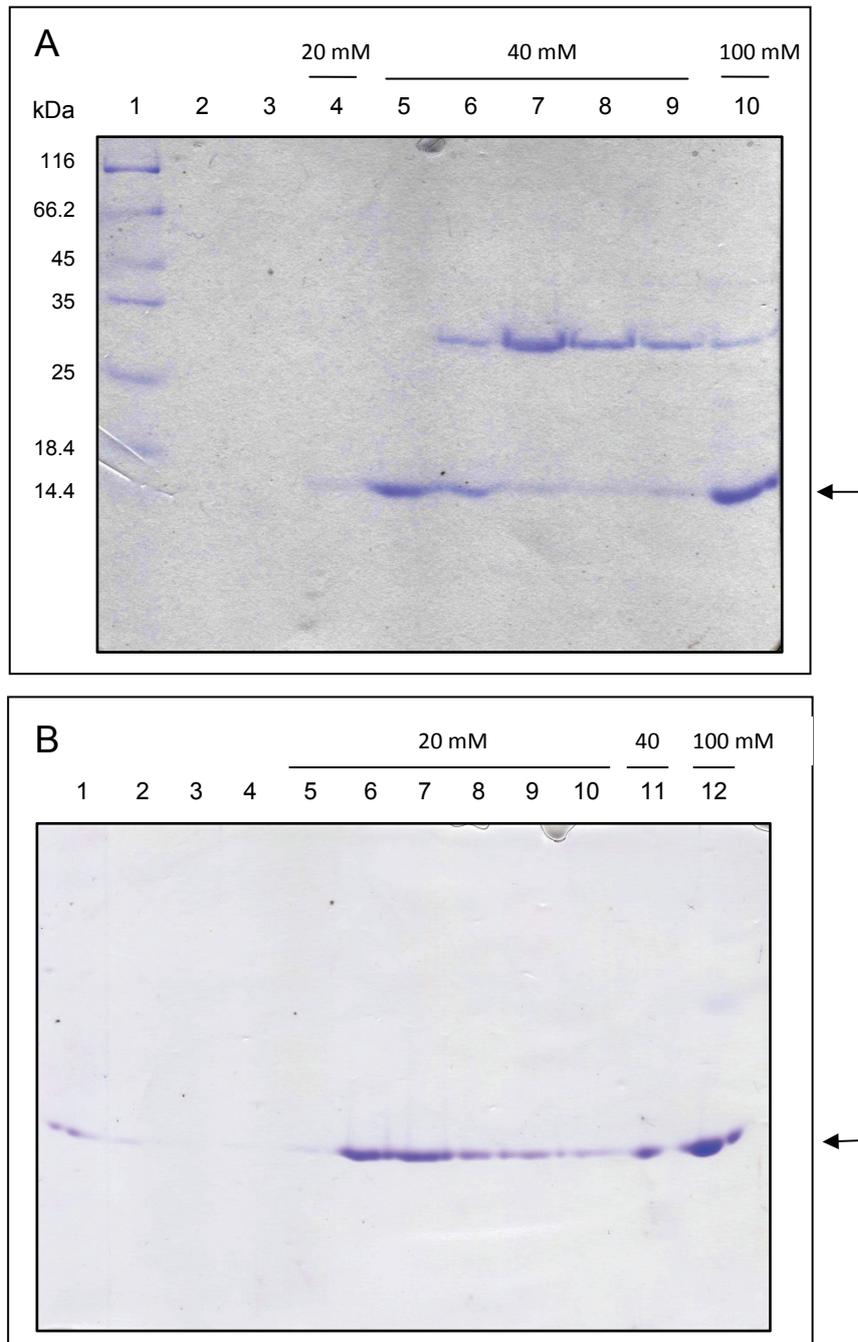


Figura 37. Evaluación de la cromatografía de intercambio iónico de rMvFABPa (A) y rMvFABPb (B) mediante electroforesis SDS-PAGE al 15%, tinción con *Coomassie brilliant blue*. A: 1) marcador de masa molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas); 2) colecta de siembra; 3) lavado; 4) tubo 5 de elución con 20 mM NaCl; 5-9) tubos 3, 6, 9, 12 y 15 de elución con 40 mM de NaCl respectivamente; 10) tubo 3 de elución con 100 mM de NaCl.

B: 1) lisozima como marcador de tamaño (masa molecular 14.4 kDa); 2) colecta de siembra; 3 y 4) tubos 2 y 7 del lavado; 5-10) tubos 1, 4, 7, 10, 13 y 20 de elución con 20 mM de NaCl respectivamente; 11) tubo 4 de elución con 40 mM de NaCl; 12) tubo 3 de elución con 100 mM de NaCl. Las líneas horizontales indican la concentración de NaCl (mM) utilizada.

Tanto la rMvFABPa como la MvFABPb purificadas se dializan, concentran, cuantifican y evalúan mediante SDS-PAGE (Figura 38). El rendimiento de la purificación de rMvFABPa es 14.8 mg de proteína pura por litro de cultivo y el rendimiento de rMvFABPb es 20.4 mg de proteína pura por litro de cultivo.

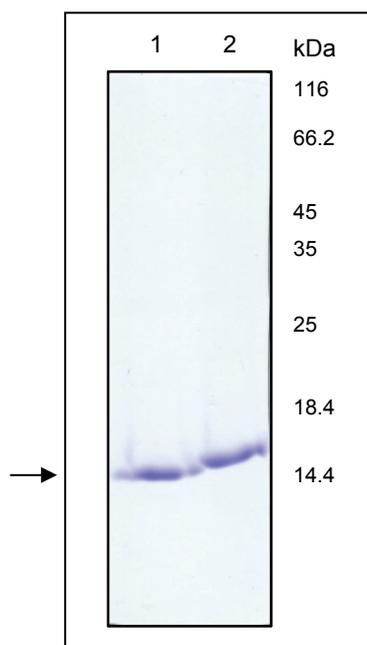


Figura 38. Evaluación de la pureza de MvFABPa y MvFABPb mediante SDS-PAGE al 15%, tinción *Coomassie brilliant blue R*. 1) rMvFABPa (7 µg); 2) rMvFABPb (7 µg).

Asimismo se confirma la identidad de dichas proteínas mediante *Western Blot* utilizando el anticuerpo contra rEgFABP1 (no mostrado). De esta manera, tanto rMvFABPa como rMvFABPb purificadas son utilizadas en la generación de los sueros policlonales.

4.2.4.2. Purificación de los sueros policlonales anti-rMvFABPa y anti-rMvFABPb

Luego de generar los sueros policlonales en conejos contra rMvFABPa y contra rMvFABPb, los mismos son purificados. En primer lugar, se purifican las IgGs mediante precipitación con sulfato de amonio y luego por cromatografía de afinidad se seleccionan las IgGs que reconocen específicamente cada proteína. La eficiencia de purificación de los sueros se confirma mediante ensayos de *Western Blot* utilizando los sueros sin purificar y purificados, y sembrando tanto extractos proteicos de tetratiridios

como las proteínas recombinantes puras. Se analiza además si presentan reconocimiento cruzado (Figura 39).

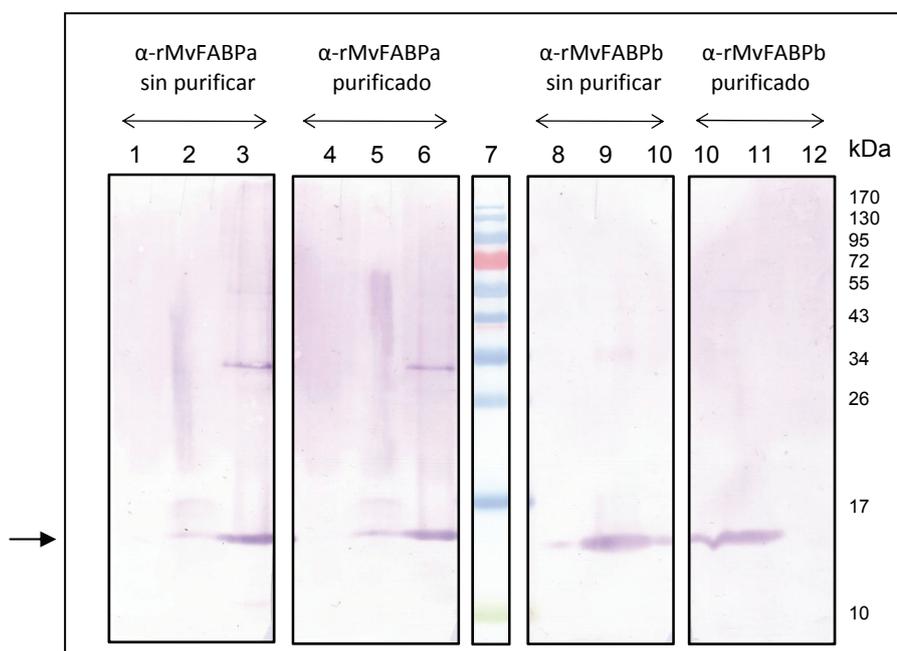


Figura 39. Evaluación de la purificación de los sueros contra-rMvFABPa y contra rMvFABPb mediante *Western Blot* a partir de SDS-PAGE 15%. 1) 2 μ g de rMvFABPb; 2) 30 μ g de extracto proteico de tetratiridios; 3) 2 μ g de rMvFABPa; 4) 2 μ g de rMvFABPb; 5) 30 μ g de extracto proteico de tetratiridios; 6) 2 μ g de rMvFABPa; 7) marcador de peso molecular *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (Fermentas); 8) 2 μ g de rMvFABPa; 9) 30 μ g de extracto proteico de tetratiridios; 10) 2 μ g de rMvFABPb; 11) 30 μ g de extracto proteico de tetratiridios; 12) 2 μ g de rMvFABPa. En la parte superior se indica el anticuerpo utilizado como primario. Tanto el suero contra-rMvFABPa sin purificar como el anticuerpo purificado se utilizan diluidos 1/400, y el suero contra-rMvFABPb sin purificar y el anticuerpo purificado se usan diluidos 1/1000. La membrana se divide por la mitad del carril 8 para ser incubada con el anticuerpo que se indica.

Analizando la figura 39 verificamos que cada uno de los sueros reconocen a las proteínas recombinantes que los generaron (carril 3 y 10). Se observa también el reconocimiento de las proteínas nativas respectivas, en tetratiridios (carril 2 y 9). Notamos que el suero y el anticuerpo purificado contra rMvFABPa no reconocen a rMvFABPb (carril 1 y 4). Se observa una marca inespecífica a lo largo de los carriles con extracto proteico (carril 2 y 5) que probablemente se deba a trazas de MvFABPa retenidas en impurezas lipídicas del extracto. El anticuerpo contra-rMvFABPa reconoce además, a la proteína de 29 kDa aproximadamente que coeluye con la proteína durante su purificación, a pesar de que la misma no se detecta al evaluar la

pureza del antígeno (ver Figura 37A y 38). De todas formas, ésta proteína se encuentra expresada en la preparación bacteriana y no en el extracto de tetratiridios, no afectando los estudios de microscopía realizados a posteriori en tetratiridios.

Por último, el suero contra-rMvFABPb sin purificar presenta un reconocimiento cruzado con rMvFABPa (carril 8). Afortunadamente, luego del proceso de purificación el anticuerpo ya no se une a dicha proteína (carril 12). El suero sin purificar marca muy débilmente una proteína de alto peso molecular en el extracto proteico (carril 9) cuyo reconocimiento desaparece luego que el suero es purificado (carril 11). El anticuerpo contra-rMvFABPb purificado reconoce específicamente tanto a la proteína recombinante MvFABPb como a la proteína nativa en el extracto de tetratiridios.

En suma, demostramos que los anticuerpos contra las proteínas recombinantes purificados son específicos, no presentando reacción cruzada (carril 4 y 12), habilitando su uso en los estudios posteriores de inmunolocalización.

4.2.4.3. Inmunolocalización de MvFABPs en criosecciones

En primer término analizamos la presencia de estas proteínas a nivel nuclear, marcando las preparaciones con DAPI que se une con alta afinidad al ADN y con menor afinidad al ARN. En estos ensayos visualizamos la unión de la sonda fluorescente al ADN y no al ARN ya que el pico de emisión ocurre a 461 nm y utilizamos un filtro de 410-430 nm para captar esta señal. El DAPI unido al ARN no solo emite menos fluorescencia sino también existe un corrimiento del pico hacia 500 nm. Las estructuras nucleares son identificadas además por su tamaño. Las mismas presentan regiones más fuertemente marcadas que corresponderían a nucléolos o a zonas de cromatina condensada.

Mediante proyecciones ortogonales estudiamos la colocalización FABP-núcleo, FABP-análogo de ácido graso y FABP-mitocondria, discriminando una región de la imagen en los ejes x e y. Este simple tratamiento disecciona la imagen permitiéndonos un análisis más fino y confiable del evento de colocalización. Detectamos así la colocalización parcial MvFABPa-núcleo, encontrando la proteína dentro de algunos núcleos (Figura 40), mientras que observamos otros núcleos que no presentan proteína. Por otro lado, detectamos una señal intensa de colocalización MvFABPa-BODIPY FL-C₁₆ próxima al núcleo, así como una colocalización citoplásmica más tenue y generalizada (Figura 41).

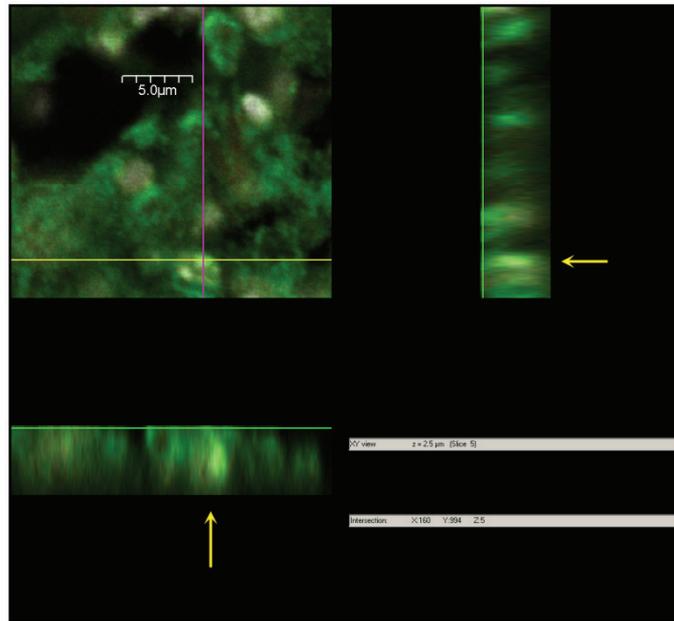


Figura 40. Inmunolocalización en criosecciones de tetratridios, colocalización MvFABPa-núcleos. Proyección ortogonal: verde (MvFABPa), blanco (DAPI), verde claro (superposición núcleo-proteína). Aumento 150X. La barra indica 5 micras. Las flechas amarillas señalan regiones de colocalización proteína-núcleo.

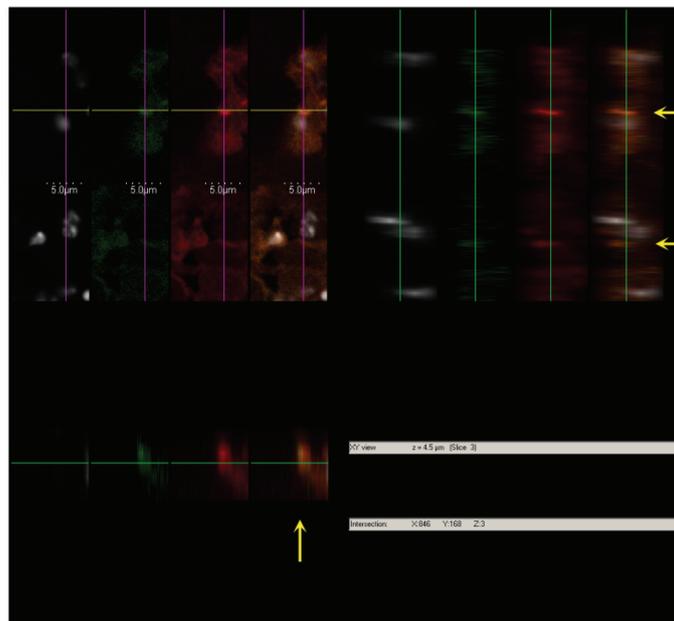


Figura 41. Inmunolocalización en criosecciones de tetratridios, colocalización MvFABPa-núcleo-ácido graso. Proyección ortogonal: blanco (DAPI), verde (BODIPY FL-C16), rojo (MvFABPa), amarillo-naranja (superposición ácido graso-proteína). Aumento 150 X, las barras indican 5 micras. Las flechas amarillas señalan regiones de colocalización proteína-ácido graso.

En la figura 42 se detecta la colocalización parcial de MvFABPb y núcleos, apreciándose varios núcleos donde dicha proteína está ausente. Por otro lado, en la figura 43 se visualiza en el citoplasma colocalización MvFABPb-BODIPY FL-C₁₆ en estructuras circulares, que podrían ser gotas lipídicas. Asimismo, observamos una señal de colocalización intensa cercana al núcleo similar a la observada con MvFABPa (Figuras 42 y 43).

Estos resultados confirman los experimentos de inmunolocalización realizados previamente, al igual que los de identificación a partir de geles 2D de extractos proteicos nucleares, no encontrándose diferencias sustanciales en la localización a nivel nuclear entre MvFABPa y MvFABPb. Las micrografías analizadas son representativas de varios sectores de la región media-caudal de las larvas.

Utilizando el marcador fluorescente MitoTracker se analiza la presencia de MvFABPa y MvFABPb a nivel de mitocondrias. Ambas proteínas colocalizan parcialmente con mitocondrias (Figura 44 y 45) existiendo regiones donde sólo se observa señal de las respectivas FABPs o de mitocondrias. Cabe recordar que nos centramos en el análisis de las señales puntiformes generadas mediante el tratamiento con el marcador fluorescente, no considerando el marcado más tenue y generalizado.

Por último, analizamos la localización de MvFABPa y MvFABPb a nivel del aparato de Golgi mediante el marcado con BODIPY TR-ceramida. En este caso también nos concentramos en las señales puntiformes fuertes y no en el marcado generalizado y tenue. En la figura 46 se observa la colocalización parcial de MvFABPa con el aparato de Golgi. A pesar que la misma parece ser muy generalizada, en el sector izquierdo de las micrografías apreciamos una marca baja correspondiente al Golgi en comparación con la señal de la proteína, en esta región el marcado parece ser diferencial.

Respecto a MvFABPb, a pesar de analizar distintas regiones de la larva, no detectamos colocalización entre MvFABPb y el aparato de Golgi. Estos resultados se muestran en la figura 47, donde no se aprecian puntos amarillo-naranjas de colocalización en la región anterior (cercana a las ventosas) y en la media. Este resultado no se contradice con la detección de MvFABPa y b en la fracción microsomal de tetratiridios ya que, como hemos mencionado anteriormente, ésta fracción está constituida no solo con vesículas derivadas del Golgi, sino también con las derivadas

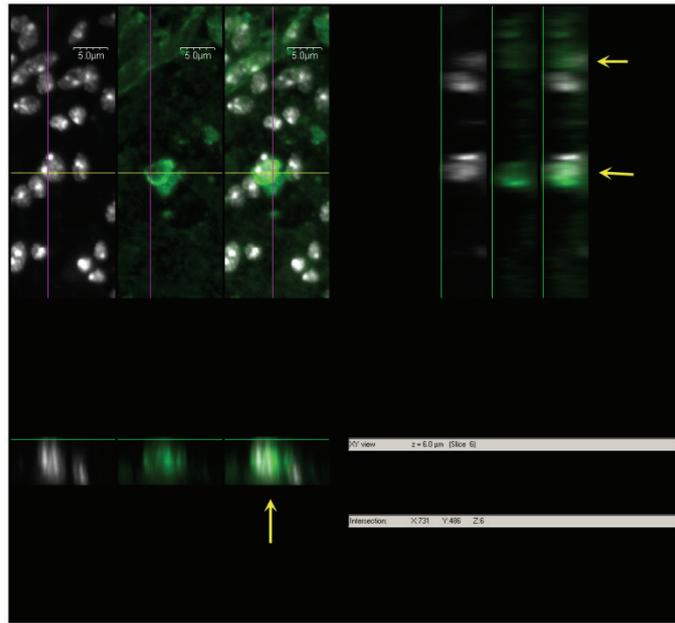


Figura 42. Inmunolocalización en criosecciones de tetratiridios, colocalización MvFA-BPb-núcleos. Proyección ortogonal: blanco (DAPI), verde (MvFABPb), verde claro (colocalización núcleo-proteína). Aumento 150X, las barras indican 5 micras. Las flechas amarillas señalan regiones de colocalización.

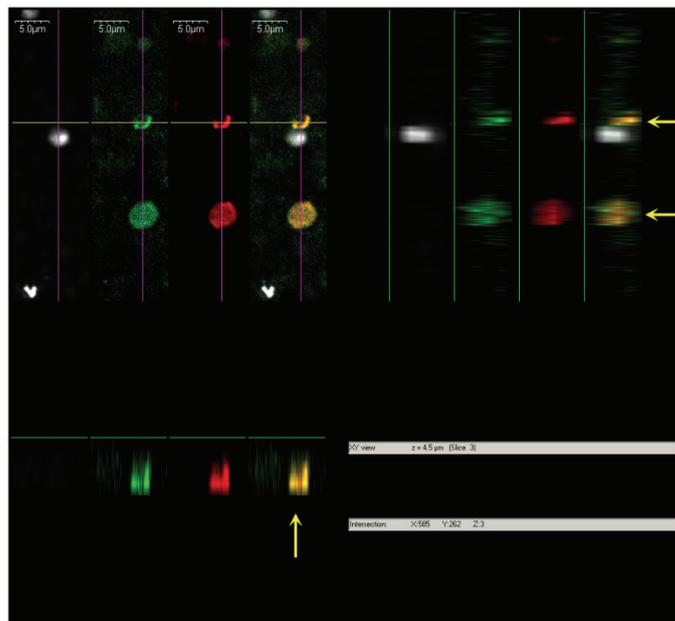


Figura 43. Inmunolocalización en criosecciones de tetratiridios, colocalización MvFA-BPb-núcleos-ácido graso. Proyección ortogonal: blanco (DAPI), verde (BODIPY FL-C16), rojo (MvFABPb), amarillo (colocalización ácido graso-proteína). Aumento 150X, las barras indican 5 micras. Las flechas amarillas señalan regiones de colocalización.

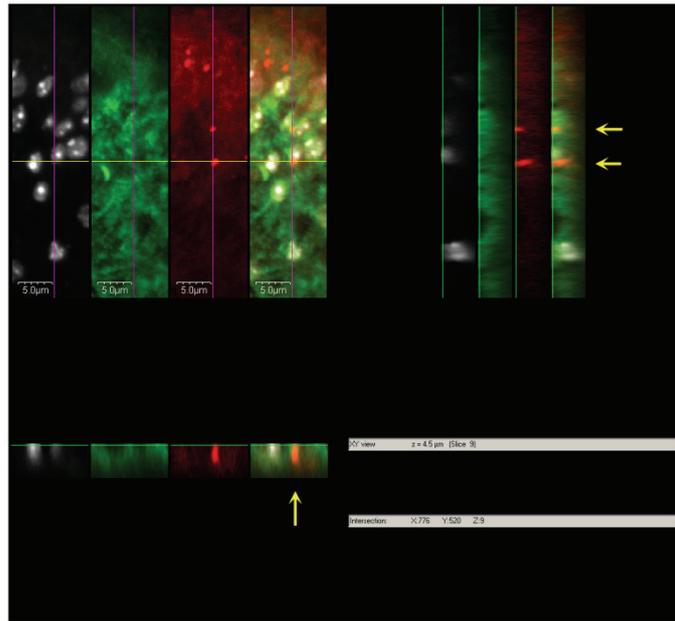


Figura 44. Inmunolocalización en criosecciones de tetratiridios, colocación MvFABPa-mitocondrias. Proyección ortogonal: blanco (DAPI), verde (MvFABPa), rojo (Mitotracker), amarillo-naranja (superposición MvFABPa-mitocondrias). Aumento 150X, las barras indican 5 micras. Las flechas amarillas señalan regiones de colocación MvFABPa-mitocondria.

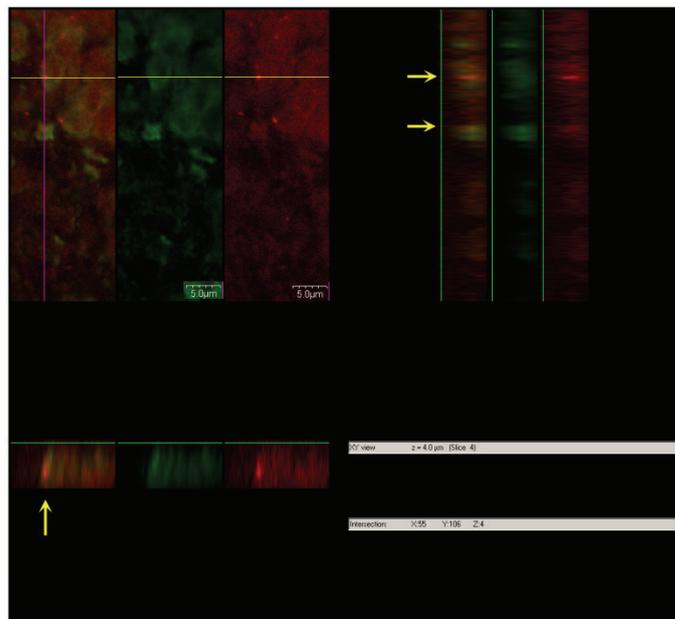


Figura 45. Inmunolocalización en criosecciones de tetratiridios, colocación MvFABPb-mitocondrias. Proyección ortogonal: verde (MvFABPb), rojo (Mitotracker), amarillo-naranja (superposición MvFABPb-mitocondrias). Aumento 150X, las barras indican 5 micras. Las flechas amarillas señalan zonas de colocación.

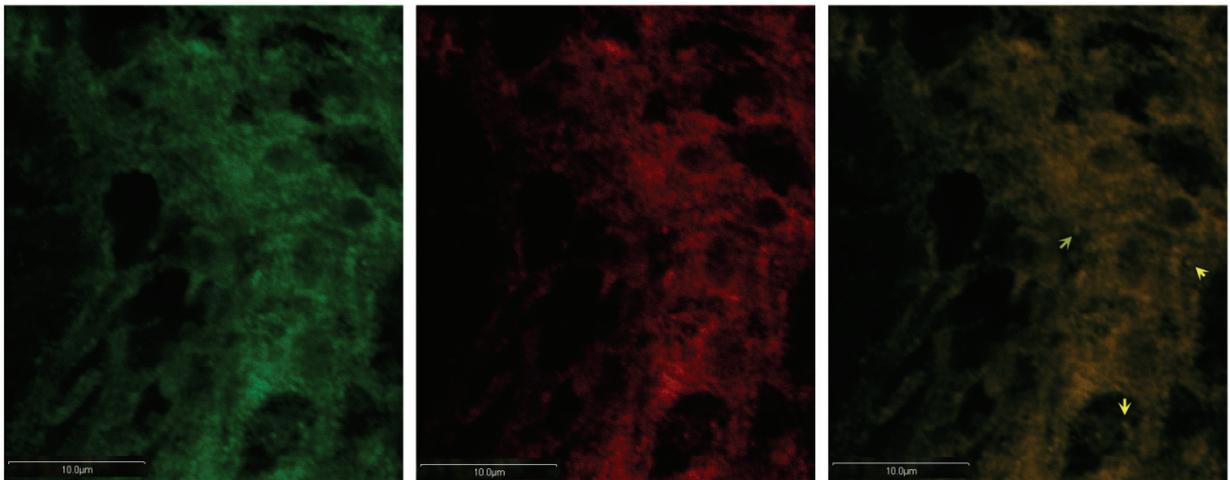


Figura 46. Inmunolocalizaciones en criosecciones de tetratiridios, colocalización MvFABPa-Golgi. Verde: MvFABPa, rojo: Golgi (BODIPY TR-ceramida), amarillo-naranja: superposición MvFABPa-Golgi. Aumento 150X, las barras indican 10 micras. Las flechas amarillas señalan puntos de colocalización.

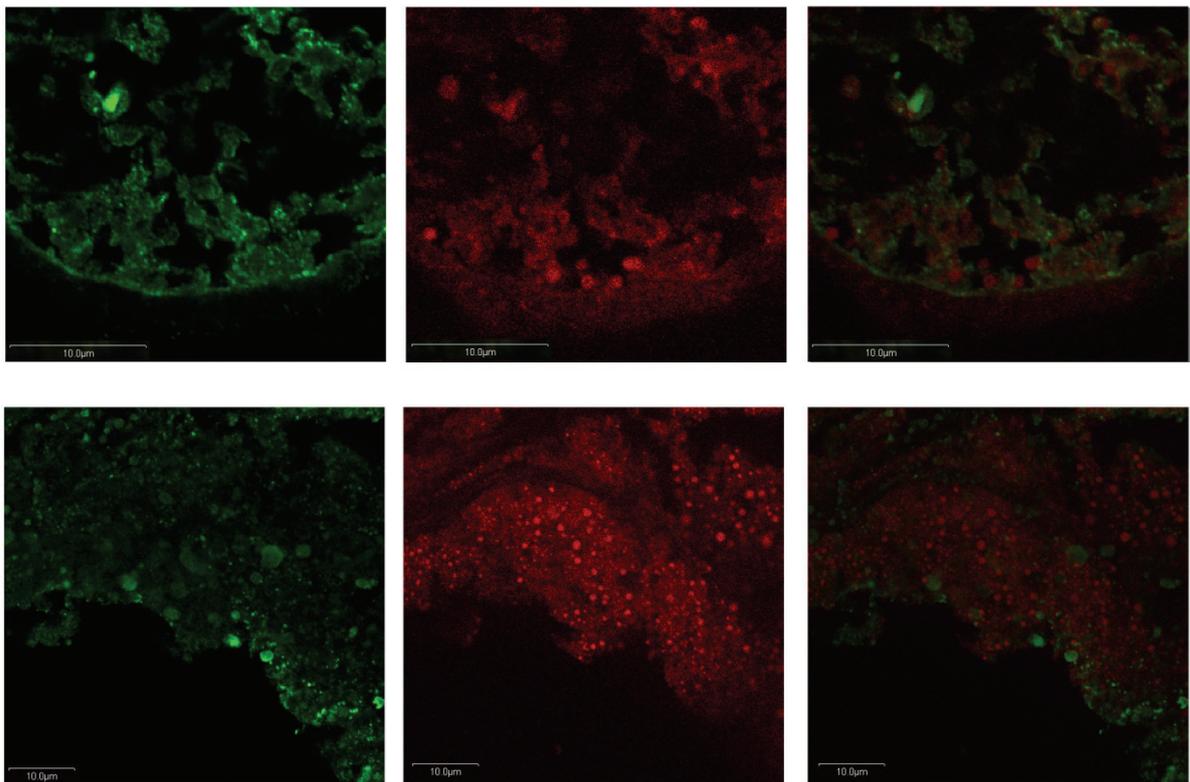


Figura 47. Inmunolocalizaciones en criosecciones de tetratiridios, colocalización MvFABPb-Golgi. Verde: MvFABPb, rojo: Golgi (BODIPY TR-ceramida), amarillo-naranja: superposición MvFABPb-Golgi. Aumento 150X, las barras indican 10 micras. Las micrografías superiores e inferiores corresponden a la región anterior y media del tetratiridio, respectivamente.

del retículo endoplásmico y membrana plasmática, y por lisosomas y peroxisomas. MvFABPb podría estar presente en alguno de éstos organelos excluyendo el Golgi. De todas formas este resultado tendría que ser verificado mediante otra metodología como es la inmunomicroscopía electrónica.

Cabe mencionar la presencia de MvFABPb en estructuras circulares de aspecto similar a gotas lipídicas en la región media del tetratiridio, hecho que se observa en menor proporción en la región anterior.

Previo a la realización de los experimentos de inmunolocalización en criosecciones de tetratiridios, se llevan a cabo varios controles. En la figura 48 se muestran controles con suero normal de conejo purificado mediante precipitación de IgGs, en lugar de los anticuerpos específicos contra MvFABPa y MvFABPb, y anticuerpos anti-IgGs de conejo conjugado ya sea a un fluoróforo que emite a 488 nm o a 543 nm. Además, realizamos controles de autofluorescencia en donde no incorporamos anticuerpos (Figura 48E y F). Al analizar las imágenes obtenidas apreciamos la tinción de núcleos por DAPI con el laser UV (Figura 48A y C), no observándose señal al excitar con el laser de 488 nm y con el de 543 nm (Figura 48B y D). Esto indica, por un lado, que los tetratiridios no emiten fluorescencia a 488 y 543 nm, y por otro lado que los componentes del suero normal de conejo no generan una señal falsa positiva. En la figura 49 se presentan controles tratados con los anticuerpos contra-MvFABPa (Figura 49 A-D) o b (Figura 49 E-H) respectivamente y sin anticuerpos anti-IgGs de conejo visualizados con los tres láseres utilizados (UV, 488 y 543 nm). En esta oportunidad no se realiza tinción con DAPI. Solamente se observa una señal tenue a 543 nm que no afectaría los estudios realizados, ya que todas las micrográficas en criosecciones se adquieren a un voltaje menor del laser 543 que el utilizado en el control (750 V).

Resumiendo estos resultados detectamos tanto a MvFABPa como a MvFABPb a nivel nuclear, en regiones cercanas al núcleo y en mitocondrias. Nuevamente observamos que las larvas de *Mesocestoides vogae* son capaces de capturar un análogo de ácido graso del medio *in vivo* y que éste colocaliza con ambas MvFABPs no solo en el citoplasma sino que también en núcleos y en regiones próximas a éstos. Cabe destacar que solamente MvFABPa es encontrada a nivel del aparato de Golgi.

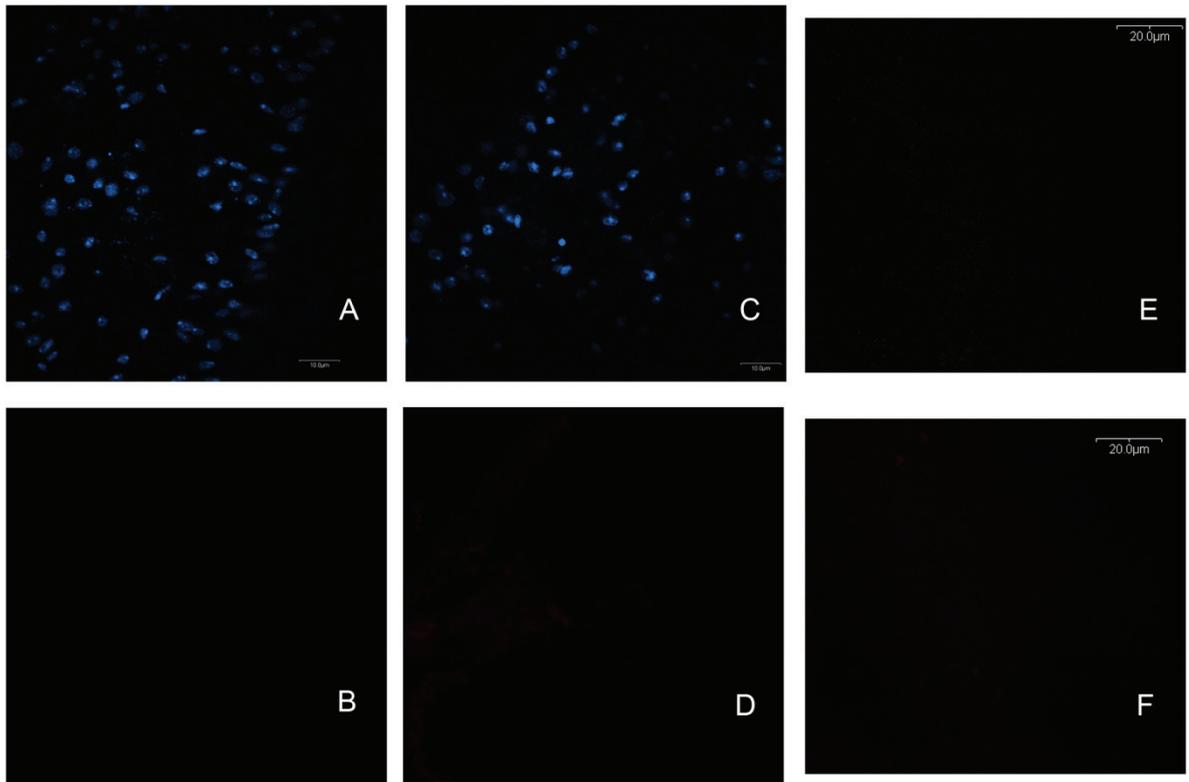


Figura 48. Controles de las inmunolocalizaciones en criosecciones de tetratiridios. A-D (aumento 150X): tratamiento con suero normal de conejo purificado y anticuerpo anti-IgGs de conejo conjugado con AlexaFluor 488 (A y B) o con AlexaFluor 543 (C y D). A y C: laser UV (DAPI), B: laser 488 nm, D: laser 543 nm. E y F: autofluorescencia (sin anticuerpos), aumento 60X; E: laser 488 nm, F: laser 543 nm.

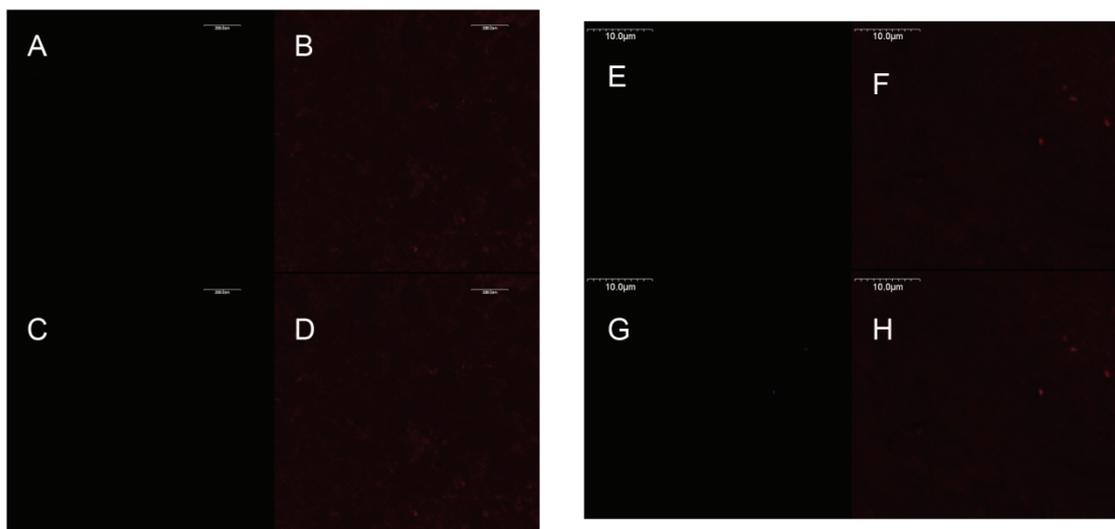


Figura 49. Controles de las inmunolocalizaciones en criosecciones de tetratiridios. A-D: anticuerpo contra MvFABPa, sin anticuerpo anti-IgG conejo; E-H: anticuerpo contra MvFABPb, sin anticuerpo anti-IgG conejo. A y E: laser 488 nm; B y F: laser 543 nm; C y G: laser UV; D y H: superposición de los tres canales. Aumento 150X.

5. INTERACCIÓN FABP-MEMBRANA, INTERACCIÓN FABP-PROTEÍNA

5.1. Materiales y métodos

5.1.1. Estudio de interacción FABP-membrana: ensayos de FRET

Para llevar a cabo los estudios de interacción FABP-membranas artificiales mediante la metodología de Transferencia de Energía de Resonancia de Förster (FRET) es necesario disponer de grandes cantidades de proteína recombinante pura y delipidada. Por este motivo, luego de completar las secuencias codificantes completas de la MvFABPa y b, las proteínas recombinantes respectivas son purificadas según el protocolo descrito en materiales y métodos. Asimismo, la proteína rEgFABP1 también es purificada con la misma finalidad.

5.1.1.1. Expresión y purificación de rEgFABP1

Con respecto a rEgFABP1, ya disponemos de la secuencia codificante completa clonada y su purificación ya está puesta a punto. La misma se expresa y purifica siguiendo el protocolo descrito por Alvite y colaboradores en 2001 (Alvite et al., 2001), con algunas modificaciones. Primeramente se realiza una cromatografía de gel filtración utilizando 180 ml de la matriz Sephadex G-50 (Sigma-Aldrich) en una columna de 1 m de alto por 1.6 cm de diámetro sometida a un flujo constante de 15 ml/hora. A posteriori, la cromatografía de intercambio iónico se lleva a cabo en una columna con 30 ml del intercambiador aniónico SOURCE 15Q (Amersham Biosciences) y un flujo constante de 48 ml/hora. La concentración de EgFABP1 pura se determina mediante la medida de absorbancia a 280 nm utilizando el coeficiente de extensión molar $9970 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, calculado a partir del recurso informático Expasy usando la herramienta ProtParam.

La proteína recombinante EgFABP2 es una proteína insoluble por lo que se utiliza para su purificación el protocolo descrito en Alvite, 2006 (tesis de maestría). Lamentablemente, a pesar que esta proteína puede ser purificada utilizando un proceso de desnaturalización y renaturalización, la misma no es estable en el tiempo, por lo que no pudo ser utilizada para realizar ensayos de FRET. Previamente distintas condiciones de crecimiento e inducción han sido ensayadas sin obtenerse buenos resultados, en todos los casos la proteína sigue precipitándose, formando cuerpos de inclusión.

5.1.1.2. Delipidación de proteínas recombinantes

La delipidación se lleva a cabo en *batch* usando 30 ml de hidroxialcoxiopropil dextrano (Lipidex 1000, Sigma), equilibrado en un amortiguador de alta fuerza iónica (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1M NaCl) a 37°C por 45 min. La elución y lavados se realizan en columna. Las proteínas delipidadas se dializan toda la noche en 100 volúmenes de amortiguador TBS (40 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl).

5.1.1.3. Ensayos de unión con antroiloxi ácidos grasos

Se estudian las propiedades de unión de las FABPs con antroiloxi ácido esteárico utilizando un ensayo de titulación fluorescente (Córsico et al., 2004). Brevemente, 0.5 μ M de 12-(9-antroiloxi) ácido esteárico (12AS, Molecular Probes) se incubaba a 25° C por 3 min, en amortiguador TBS con concentraciones crecientes de rEgFABP1. Se registra la fluorescencia de emisión a 450 nm, luego de excitar a 383 nm en un espectrofluorímetro Fluorolog-3 (Horiba-Jobin Yvon) (INIBIOLP, UdelaPlata) o Cary Eclipse (Varian) (Instituto Pasteur de Montevideo). La constante de unión (K_D) se calcula empleando el ajuste *Ligand Binding, One Site Saturation* (Sigma Plot).

5.1.1.4. Preparación de vesículas fosfolipídicas

Para llevar a cabo los experimentos de transferencia de antroiloxi ácidos grasos (AOFA) es necesario preparar vesículas unilamelares pequeñas (SUVs). Las mismas se generan mediante procesos de sonicación y ultracentrifugación como fue descrito previamente (Storch et Kleinfeld, 1986). Las vesículas estándar o neutras contienen 90 mol % de fosfatidilcolina de huevo (EPC) y 10 mol % de N-(7-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazol-4-yl)-fosfatidilcolina (NBD-PC), este último apantalla la fluorescencia de los derivados antroiloxi. Para aumentar la densidad de carga negativa de las vesículasceptoras se incorpora en las SUVs 25 mol % de fosfatidilserina (PS) o cardioplipina (CL), en lugar de una cantidad equimolar de EPC. Las vesículas se preparan en TBS excepto para las SUVs que contienen CL, en donde se utiliza TBS con 1 mM de EDTA. La concentración fosfolipídica final se determina mediante un ensayo de fósforo inorgánico (Gomori, 1942). Todos los lípidos se compran en Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL).

5.1.1.5. Determinación del coeficiente de partición relativo (K_p)

Se calcula la partición del ligando entre la proteína y las SUVs conteniendo NBD mediante la medida de la fluorescencia del 12AS a distintas proporciones de proteína/SUVs obtenidas por la adición de SUVs a una solución conteniendo 10 μ M de FABP y 1 μ M de 12AS en amortiguador TBS a 25° C (Massey et al., 1997). El coeficiente de partición relativo K_p se define como:

$$K_p = \frac{[Ligand - FABP]}{[FABP]} \times \frac{[SUV]}{[Ligand - SUV]} \quad (1)$$

Donde [Ligand-SUV] y [Ligand-FABP] son las concentraciones del 12AS unido a membrana y FABP, respectivamente, y [FABP] y [SUV] son las concentraciones de proteína y vesículas. La disminución de la fluorescencia del 12 AS en función de las SUVs se relaciona con el K_p mediante:

$$F_{rel} = \frac{a \times K_p}{K_p + \frac{[SUV]}{[FABP]}} - b \times \frac{[SUV]}{[FABP]} \quad (2)$$

Donde F_{rel} , [SUV], [FABP], K_p , a y b son la fluorescencia relativa, la concentración molar de SUVs, la concentración molar de FABP, la constante de partición y los parámetros de ajuste, respectivamente (De Gerónimo et al., 2010). El coeficiente de partición es utilizado para establecer las condiciones del ensayo de transferencia del 12AS que aseguren la transferencia unidireccional, como se detalla a continuación.

5.1.1.6. Transferencia de 12AS desde rFABPs a SUVs

El ensayo de Transferencia de Energía de Resonancia de Förster (FRET) se utiliza para monitorear la transferencia del 12AS desde la rFABP hacia membranas artificiales aceptoras como se describe anteriormente (Hsu et Storch, 1996; Córscico et al., 1998; Córscico et al., 2004). Brevemente, la rFABP en estudio con el 12AS unido se mezcla a 25° C con las SUVs utilizando un módulo de cinética rápida *stopped flow* RX2000 (Applied Photophysics Ltd., INIBIOLP, UdelaPlata) asociado al espectrofluorímetro (Fluorolog-3, Horiba-Jobin Yvon) o un espectrofluorímetro *stopped-flow* (Applied Photophysics modelo SX20; CEINBIO, Facultad de Medicina). La molécula de NBD es un aceptor de la energía de transferencia del grupo donador

antroiloxi. Es así que la fluorescencia del 12AS es apantallada cuando el ligando se une a las SUVs que contienen NBD-PC. Luego de mezclar, la transferencia de 12AS desde la proteína hacia las membranas es monitoreada directamente mediante la disminución dependiente del tiempo en la fluorescencia del grupo antroiloxi. Se utilizan distintos tipos de SUVs y amortiguadores para analizar los mecanismos de transferencia de ligandos. Los ensayos de transferencia se llevan a cabo utilizando la relación 15:1 mol FABP: mol 12AS. Las SUVs se agregan en relación 1:10 hasta 1:40 de mol FABP:mol SUVs. Antes de cada experimento se realizan controles para asegurar la ausencia de *photobleaching*, como se describe previamente (Córsico et al., 1998). Los datos se analizan empleando el programa Sigma Plot y todas las curvas son descritas por una función de decaimiento exponencial. Se realizan por lo menos cinco réplicas para cada condición experimental en un experimento único. Al menos que se indique, se reportan los valores promedio \pm D.E. (desviación estándar) para dos o más experimentos separados.

5.1.2. Interacción FABP-proteína

Abordamos la búsqueda de proteínas capaces de interaccionar con las FABPs en estudio mediante dos estrategias experimentales, una implica ensayos de captura de ligando y la otra experimentos de inmunoprecipitación.

5.1.2.1. Ensayos de captura de ligandos: clonado de EgFABPs y MvFABPs en vector pQE

Primeramente amplificamos mediante PCR las secuencias codificantes de EgFABP1, EgFABP2, MvFABPa y MvFABPb para clonarlas en el plásmido pJET1.2 y subclonarlas en el vector de expresión pQE-30. Luego de purificar las proteínas recombinantes respectivas mediante cromatografía de afinidad, se realizan los ensayos de captura de ligando utilizando extracto total de protoescoléces y tetratiridios, según corresponda, y el kit ProFound™ Pull-Down PolyHis Protein:Protein Interaction Kit (PIERCE Biotechnology).

Para clonar EgFABP1, EgFABP2, MvFABPa y MvFABPb en el vector pQE-30, se realiza PCR a partir de los plásmidos pKS-EgFABP1, pKS-EgFABP2, pJET1.2-MvFABPa (contiene sitios para clonado en pET5a) y pET5a-MvFABPb diluidos 1/100, respectivamente, utilizando el kit illustra™ Pure Taq™ Ready-To-Go PCR beads (GE Healthcare). Los siguientes pares de cebadores se usan en las reacciones

correspondientes: Df1pQfw 5'-GGATCCATGGAGGCATTCCTTG-3' y Df1pQrev 5'-AAGCTTTTACGCCACCTTTGAG-3' para amplificar a EgFABP1; Df2PQFw 5'-GGATCCATGGAGCCATTCATCG-3' y Df2PQRev 5'-AAGCTTTTACATCCCTCTTGAGTA-3' para amplificar a EgFABP2; MvFABPaPQFw 5'-GGATCCATGGAGGCGTTTCT-3' y MvFABPaPQRev 5'-AAGCTTCTAGATCTTCACGTAG-3' para MvFABPa; MvFABPbPQFw 5'-GGATCCATGGATGCTTTTCTGG-3' y MvFABPbPQRev 5'-AAGCTTCTAACATCTGGTGTATTC-3' para MvFABPb. Todos los juegos de cebadores incluyen los sitios de restricción BamHI y HindIII en el cebador directo y reverso, respectivamente. El programa de amplificación incluye 35 ciclos de 45 seg a 94°C, 45 seg a 56° C (EgFABP1, MvFABPa, MvFABPb) o a 55° C (EgFABP2) y 45 seg a 72° C. Los productos de PCR son visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio y son purificados usando GFX gel band purification kit (GE Healthcare, Buckinghamshire UK). Los mismos se ligan en el vector pJET 1.2 (CloneJET™ PCR Cloning Kit, Fermentas, Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante, para transformar bacterias *Escherichia coli* XL1. Luego los plásmidos recombinantes son purificados (AxyPrep Plasmid Miniprep Kit, Axygen Biosciences, USA) y las secuencias codificantes correspondientes son digeridas con las enzimas de restricción BamHI y HindIII (Promega, Wisconsin, USA). Las mismas son clonadas en el vector pQE-30 (Qiagen, USA) para transformar bacterias *E. coli* M15[pREP4]. Los clones seleccionados son secuenciados para verificar su identidad en el Servicio de Secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo.

5.1.2.2. Ensayos de captura de ligandos: producción y purificación de las His-EgFABPs y His-MvFABPs

Los clones de *E. coli* M15[pREP4] conteniendo a los plásmidos pQE30-EgFABP1, pQE30-EgFABP2, pQE30-MvFABPa y pQE30-MvFABPb se cultivan durante toda la noche a 37 o a 30° C en medio LB conteniendo 100 µg/ml de ampicilina (Sigma) y 25 µg/ml de kanamicina (Sigma). Los mismos se utilizan para inocular 200 ml de LB (dilución 1:50) con los antibióticos ya mencionados y se cultivan a la misma temperatura hasta que la absorbancia a 600 nm alcance 0.7-0.9, momento en que se inducen con IPTG 1.5 mM durante 3 hs. Las células son colectadas mediante centrifugación a 4000 x g por 10 min. y son resuspendidas en 6 ml de amortiguador de sonicación (fosfato de sodio 50 mM pH 8.0, NaCl 300 mM). Luego de 3 ciclos de congelación-descongelación a -20° C y 6 ciclos de sonicación (1.5 A x 30 seg), el

lisado celular es centrifugado durante 25 min. a 13000 xg, separándose la fracción soluble (sobrenadante) e insoluble (residuo). Lamentablemente la mayoría de His-EgFABP2 permanece en la fracción insoluble impidiendo la continuación de su purificación. El sobrenadante conteniendo His-EgFABP1 o His-MvFABPa o His-MvFABPb (6.5 ml) se agita suavemente con 2 ml de resina Ni²⁺-NTA-Agarose (Qiagen) equilibrada con amortiguador de sonicación, durante 1 h a 4° C. A posteriori, la mezcla se pasa a una columna donde se colecta el percolado, el lavado con amortiguador de sonicación, y finalmente se hace pasar amortiguador con 10, 40, 100, 250 y 500 mM de imidazol sucesivamente. Se colecta 1 ml por tubo cada 3 minutos aproximadamente. His-MvFABPa eluye con 10 y 40 mM de imidazol mientras que His-MvFABPb y His-EgFABP1 eluyen con 40 mM. Por último las proteínas eluidas son dializadas contra amortiguador TBS (25 mM Tris-HCl pH 7.4, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl), concentradas con el dispositivo de Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices (Millipore, corte 10 kDa) y cuantificadas mediante espectrofotometría a 280 nm ($\epsilon_{\text{His-MvFABPa}} = 9970 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{His-MvFABPb}} = 8605 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{His-EgFABP1}} = 9970 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

5.1.2.3. Ensayos de captura de ligandos: preparación de extractos proteicos

Se lavan 200 μl de protoesclésces o tetratiridios con PBS (10 mM Na₂HPO₄·2 H₂O, 2mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4) y se agrega 200 μl de TBS frío con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de benzamidina (Sigma Aldrich), 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ iodoacetamida (Sigma Aldrich) y 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma Aldrich). Luego las larvas son lisadas adicionando 200 μl de solución de lisis (kit ProFound™, PIERCE Biotechnology) en un homogeneizador de tubos eppendorf (Pellet Pestle Motor, Kontes Glass Company). Mediante microscopía óptica se verifica la lisis y las muestras se incuban 30 min. en hielo con agitación esporádica y se centrifugan durante 5 min. a 12000 x g. Se separa el sobrenadante, se agrega imidazol 4M hasta 40 mM final y se cuantifican los extractos proteicos con el kit QuantiPro BCA Assay (Sigma Aldrich).

Previamente a la preparación de extractos proteicos de tetratiridios los mismos son cultivados en esterilidad según se detalla previamente.

5.1.2.4. Ensayos de captura de ligandos

Se realizan tres tipos de ensayos de captura de ligandos, con His-MvFABPa y extracto proteico total de tetratiridios, con His-MvFABPb y el extracto recién mencionado y con

His-EgFABP1 y extracto proteico de protoescoléces, utilizando el kit ProFound Pull-Down PolyHis Protein:Protein Interaction (Pierce Biotechnology).

Para cada ensayo, primeramente se equilibran dos mini-columnas con 50 µl de gel con cobalto quelado, rotuladas control y proteína cebo (proteína fusionada con histidinas), siguiendo las instrucciones del fabricante del kit. A continuación se inmoviliza la proteína cebo (aprox. 150 µg) previamente purificada, en la columna correspondiente de acuerdo al protocolo del kit. Se reserva el material recogido luego de la unión de la proteína (*bait flow-through*) y el último lavado, para su análisis mediante SDS-PAGE. Luego las columnas con y sin (control) la proteína cebo inmovilizada son incubadas con los extractos proteicos totales (aprox. 2 mg), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se separa el material recogido luego de la aplicación del extracto (*prey flow-through*) y el último lavado de este paso, para ser analizados a posteriori. La última etapa consiste en la elución de los complejos “cebo-presa” con imidazol 290 mM (de acuerdo al kit), colectándose 3 o 4 eluciones en cada caso. Las eluciones 1 y 2 son concentradas utilizando los dispositivos Vivaspin 500 (SartoriusStedim, Alemania, corte 10 kDa) y son evaluadas mediante SDS-PAGE.

5.1.2.5. Ensayos de inmunoprecipitación

Los ensayos de inmunoprecipitación se llevan a cabo según el protocolo descrito por Chalar y colaboradores para protoescoléces (Chalar et al., 1999), con algunas modificaciones. Los tetratiridios se cultivan de 3 a 5 días como se describe en previamente. Luego de homogeneizar los protoescoléces o tetratiridios con amortiguador de extracción (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Tergitol, 1 mg/ml BSA, 1 mM PMSF) en homogeneizador de tubos eppendorf (Pellet Pestle Motor, Kontes Glass Company), las muestras son centrifugadas durante 10 min. a 14000 x g. Se inmunoprecipita el extracto proteico como se describe previamente, utilizándose los anticuerpos contra rEgFABP1, contra rMvFABPa y contra rMvFABPb purificados y Protein A-Sepharose (Sigma Aldrich). El precipitado, luego de ser lavado apropiadamente, se resuspende en 50 µl de amortiguador de carga (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 10% beta mercaptoetanol, azul de bromofenol) para ser analizado por SDS-PAGE.

5.1.2.6. Identificación mediante espectrometría de masa

Se identifican las bandas proteicas de los inmunoprecipitados, visualizadas mediante SDS-PAGE teñido con nitrato de plata utilizando espectrometría de masa MALDI TOF-TOF como se describe previamente.

5.2. Resultados

En esta instancia abordamos estudios de interacción entre las FABPs de los cestodos en estudio y membranas aceptoras artificiales, analizando el mecanismo de transferencia de ligandos fluorescentes desde dichas proteínas hacia vesículas unilamelares pequeñas (SUVs), utilizando ensayos de Transferencia de Energía de Resonancia de Förster (FRET). Estos estudios nos ayudarán a comprender si estas FABPs son capaces de interactuar directamente con la membrana celular o la de distintos organelos, direccionando así a sus ligandos; o por el contrario los ligandos difunden desde la proteína antes de unirse a las membranas. En el primer caso, donde existen interacciones directas entre la proteína y las vesículas, el mecanismo de transferencia de ligando es colisional, mientras que en el segundo caso donde ocurre una difusión del ligando, el mecanismo de transferencia se considera como difusional (Kim et Storch, 1992a, Kim et Storch, 1992b).

Por otro lado, analizamos la capacidad de estas FABPs de interactuar con otras proteínas utilizando dos metodologías complementarias, ensayos de captura de ligandos (*pull down*) y ensayos de inmunoprecipitación.

5.2.1. Estudios de interacción FABPs-membranas artificiales

Los ensayos de FRET se realizan con las proteínas recombinantes EgFABP1, MvFABPa y MvFABPb, no pudiéndose llevarse a cabo con rEgFABP2. Como se menciona anteriormente, la proteína recombinante EgFABP2 es una proteína insoluble y aunque puede ser obtenida en forma pura, la misma no es estable en el tiempo. Los ensayos biofísicos con EgFABP1 se realizan en colaboración con Jorge Pórfido del laboratorio de la Dra. Betina Córscico (INIBIOLP, Universidad de la Plata, Argentina) y dan origen a una publicación (Pórfido et al., 2012) para la cual J. Pórfido y G. Alvite contribuyen de la misma manera.

5.2.1.1. Ensayos de unión de rEgFABP1 con el ligando 12AS

Previamente a la realización de los experimentos de interacción entre rEgFABP1 y las SUVs, se llevan a cabo ensayos de unión con el análogo fluorescente de ácido esteárico 12AS. Generalmente, las sondas antioxi presentan baja intensidad de fluorescencia en amortiguador y luego de la interacción con una FABP la

intensidad aumenta (Storch et al., 1989). En la Figura 50 se observa un importante aumento en la emisión de fluorescencia acompañado por un corrimiento hacia el azul del espectro de emisión a medida que se agregan cantidades crecientes de rEgFABP1 al ligando mencionado. El corrimiento del espectro hacia el azul y el aumento de fluorescencia indican que el fluoróforo ingresa a un ambiente apolar, probablemente al bolsillo de unión hidrofóbico de la FABP.

La titulación describe una curva que llega a la saturación en concordancia con un fenómeno de unión de ligando consistente con una unión 1:1 (un sitio de unión por monómero de proteína) con una K_d de $0.12 \pm 0.02 \mu\text{M}$ por el 12AS (Figura 50B).

Realizamos los mismos ensayos de unión para rMvFABPa y rMvFABPb, observándose que no había cambios en la intensidad de fluorescencia al agregar proteína e incluso la misma disminuía. A pesar de que no es posible calcular la K_D en estos casos, esto no nos impide seguir adelante con los ensayos de FRET ya que en la literatura encontramos varios ejemplos similares. Un comportamiento similar presentan los ensayos de unión de rEgFABP1 con el 16AP (16-(9-antioiloxi) ácido palmítico) (Pórfido et al., 2012) y también se aprecian en los estudios de unión de la rFABP de rata con el 12AO (12-(9-antioiloxi) ácido oleico) (Franchini et al., 2008). Una posible explicación para este hecho podría ser que el fluoróforo (grupo antioiloxi) se posicionara en el bolsillo de unión de manera tal que no variara la fluorescencia con el agregado de proteína o incluso podría disminuir al ser apantallada por algún aminoácido del bolsillo. Debido a que este comportamiento no es inusual y no se traduce en ausencia de unión, continuamos realizando los ensayos de FRET.

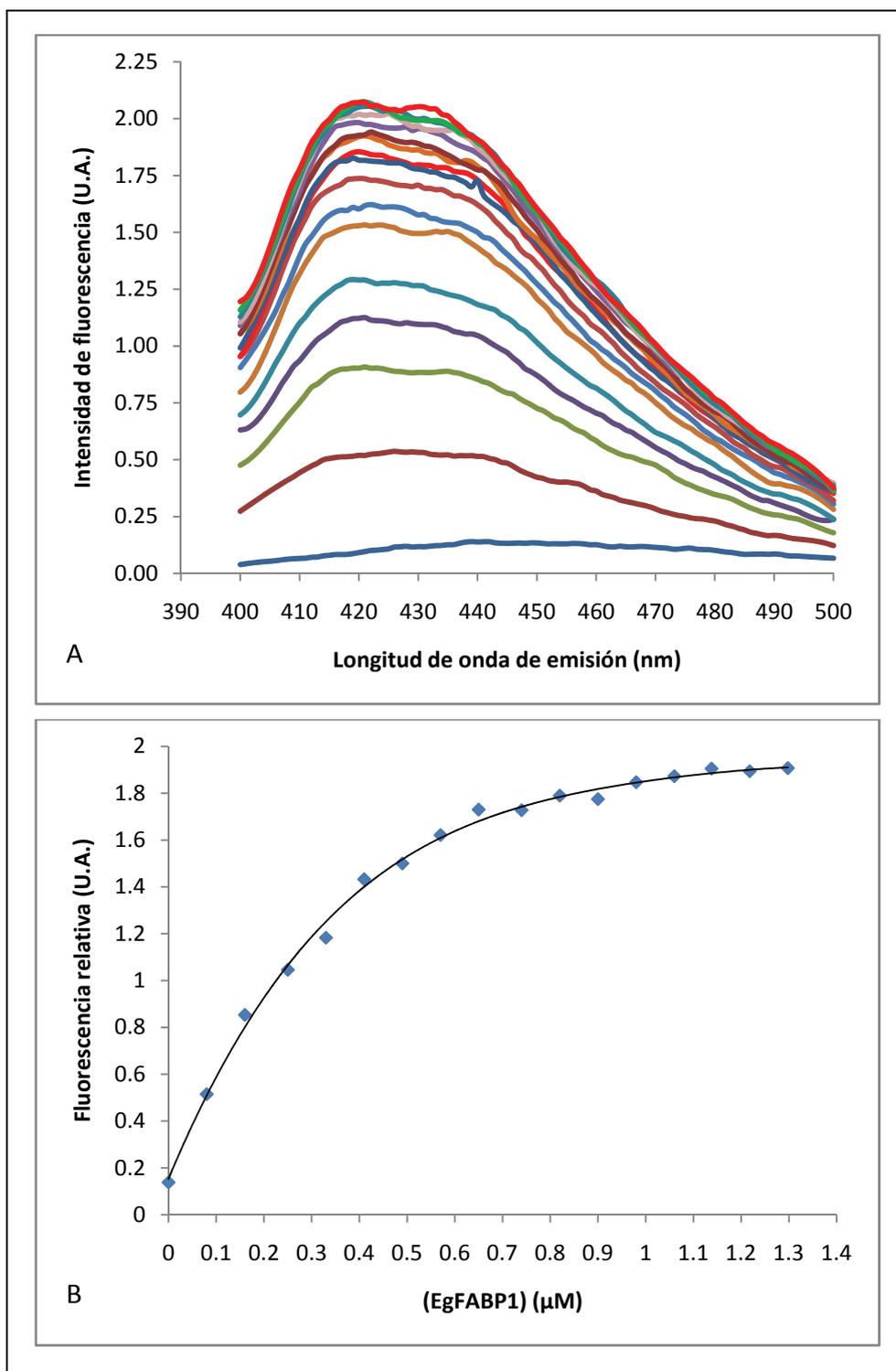


Figura 50. Titulación fluorimétrica del análogo fluorescente de ácido esteárico 12AS. A) Espectro de emisión del 12AS unido a rEgFABP1. Se monitorean los cambios en la fluorescencia relativa del 12AS desde 400 a 500 nm luego de la excitación a 383 nm. B) Los cambios en la fluorescencia relativa del 12AS se registran a 440 nm para construir la isoterma de unión del complejo rEgFABP1-12AS. La línea es la curva de unión teórica para la formación del complejo. Se muestra un experimento representativo de cuatro. U.A.: unidades arbitrarias.

5.2.1.2. Determinación del coeficiente de partición relativo (K_p)

El coeficiente de partición aparente que describe la distribución relativa del 12AS entre rEgFABP1 y EPC-SUVs (vesículas unilamelares pequeñas de fosfatidilcolina de huevo) se determina agregando SUVs conteniendo NBD-PC (N-(7-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazol-4-yl)-fosfatidilcolina) a una solución del complejo 12AS:rEgFABP1. Se obtiene para rEgFABP1 un valor de K_p de 0.48 ± 0.23 utilizando la ecuación 2 descrita en Materiales y métodos, esto indicaría que existe una preferencia del 12AS por las membranas fosfolipídicas.

5.2.1.3. Efecto de la concentración de las vesículas en la transferencia del 12AS desde las FABPs a membranas

El paso limitante en el mecanismo de transferencia colisional es la interacción proteína-membrana, y la tasa de transferencia aumenta a medida que aumenta la concentración de las membranas aceptoras (Córsico et al., 1998; Córscico et al., 2005; Falomir-Lockhart et al., 2006; Franchini et al., 2008). En cambio, en el mecanismo difusional en donde el paso limitante de la velocidad es la disociación del complejo proteína-ligando, no se observan cambios en la tasa de transferencia al variar la concentración de las vesículas (De Gerónimo et al., 2003; Córscico et al., 2004). Los valores de K_d y K_p (cuando se pueden calcular) son usados para establecer las condiciones para el ensayo de transferencia. Se calcula la proporción de proteína y ligando, de manera tal que en la solución de proteína y ligando preincubada, la mayoría del ligando se encuentre unido a la proteína, quedando menos del 1% del 12AS libre. El valor de K_p se utiliza para establecer las concentraciones de proteína y SUVs que aseguran la transferencia unidireccional.

Cuando concentraciones constantes del complejo donador rEgFABP1-12AS se mezclan con concentraciones crecientes de EPC-SUVs observamos que la tasa de transferencia del 12AS, desde rEgFABP1 hacia EPC-SUVs, aumenta proporcionalmente a la concentración de las vesículas en el rango de SUVs:rEgFABP1 utilizado (10:1 a 40:1) (Figura 51). En estas condiciones, el aumento en la tasa de transferencia varía desde $0.04 \pm 0.01 \text{ seg}^{-1}$ hasta $0.12 \pm 0.03 \text{ sec}^{-1}$. Estos resultados sugieren que la transferencia del ácido graso desde rEgFABP1 a las membranas fosfolipídicas se lleva a cabo a través de la interacción directa proteína-membrana en lugar de la difusión del ligando en la fase acuosa.

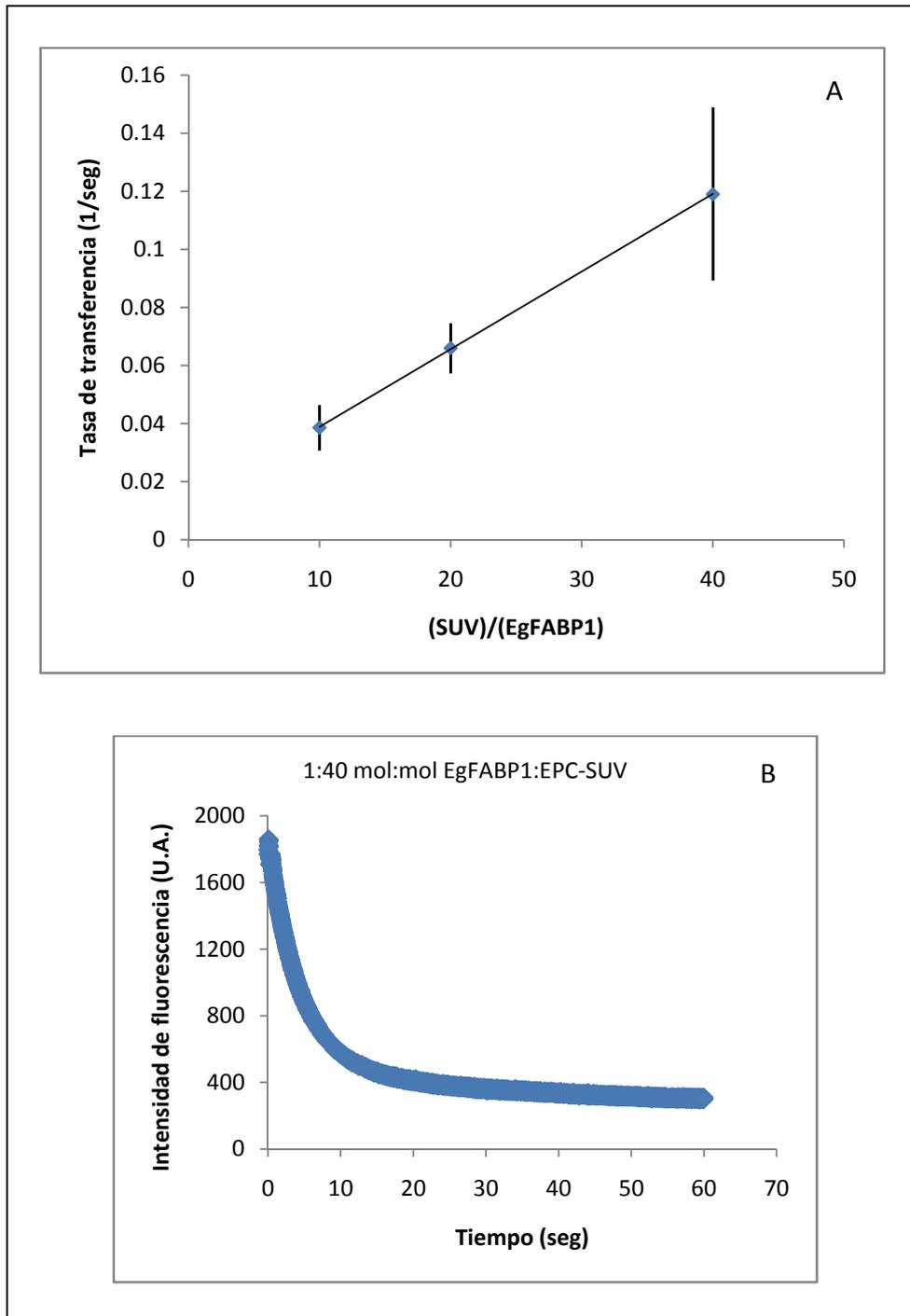


Figura 51. Efecto de la concentración de las membranas aceptoras en la transferencia del 12AS desde rEgFABP1 hacia las SUVs EPC/NBD-PC. A) Se agregan SUVs en un rango desde 1:10 mol:mol a 1:40 mol:mol rEgFABP1:SUVs al complejo 15:1 mol:mol rEgFABP1:12AS. La tasa de transferencia de ácido graso es monitoreada directamente mediante la disminución de la fluorescencia dependiente del tiempo del grupo antroiloxi. Se muestra el promedio de cuatro experimentos diferentes \pm la desviación estándar. B) Ejemplo de la curva cinética obtenida, se mezcla el complejo rEgFABP1-12AS con membranas que contienen EPC/NBD-PC. U.A.: unidades arbitrarias.

A continuación aplicamos los ensayos de FRET a rMvFABPa y rMvFABPb variando la concentración de las vesículas fosfolipídicas zwitteriónicas. En la Figura 52 se muestra que la tasa de transferencia del 12AS desde rMvFABPa hacia EPC-SUVs, aumenta con el incremento de la concentración de las vesículas en el rango de SUVs:FABP utilizado (10:1 a 40:1). Por otro lado, se observa un aumento muy suave pero estadísticamente significativo ($p < 0.01$, TTEST) de la tasa de transferencia de ligando desde rMvFABPb hacia concentraciones crecientes de EPC-SUVs. A partir de estos experimentos podemos sugerir que la transferencia del ligando desde rMvFABPa hacia las vesículas zwitteriónicas ocurriría vía un mecanismo colisional fuerte, mientras que rMvFABPb, al mostrar velocidades de transferencia más lentas e incrementos menores, presentaría un mecanismo de transferencia colisional débil.

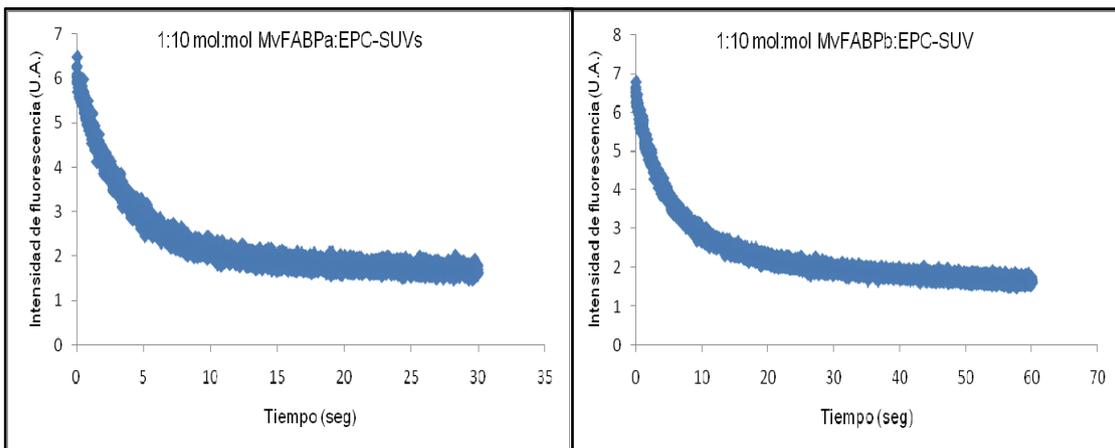
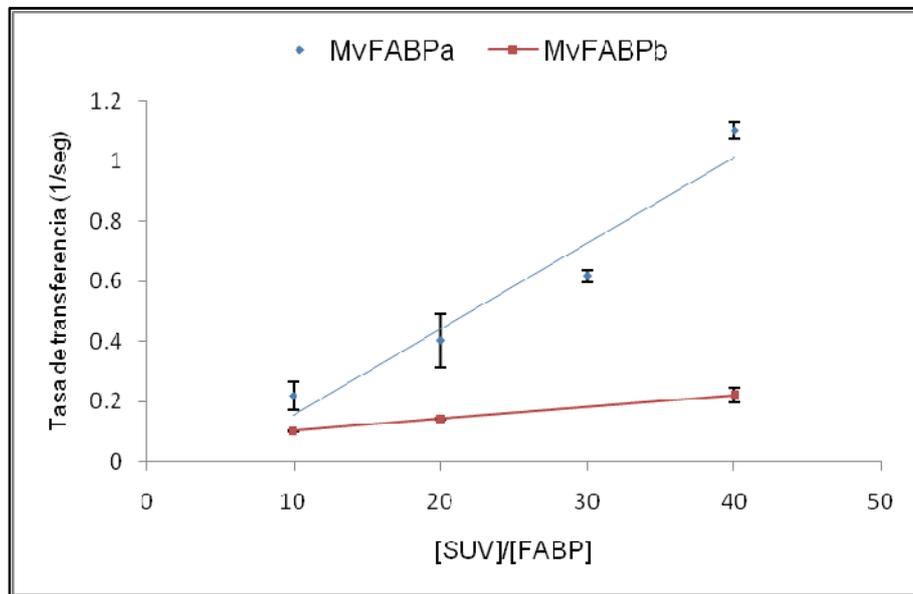


Figura 52. Efecto de la concentración de las membranas aceptoras en la transferencia del 12AS desde rMvFABPa y rMvFABPb hacia las SUVs EPC/NBD-PC. Se agregan SUVs en un rango desde 1:10 mol:mol a 1:40 mol:mol rMvFABP:SUVs al complejo

15:1 mol:mol rMvFABPa:12AS y rMvFABPb:12AS. La tasa de transferencia de ácido graso es monitoreada directamente mediante la disminución de la fluorescencia dependiente del tiempo del grupo antroiloxi. La figura superior muestra el promedio de tres experimentos diferentes \pm la desviación estándar. Las figuras inferiores representan un ejemplo de la curva cinética obtenida cuando se mezcla el complejo rMvFABPa-12AS o rMvFABPb-12AS con membranas que contienen EPC/NBD-PC. U.A.: unidades arbitrarias.

5.2.1.4. Efecto de la carga de las vesículas en la transferencia del 12AS desde las FABPs a membranas

Si consideramos que el mecanismo de transferencia de ligando de las tres FABPs en estudio ocurre a través del contacto colisional con membranasceptoras, entonces los cambios en las propiedades físicoquímicas de las membranas deberían modificar la tasa de transferencia. En cambio si el mecanismo de transferencia se basara únicamente en la difusión acuosa del ligando, las características de las membranasceptoras no afectarían la tasa de transferencia del ligando ya que el paso determinante de la velocidad sería un evento físicoquímicamente distinto del proceso que involucra a la membrana.

En la figura 53 se muestra que la tasa de transferencia del 12AS desde rEgFABP1 hacia las membranasceptoras aumenta cuando estas vesículas contienen 25% de fosfolípidos cargados negativamente (fosfatidilserina: PS; cardiolipina: CL). rEgFABP1 presenta un gran aumento en la tasa de transferencia de ácido graso hacia las vesículas CL comparada con las vesículas zwitteriónicas. El mismo comportamiento ha sido reportado previamente para las FABPs colisionales de mamíferos (Córsico et al., 1998; Córsico et al., 2005; Falomir-Lockhart et al., 2006; Franchini et al., 2008).

A posteriori, profundizamos el estudio del efecto de la carga de las vesículas en el mecanismo de transferencia del ligando, analizando el cambio en la tasa de transferencia con concentraciones crecientes de vesículasceptoras cargadas negativamente. Observamos que al aumentar la concentración de las SUVs negativas aumenta la tasa de transferencia del ácido graso (Figura 54), confirmando así que el mecanismo de transferencia de ligando desde rEgFABP1 a membranas fosfolipídicas involucra interacciones directas proteína-membrana. Como la cardiolipina presenta doble carga negativa el efecto de la carga y concentración de las SUVs en la tasa de transferencia del ligando es muy notorio.

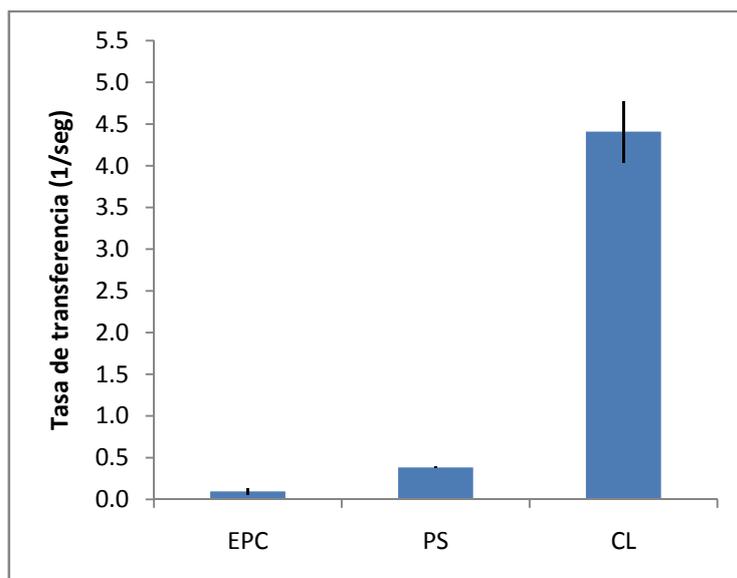


Figura 53. Efecto de la carga de las membranasceptoras en la tasa de transferencia del 12AS desde la rEgFABP1 hacia las SUVs. Se mide la tasa de transferencia desde el complejo rEgFABP1:12AS (15:1 mol:mol) hacia 1:20 mol:mol de EPC/NBD-PC SUVs (vesículas zwitteriónicas), conteniendo 25 mol % de PS (una carga negativa), o 25 mol % de CL (doble carga negativa). Se muestran los promedios de dos experimentos diferentes \pm desviación estándar.

El mismo estudio se realizó para rMvFABPa y rMvFABPb utilizando en estos casos las vesículas EPC/NBD-PC conteniendo 25% mol de cardiolipina. En la Figura 55 se aprecia que tanto rMvFABPa como rMvFABPb presentan un gran aumento en la tasa de transferencia de ácido graso hacia las vesículas CL comparada con las vesículas zwitteriónicas. Asimismo, al aumentar la concentración de las SUVs negativas aumenta la tasa de transferencia del ligando. Nuevamente observamos diferencias entre estas dos proteínas ya que la velocidad de transferencia del ligando, al incrementar las vesículas cargadas negativamente, presenta un mayor aumento para rMvFABPb que para rMvFABPa.

Por un lado, el comportamiento de rMvFABPa y rMvFABPb apoya el hecho de que estas proteínas poseen un mecanismo de transferencia de ligando del tipo colisional, donde las características fisicoquímicas de las membranas son relevantes para la interacción proteína-membrana y por lo tanto modifican la tasa de transferencia del ácido graso. Sin embargo, rMvFABPb parecería poseer un comportamiento dual dependiente del tipo de membrana fosfolipídica con que se encuentre, de forma tal

que presentaría un mecanismo de transferencia del tipo colisional fuerte al transferir el ligando a las vesículas negativas mientras que adoptaría un mecanismo del tipo colisional débil para entregar el ligando a las vesículas neutras.

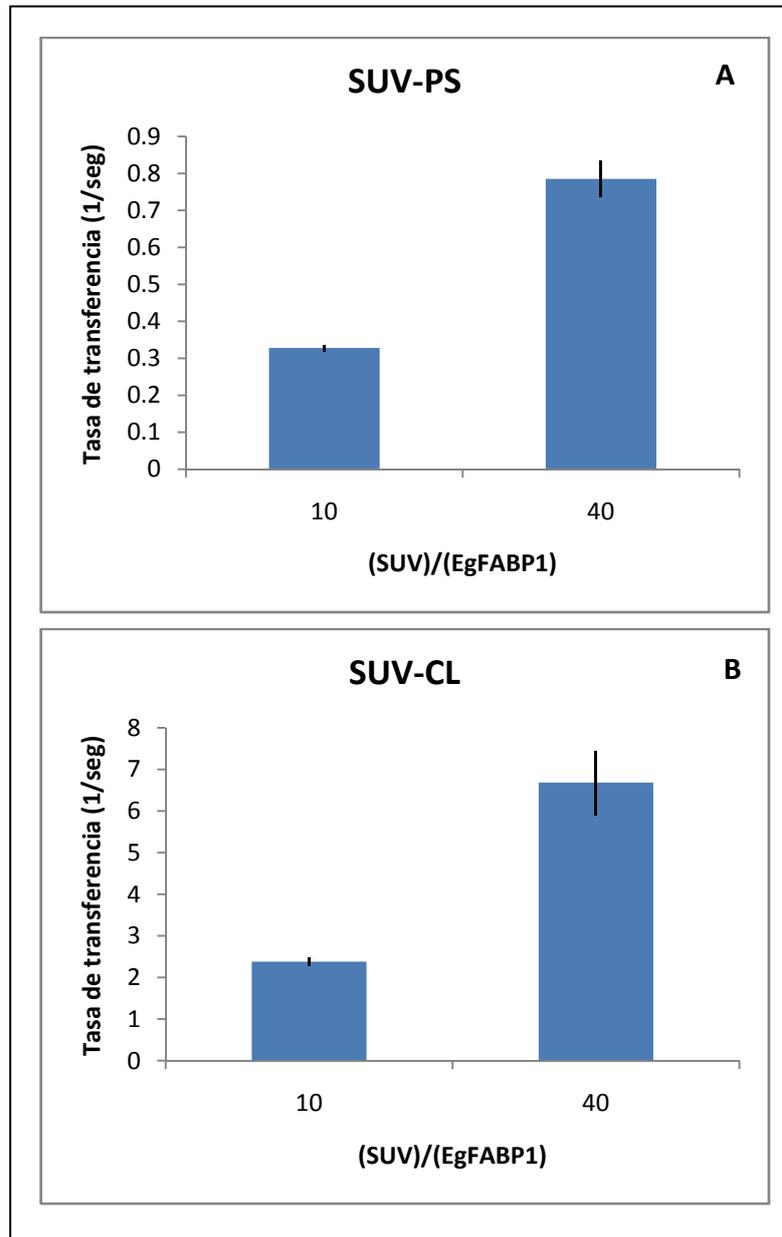


Figura 54. Efecto de la concentración de las membranasceptoras en las tasas de transferencia del 12AS desde rEgFABP1 hacia las SUVs cargadas. Se mide la tasa de transferencia desde el complejo rEgFABP1:12AS (15:1 mol:mol) hacia 1:10 mol:mol o 1:40 mol:mol de rEgFABP1:SUVs EPC/NBD-PC conteniendo ya sea (A) 25 mol % PS o (B) 25 mol % CL. Se muestra el promedio de dos experimentos diferentes \pm desviación estándar.

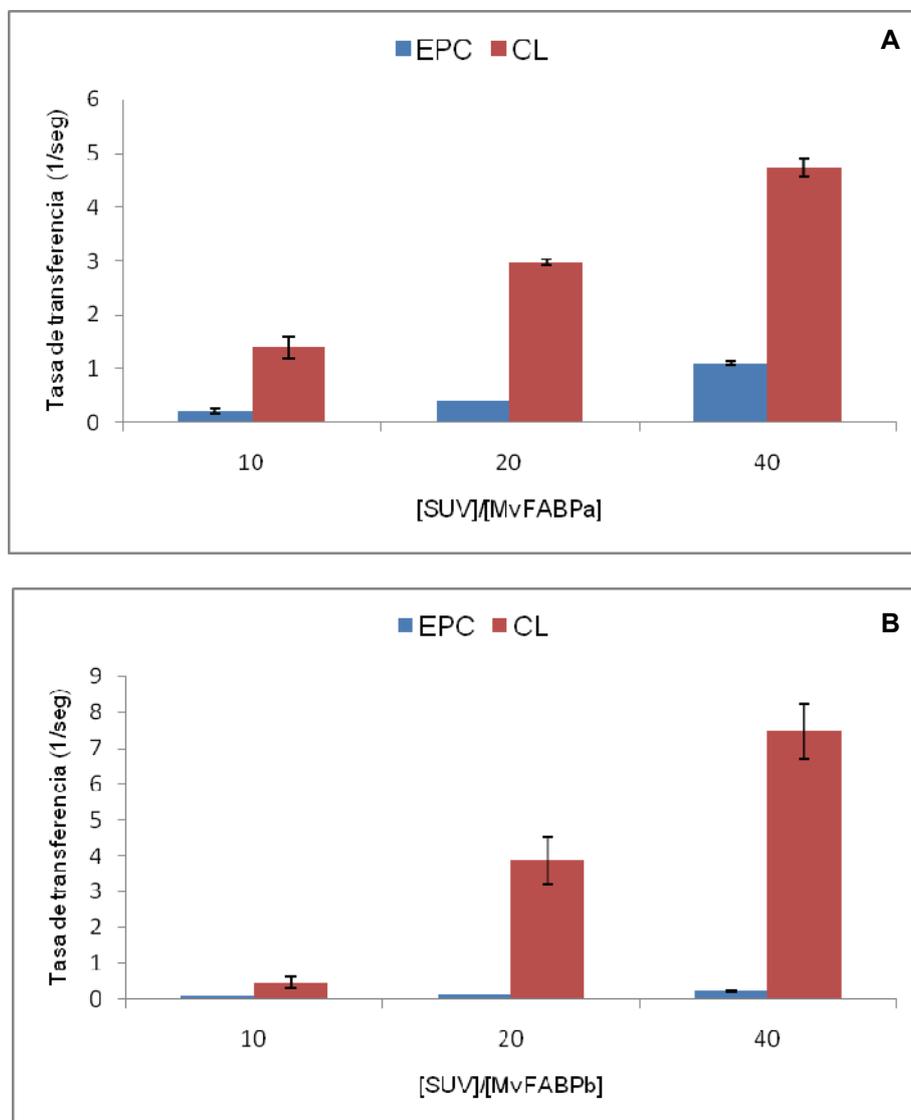


Figura 55. Efecto de la carga y concentración de las vesículas fosfolipídicas en las tasas de transferencia del 12AS desde rMvFABPa y b hacia las SUVs cargadas. Se mide la tasa de transferencia desde el complejo (A) rMvFABPa:12AS o (B) rMvFABPb:12AS (15:1 mol:mol) hacia 1:10, 1:20, o 1:40 mol:mol de rMvFABP:SUVs EPC/NBD-PC conteniendo 25 mol % CL. Se muestra el promedio de dos experimentos diferentes \pm desviación estándar.

5.2.1.5. Efecto de la fuerza iónica en la transferencia del 12AS desde las FABPs a membranas

Continuamos estudiando la tasa de transferencia del 12AS desde las FABPs en estudio hacia las membranas fosfolipídicas cuando se aumenta la concentración de cloruro de sodio (NaCl). Generalmente se postula que a medida que aumenta la fuerza iónica del medio, disminuirían las interacciones electroestáticas a nivel de superficie mientras que las interacciones hidrofóbicas serían estimuladas. La Figura 56A muestra un aumento importante en la tasa de transferencia del ligando desde rEgFABP1 hacia las membranas neutras a medida que aumenta la fuerza iónica del medio. El efecto de la fuerza iónica en la tasa de transferencia del 12AS desde rEgFABP1 hacia las vesículas zwitteriónicas sugiere que la eliminación de interacciones electroestáticas es compensada por un aumento en las interacciones hidrofóbicas.

Cuando las vesículasceptoras están cargadas negativamente, se observa una drástica caída en la tasa de transferencia a concentraciones salinas altas (Figura 56B). Como se muestra en la figura 53, rEgFABP1 exhibe un aumento de aproximadamente 60 veces en la tasa de transferencia del 12AS hacia las vesículas CL a baja fuerza iónica al comparar con las vesículas neutras. Luego de aumentar la fuerza iónica, se observa una marcada disminución de los altos valores observados a baja fuerza iónica (Figura 56B). Este comportamiento sugiere un enmascaramiento de las interacciones electroestáticas causado por el alto contenido de sales del amortiguador. Estas interacciones electroestáticas jugarían un rol importante a baja fuerza iónica.

De forma similar estudiamos el efecto de la fuerza iónica del medio en la tasa de transferencia del 12AS desde rMvFABPa y rMvFABPb hacia vesículas neutras y cargadas negativamente. La figura 57 muestra que las tasas de transferencia del ligando desde rMvFABPa y rMvFABPb hacia las SUVs zwitteriónicas prácticamente no varían al aumentar la concentración de NaCl. Sin embargo, las tasas de transferencia hacia las SUVs negativas muestran una disminución al aumentar la fuerza iónica del medio.

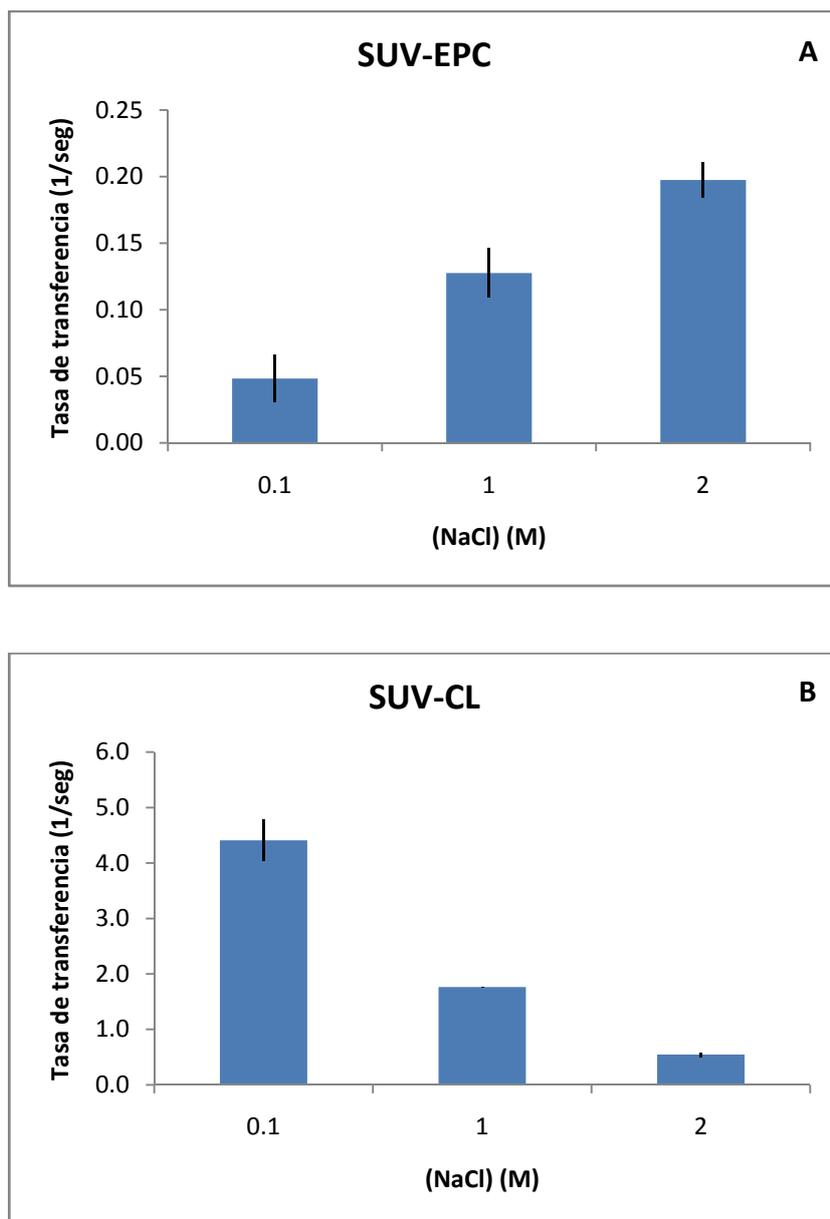


Figura 56. Efecto de la fuerza iónica del amortiguador en la tasa de transferencia del 12AS desde rEgFABP1 hacia las SUVs. Se miden las tasas de transferencia desde el complejo rEgFABP1:12AS (15:1 mol:mol) hacia 1:20 mol:mol de rEgFABP1:SUVs EPC/NBD-PC (A) o SUVs EPC/NBD-PC conteniendo 25 mol % CL (B) en presencia de concentraciones crecientes de NaCl. Se muestra el promedio de cuatro experimentos diferentes \pm desviación estándar (excepto los datos correspondientes a 2M NaCl, que provienen de dos experimentos independientes).

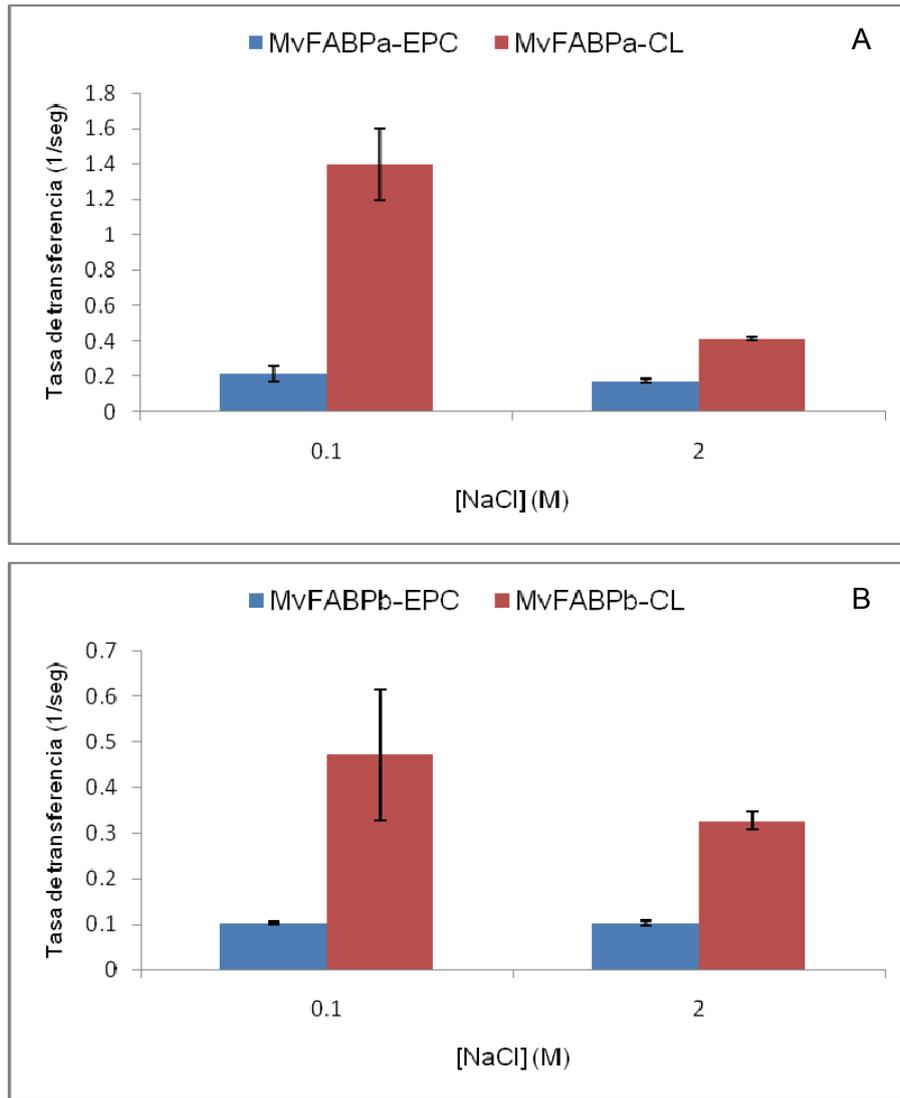


Figura 57. Efecto de la fuerza iónica del amortiguador en la tasa de transferencia del 12AS desde rMvFABPa o rMvFABPb hacia las vesículas aceptoras. Se miden las tasas de transferencia desde el complejo rMvFABPa:12AS (A) o rMvFABPb:12AS (B) (15:1 mol:mol) hacia 1:10 mol:mol de rMvFABP:SUVs EPC/NBD-PC (azul) o SUVs EPC/NBD-PC conteniendo 25 mol % CL (rojo) en presencia de concentraciones crecientes de NaCl. Se muestra el promedio de dos experimentos diferentes \pm desviación estándar.

La disminución en la tasa de transferencia de ligandos de rMvFABPb, hacia las membranas negativas, si bien es significativa ($p < 0.01$, TTEST), es menor que la de rMvFABPa. Esto nos podría sugerir que rMvFABPa presenta un comportamiento similar a rEgFABP1 donde las interacciones electrostáticas proteína-membrana serían muy relevantes a baja fuerza iónica. Un comportamiento diferente presenta MvFABPb, ya que la figura 57B indicaría que las interacciones electrostáticas proteína-membrana no serían muy importantes a baja fuerza iónica, esta hipótesis

también se apoya en la Figura 52 donde rMvFABPb presenta un menor aumento de la tasa de transferencia al aumentar la concentración de las SUVs neutras. En estas condiciones postulamos la existencia de un mecanismo de transferencia colisional débil, tal como se menciona anteriormente. Recordemos que la figura 55B señala un gran aumento en la tasa de transferencia al aumentar la concentración de vesículas cargadas negativamente que indicaría que las interacciones electroestáticas proteína-membrana jugarían un rol importante ante la presencia de este tipo de membranasceptoras, en estas condiciones la proteína adoptaría un mecanismo de transferencia colisional fuerte. Además, rMvFABPb podría presentar, frente a las vesículas negativas, interacciones proteína-membrana de naturaleza hidrofóbica, que son evidenciadas al neutralizarse las interacciones electroestáticas a alta fuerza iónica, ya que la tasa de transferencia no presenta una disminución importante al aumentar la concentración salina (Figura 57B).

5.2.1.6. Análisis de los potenciales electroestáticos de superficie

En base a los resultados precedentes, decidimos abordar el análisis de los potenciales electroestáticos de superficie para poder explicar el comportamiento diferencial de las rMvFABPs, y en particular entender por qué rMvFABPb adoptaría distintos tipos de mecanismos colisionales al cambiar las propiedades físicoquímicas de las membranasceptoras. La figura 58 muestra claramente diferencias en los potenciales del dominio helical que estaría involucrado en la interacción proteína-membrana. Trabajos previos reportan que tanto la hélice α -I como la α -II serían importantes para el establecimiento de las interacciones electroestáticas presentes en el mecanismo colisional; en particular los aminoácidos cargados positivamente como las Lys, interaccionarían con las cargas negativas de las membranas fosfolipídicas (Falomir-Lockhart et al., 2006; Franchini et al., 2008). Se ha propuesto un modelo donde se daría un paso inicial de interacciones electroestáticas entre la región alfa helical y la membrana seguido de un cambio conformacional que promovería la salida del ligando desde el sitio de unión hacia la membrana (Córsico et al., 1998; Falomir-Lockhart et al., 2006; Franchini et al., 2008). Estudios más recientes sugieren una ampliación de este mecanismo donde luego de la interacción de la región alfa helical tendría lugar el contacto del barril beta con la membrana (Falomir-Lockhart et al., 2011).

Si bien MvFABPa presenta una densidad de carga mayormente positiva en la región helical que le permitiría llevar a cabo interacciones electroestáticas con las membranas, MvFABPb muestra un potencial electrostático positivo más fuerte. Los principales residuos aminoacídicos responsables del intenso potencial positivo de rMvFABPb serían Arg 21 y His 22 (en hélice α -I), Arg 30 y Lys 31 (en hélice α -II). También se encuentran residuos en zonas cercanas a la región helical que contribuyen con su carga a la intensa nube positiva, ellos serían Lys 9 y Lys 12 (en cadena β A), Lys 37 (vuelta hélice α II-cadena β B), Lys 59 (cercana a giro β C- β D) y Arg 79 (cercana a giro β E- β F). Aplicando el mismo análisis a MvFABPa determinamos que la Arg 21 y la Lys 31 están ausentes, existiendo una Gln en estas dos posiciones, produciéndose así un potencial menos positivo que en MvFABPb. Sin embargo, MvFABPa presenta una Lys 22. Por otro lado, los residuos cercanos, que contribuyen con la carga de la región en estudio, estarían presentes: Lys 9, Lys 12, Lys 37, Lys 59 y Arg 79. La diferencia en la densidad de carga positiva presente en esta región podría ser la responsable de que MvFABPb establezca interacciones electroestáticas débiles ante la presencia de membranas neutras y que las mismas se vean fuertemente potenciadas frente a membranas negativas. Estas interacciones de alta intensidad podrían establecerse gracias a la gran densidad de carga positiva en la región helical y de carga negativa en las membranas que contienen cardiolipina.

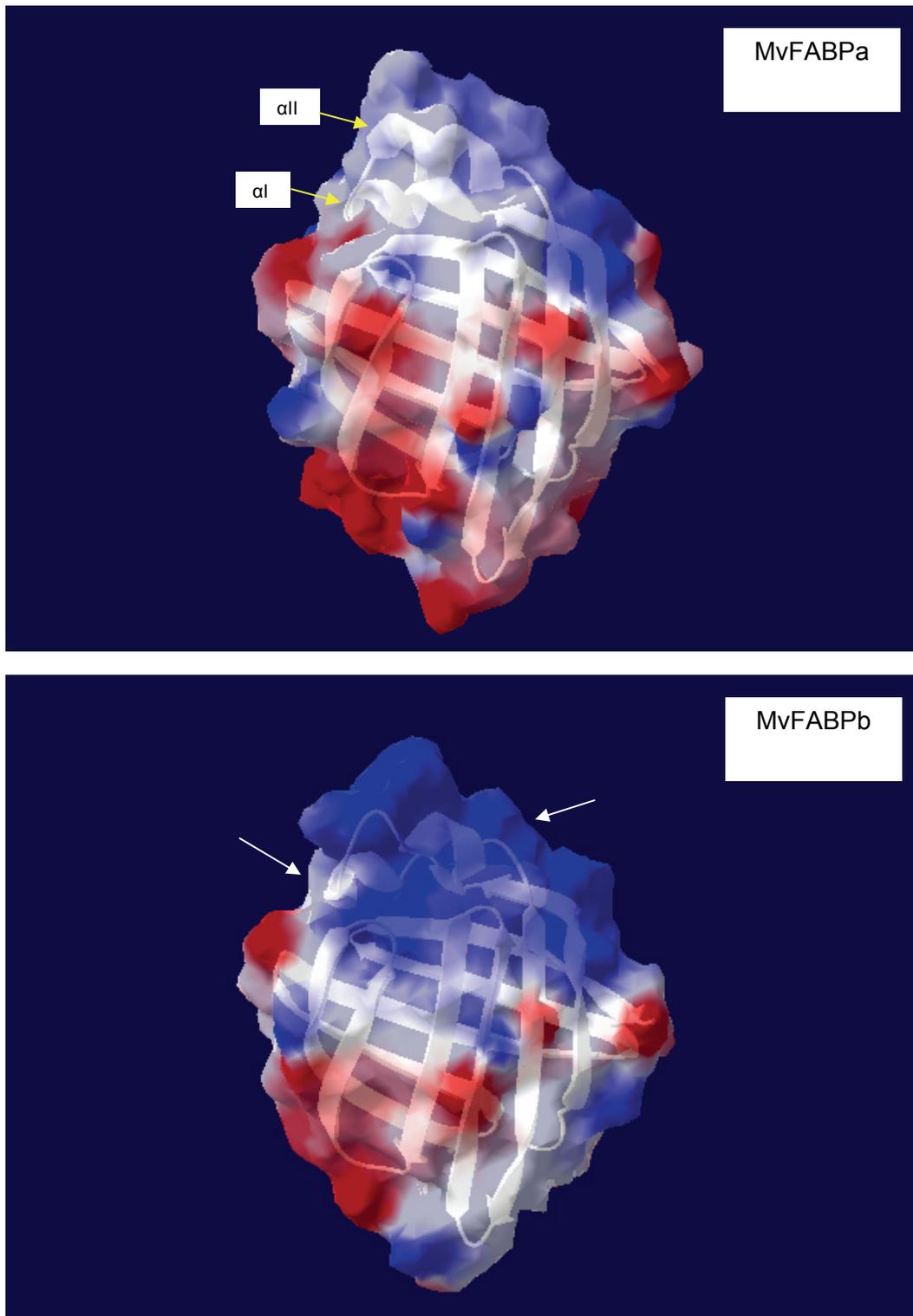


Figura 58. Comparación de los potenciales electrostáticos de superficies de MvFABPa y MvFABPb. Se utiliza el programa Swiss-PdbViewer 4.1.0 para generar los perfiles electrostáticos a partir de los modelos proteicos generados en el programa Moe, utilizando una simulación de 4 ns y a la proteína 1o8vA.pdb (EgFABP1) como molde. Se muestra la estructura secundaria y terciaria además de los potenciales. Los

colores rojo y azul indican carga negativa y positiva respectivamente. Las flechas amarillas y blancas señalan las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 11$ y la región portal, respectivamente.

5.2.2. Estudios de interacción FABP-proteína: ensayos de captura de ligandos

En esta instancia abordamos la búsqueda de las proteínas capaces de interactuar con las FABPs en estudio como otra aproximación a la dilucidación de la función de las proteínas de unión a ácidos grasos de cestodos. Con esta finalidad utilizamos dos estrategias experimentales, en primer lugar realizamos ensayos de captura de ligandos y luego estudios de inmunoprecipitación, e identificación mediante espectrometría de masa.

5.2.2.1. Clonado de los ADNc de las EgFABPs y MvFABPs en pQE y expresión de las proteínas recombinantes

Para realizar los ensayos de captura de ligandos con el kit disponible, es necesario obtener previamente las proteínas EgFABP1, EgFABP2, MvFABPa y MvFABPb en forma recombinante y pura, con una cola de Histidinas, que les permitan unirse a la matriz de las columnas del kit utilizado. Debido a este requerimiento comenzamos clonando el ADNc correspondiente a las regiones codificantes de EgFABP1, EgFABP2, MvFABPa y MvFABPb en el vector pQE-30. Realizamos reacciones de PCR a partir de los plásmidos pKS-EgFABP1, pKS-EgFABP2, pJET1.2-MvFABPa y pET5a-MvFABPb, que contienen las regiones codificantes completas respectivas clonadas previamente. Se obtienen así fragmentos de ADN correspondientes a las cuatro regiones codificantes amplificadas flanqueadas por los sitios de restricción BamHI y HindIII (Figura 59). Los mismos se clonan en el vector pJET 1.2 para luego ser subclonadas en el vector pQE-30 y transformar así bacterias *E. coli* M15[pREP4]. Los clones seleccionados son secuenciados para verificar su identidad.

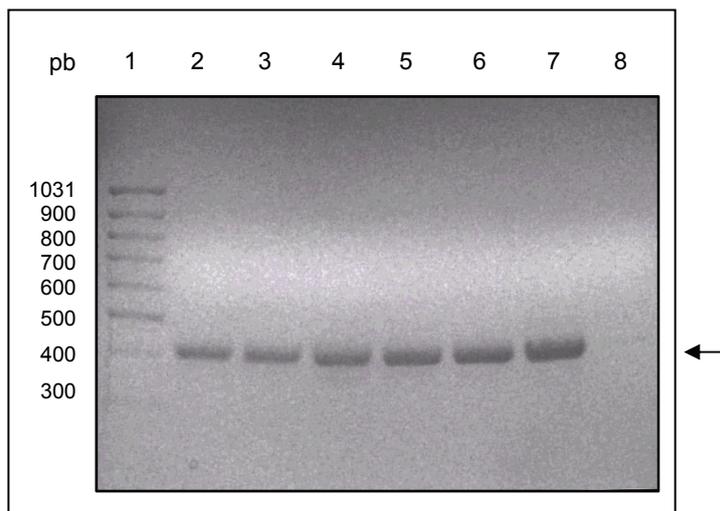


Figura 59. Amplificación de ADNc de EgFABP1, EgFABP2, MvFABPa y MvFABPb para ser clonados en el vector pQE. Visualización mediante electroforesis en agarosa 2% teñido con bromuro de etidio. 1) Marcador de peso molecular *Mass Ruler DNA ladder Low Range* (Fermentas); 2 y 3) producto de PCR de EgFABP1; 4 y 5) producto de PCR de EgFABP2; 6) producto de PCR de MvFABPa; 7) producto de PCR de MvFABPb; 8) control negativo de PCR de MvFABPb. Los controles negativos restantes tampoco amplifican (no se muestran).

Luego de obtener y verificar los clones recombinantes evaluamos la expresión y solubilidad de las proteínas recombinantes respectivas a 37° y 30°C, no observándose cambios sustanciales de expresión entre ambas temperaturas. Si bien la inducción de His-EgFABP1 y His-EgFABP2 en este sistema parece ser tenue e incluso nula, al separar la fracción soluble e insoluble observamos claramente la inducción de dichas proteínas (Figura 60). La proteína His-EgFABP1 es mayormente soluble mientras His-EgFABP2 permanece mayoritariamente en la fracción insoluble, como ocurre en otros sistemas de expresión (Figura 60). En una primera instancia pensamos que la fusión de las histidinas podría mejorar la solubilidad de EgFABP2 evitándose la formación de cuerpos de inclusión pero lamentablemente no ocurrió así. A partir de estos resultados decidimos no incluir en los ensayos posteriores a His-EgFABP2, ya que la proteína cebo tiene que ser soluble y estable para poder ser unida adecuadamente a la resina y mantenerse en este estado en forma estable en el tiempo.

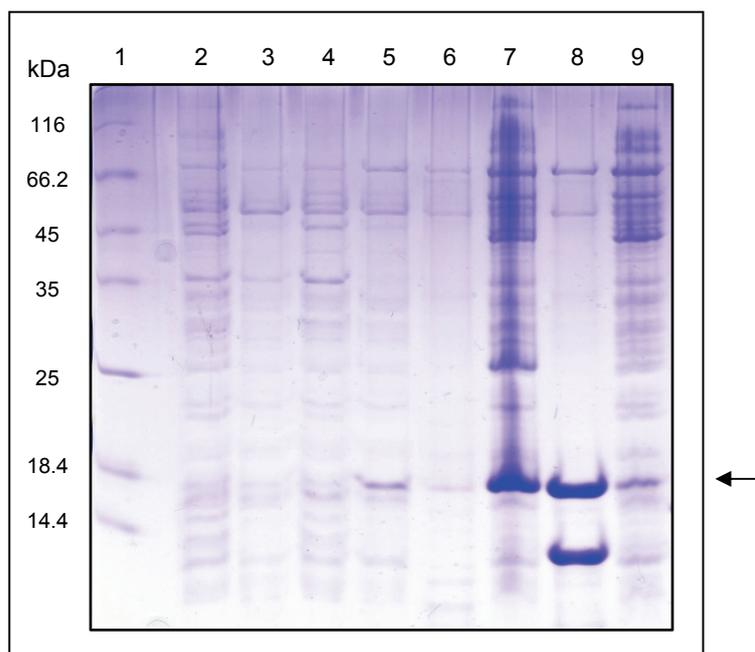


Figura 60. Inducción de EgFABP1 y EgFABP2 recombinantes, visualizada mediante SDS-PAGE 15% y tinción con *Coomassie brilliant blue*. 1) Marcador de peso molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas); 2) M15[pREP4]-pQE-EgFABP1 no inducido; 3) M15[pREP4]-pQE-EgFABP1 inducido; 4) M15[pREP4]-pQE-EgFABP2 no inducido; 5) M15[pREP4]-pQE-EgFABP2 inducido; 6) fracción insoluble de M15[pREP4]-pQE-EgFABP1 inducido; 7) fracción soluble de M15[pREP4]-pQE-EgFABP1 inducido; 8) fracción insoluble M15[pREP4]-pQE-EgFABP2 inducido; 9) fracción soluble de M15[pREP4]-pQE-EgFABP2 inducido. La flecha indica las proteínas recombinantes.

Con respecto a la expresión de His-MvFABPa y His-MvFABPb, observamos en la figura 61 que la proteína recombinante His-MvFABPa se encuentra mayoritariamente en la fracción soluble mientras His-MvFABPb se reparte en partes iguales entre las fracciones soluble e insoluble. De todas formas la cantidad de proteína soluble es suficiente para proseguir con su purificación. Probablemente, en el cultivo bacteriano que expresa His-MvFABPb, coexistan dos o más poblaciones de esta proteína que difieren en su estructura, posiblemente las conformaciones mal plegadas precipiten formando cuerpos de inclusión.

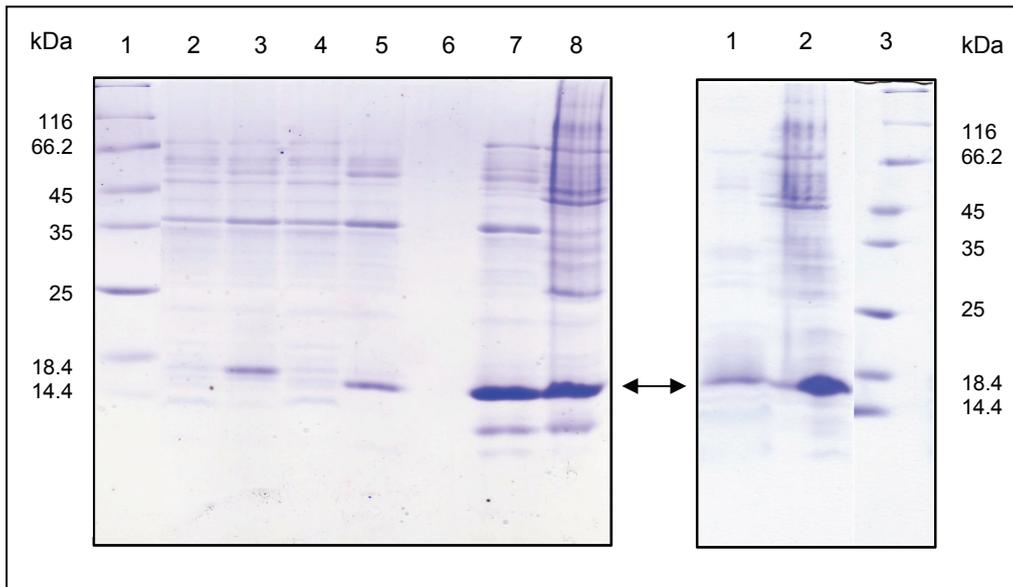


Figura 61. Inducción de MvFABPa y MvFABPb recombinantes, visualizada mediante SDS-PAGE 15% y tinción con *Coomassie brilliant blue*. A: 1) Marcador de peso molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas); 2) M15[pREP4]-pQE-MvFABPa no inducido; 3) M15[pREP4]-pQE-MvFABPa inducido; 4) M15[pREP4]-pQE-MvFABPb no inducido; 5) M15[pREP4]-pQE-MvFABPb inducido; 7) fracción insoluble de M15[pREP4]-pQE-MvFABPb inducido; 8) fracción soluble de M15[pREP4]-pQE-MvFABPb inducido. B: 1) fracción insoluble M15[pREP4]-pQE-MvFABPa inducido; 2) fracción soluble de M15[pREP4]-pQE-MvFABPa inducido; 3) Marcador de peso molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas). La flecha señala a las proteínas recombinantes respectivas.

5.2.2.2. Purificación de His-EgFABP1, His-MvFABPa y His-MvFABPb

Luego de evaluar el nivel de expresión de las proteínas recombinantes procedemos a la purificación de las mismas mediante cromatografía de afinidad utilizando columnas con Ni^{2+} -NTA-Agarosa, tal como se describe en materiales y métodos. La figura 62 muestra los resultados de la purificación de His-EgFABP1.

N° tubo	Amortig. (AS)	Abs 280 nm
Perc		1.78
1	AS	1.77
2		1.61
3		1.088
4		0.323
5		0.104
6		0.03
7		0.08
8		0
9	AS,10 mM I	0.044
10		1.32
11		0.239
12		0.112
13		0.06
14		0.041
15		0.022
16		0.006
17		0.005
18	AS,40 mM I	0.155
19		0.196
20		0.168
21		0.149
22		0.150
23		0.155
24		0.115
25		0.105
26		0.096
27		0.09
28		0.082
29		0.08
30		0.073
31		0.066
32		0.061
33		0.055
34	AS,100 mM I	0.095
35		0.112
36		0
37		0
38		0
39		0
40		0
41	AS,500 mM I	0
42		0

A

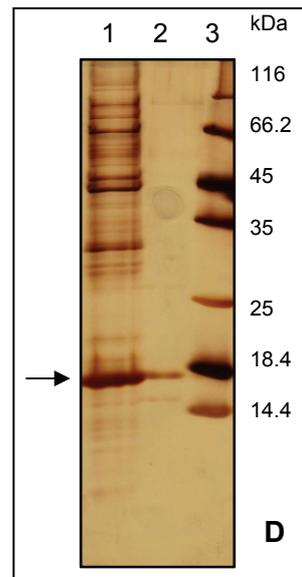
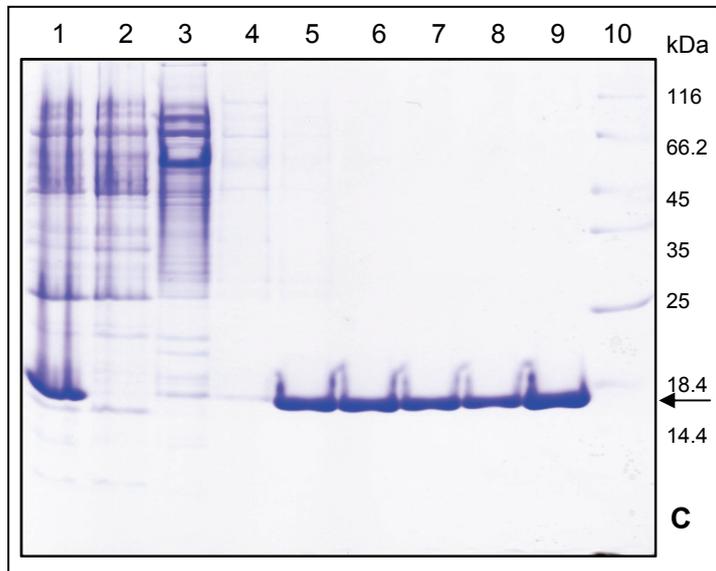
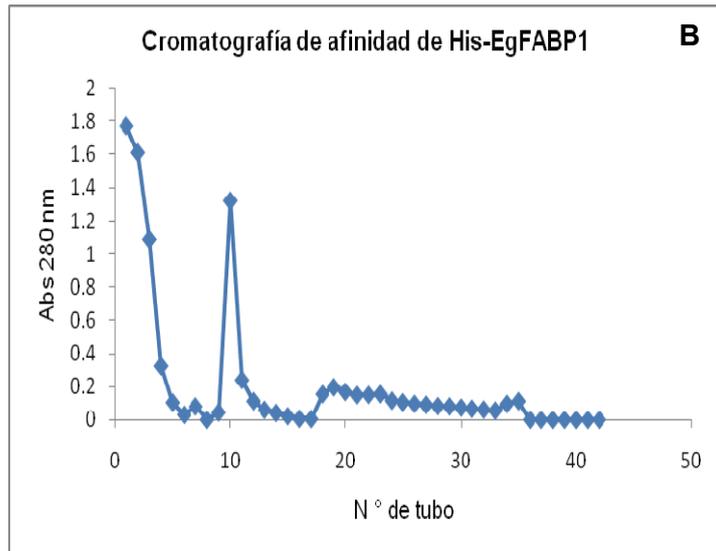
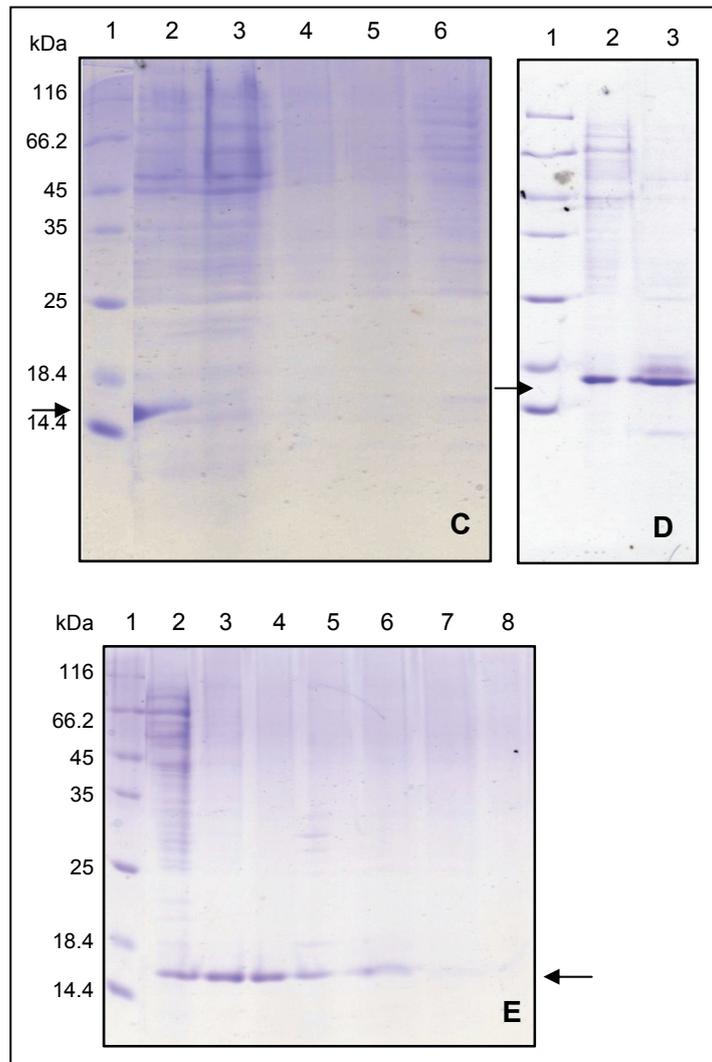
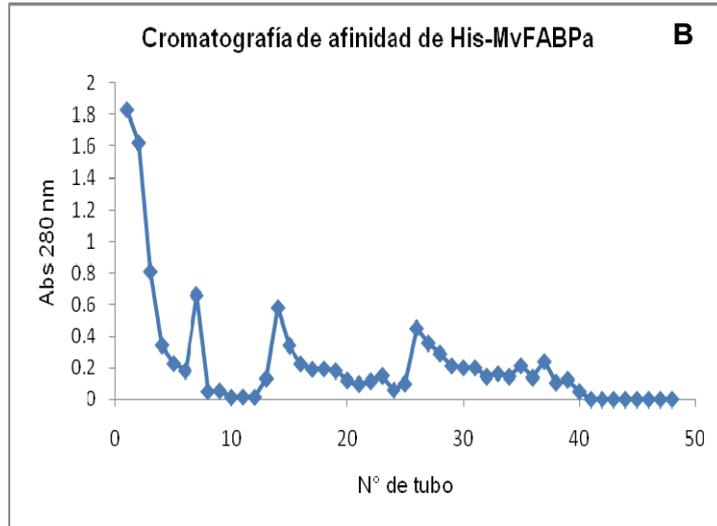


Figura 62. Purificación de His-EgFABP1 mediante cromatografía de afinidad. A y B muestran el seguimiento de la cromatografía mediante la medida de la absorbancia a 280 nm y el cromatograma, respectivamente. En C y D se evalúa la purificación mediante electroforesis SDS-PAGE al 15%, se utiliza tinción con *Coomassie brilliant blue* (C) y nitrato de plata (D). C: 1) Material de carga; 2) percolado; 3) tubo 10; 4) tubo 12; 5) tubo 19; 6) tubo 22; 7) tubo 25; 8) tubo 28; 9) tubo 35; 10) marcador de peso molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas). D: 1) tubo 18; 2) tubo 37; 3) *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas). Las flechas indican la presencia de la proteína recombinante. AS: amortiguador de sonicación; I: imidazol.

Decidimos reservar desde el tubo 20 hasta el 37 inclusive, estos tubos contienen a la proteína His-EgFABP1 purificada y corresponden a la elución con 40 mM de imidazol. A posteriori sometimos la muestra seleccionada a diálisis, concentración, cuantificación y volvimos a evaluar la pureza de la proteína mediante SDS-PAGE, para así poder ser usada como proteína cebo en los ensayos de captura de ligandos.

De forma similar purificamos a His-MvFABPa y a His-MvFABPb, los resultados se muestran en las figura 63 y 64. Respecto a la purificación de His-MvFABPa, se seleccionan desde el tubo 16 al 24, y desde el tubo 28 al 35 inclusive, ya que los tubos 26 y 27 presentan otras bandas proteicas tenues (Figura 63). Los tubos, conteniendo a la proteína recombinante purificada, corresponden a parte de la elución con 10 y 40 mM de imidazol. Probablemente las proteínas contaminantes eluyan con concentraciones de imidazol intermedias entre 10 y 40 mM ya que corresponden a la transición de estos amortiguadores. Para evitar la elución de los contaminantes con la proteína de interés tendríamos que prolongar la elución con 10 mM de imidazol. A posteriori, se aplica para His-MvFABPa el mismo procedimiento que para His-EgFABP1 y se guarda la proteína purificada para los ensayos posteriores.

N° tubo	Amortig. (AS)	Abs 280 nm
Perc		1.80
1	AS	1.83
2		1.62
3		0.81
4		0.342
5		0.227
6		0.181
7		0.66
8		0.05
9		0.055
10		0.013
11		0.015
12		0.013
13	AS,10 mM I	0.132
14		0.58
15		0.34
16		0.225
17		0.19
18		0.193
19		0.181
20		0.120
21		0.097
22		0.115
23		0.150
24		0.06
25		0.10
26	AS,40 mM I	0.45
27		0.356
28		0.290
29		0.212
30		0.200
31		0.200
32		0.145
33		0.164
34		0.145
35		0.213
36		0.138
37		0.24
38		0.106
39		0.125
40	AS,100 mM I	0.05
41		0
42		0
43	AS,250 mM I	0
44		0
45		0
46	AS,500 mM I	0
47		0
48		0



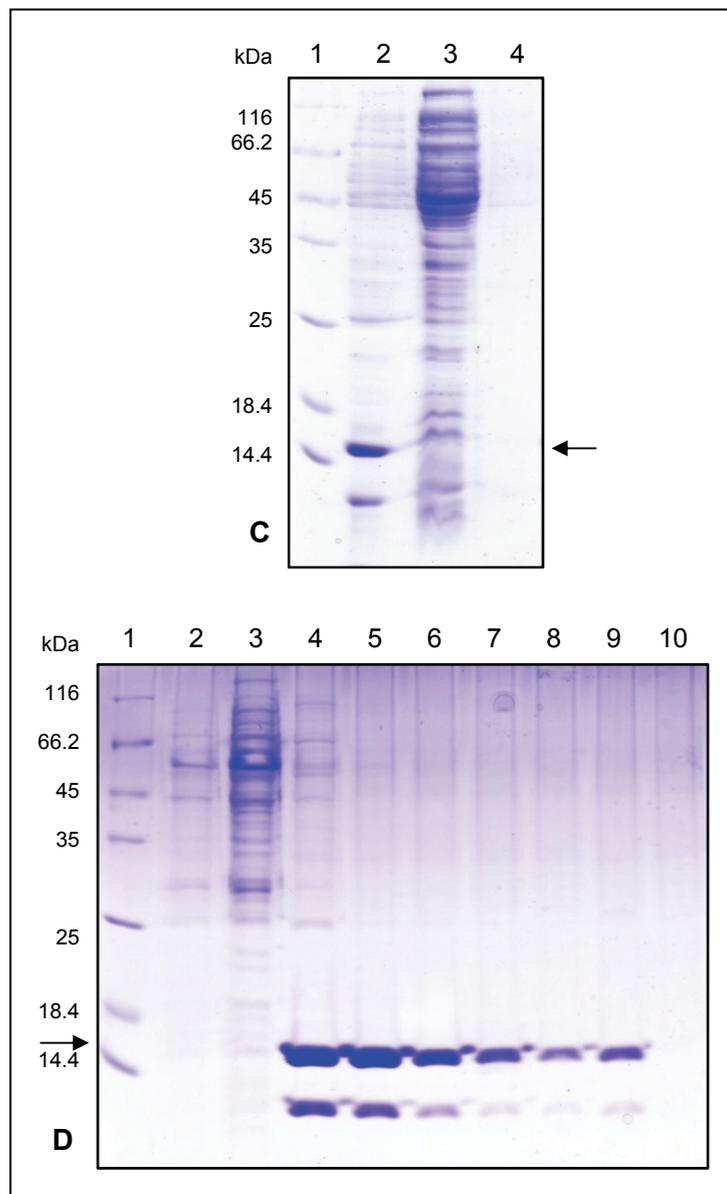
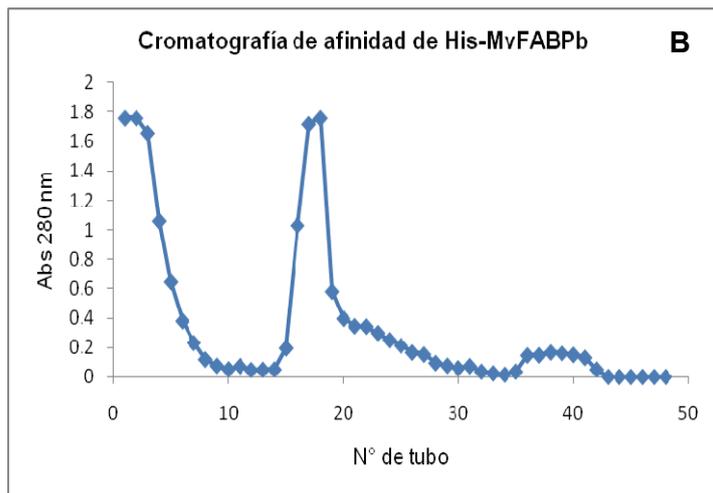
A

Figura 63. Purificación de His-MvFABPa mediante cromatografía de afinidad. A y B muestran el seguimiento de la cromatografía mediante la medida de la absorbancia a 280 nm y el cromatograma, respectivamente. En C, D y E se evalúa la purificación mediante electroforesis SDS-PAGE al 15% utilizándose tinción con *Coomassie brilliant blue*. C: 1) Marcador de peso molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas); 2) material de carga; 3) percolado; 4) tubo 4; 5) tubo 7; 6) tubo 13. D: 1) *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas); 2) tubo 15; 3) tubo 27. E: 1) *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas); 2) tubo 14; 3) tubo 17; 4) tubo 20; 5) tubo 26; 6) tubo 29; 7) tubo 32; 8) tubo 35. Las flechas indican la presencia de la proteína recombinante. AS: amortiguador de sonicación; I: imidazol.

Por último, purificamos a His-MvFABPb, conservando desde el tubo 22 al 38 inclusive, para el posterior ensayo de captura de ligando (Figura 64). La proteína His-MvFABPb eluye mayormente con 40 mM de imidazol. Cabe mencionar la presencia de una banda de menor tamaño y menor intensidad que también se aprecia en la inducción de la proteína recombinante (ver Figura 61). Dicha banda resultó ser reconocida por el anticuerpo contra MvFABPb puro utilizado anteriormente, mediante *Western Blot* (no se muestra). Por tal motivo, sugerimos que la misma podría resultar de una traducción incompleta debida, por ejemplo, a una pausa en este proceso. De todas formas dicho producto corresponde a MvFABPb, siendo así considerado junto con la proteína completa como proteína purificada.

En la figura 65 se aprecia a His-MvFABPa, His-MvFABPb y a His-EgFABP1 luego del proceso de purificación.

N° tubo	Amortig. (AS)	Abs 280 nm
Perc		1.77
1	AS	1.76
2		1.76
3		1.66
4		1.06
5		0.645
6		0.379
7		0.231
8		0.118
9		0.076
10		0.052
11		0.073
12		0.047
13		0.048
14		0.05
15	AS,40 mM I	0.195
16		1.03
17		1.72
18		1.76
19		0.58
20		0.395
21		0.344
22		0.342
23		0.298
24		0.25
25		0.212
26		0.166
27		0.152
28		0.094
29		0.076
30		0.059
31		0.073
32		0.035
33		0.024
34	AS,100 mM I	0.015
35		0.035
36		0.146
37		0.147
38		0.166
39		0.160
40		0.150
41		0.130
42		0.05
43		0
44		0
45	AS,250 mM I	0
46		0
47		0
48		0



A

Figura 64. Purificación de His-MvFABPb mediante cromatografía de afinidad. A y B muestran el seguimiento de la cromatografía mediante la medida de la absorbancia a 280 nm y el cromatograma, respectivamente. En C y D se evalúa la purificación mediante electroforesis SDS-PAGE al 15% utilizándose tinción con *Coomassie brilliant blue*. C: 1) Marcador de peso molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas); 2) material de carga; 3) percolado; 4) tubo 6. D: 1) *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas); 2) tubo 15; 3) tubo 16; 4) tubo 20; 5) tubo 25; 6) tubo 28; 7) tubo 31; 8) tubo 34; 9) tubo 36; 10) tubo 40. Las flechas indican la presencia de la proteína recombinante. AS: amortiguador de sonicación; I: imidazol.

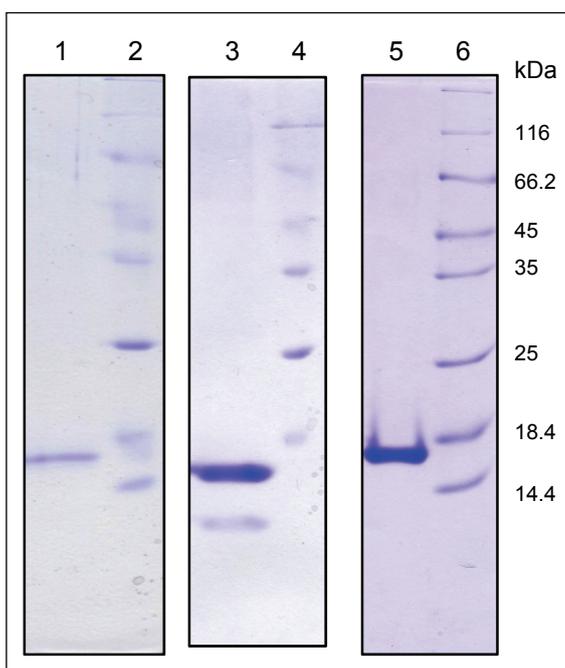


Figura 65. Evaluación de la pureza de las His-FABPs. 1) His-MvFABPa 5 µg, 3) His-MvFABPb 10 µg, 5) His-EgFABP1 10 µg; 2, 4 y 6) marcador de peso molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas).

5.2.2.3. Ensayos de captura de ligandos de EgFABP1

Para llevar a cabo estos ensayos es necesario inmovilizar a His-EgFABP1 pura (proteína “cebo”) en la resina quelada con cobalto e incubarla con el extracto proteico total de protoescóleccees conteniendo las posibles proteínas “presas” o interactuantes. A posteriori, se colecta la muestra no unida y se lava exhaustivamente para remover las proteínas que interactúan en forma inespecífica. Por último, se eluye el o los probables complejos “cebo-presa” con amortiguador conteniendo imidazol y se evalúan las muestras colectadas mediante SDS-PAGE. Esperamos así identificar, mediante espectrometría de masa, a aquellas bandas proteicas presentes en la elución que sean distintas de la proteína “cebo”. En todos los casos se realizan dos ensayos en paralelo, en uno de ellos nombrado control no se agrega proteína “cebo” a la resina

para comprobar la ausencia de pegado inespecífico de proteína a la misma. También se realizan tres réplicas de cada ensayo.

En la figura 66 se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de captura de ligandos con His-EgFABP1. Los eluatos obtenidos se concentran antes de ser evaluados mediante electroforesis para poder visualizar las posibles proteínas interactuantes que se encuentren en baja concentración. Observamos en la figura 66A carril 2 la presencia de una banda proteica de tamaño similar a His-EgFABP1 que probablemente se deba a la contaminación del carril 4 que presenta una banda muy fuerte correspondiente a dicha proteína.

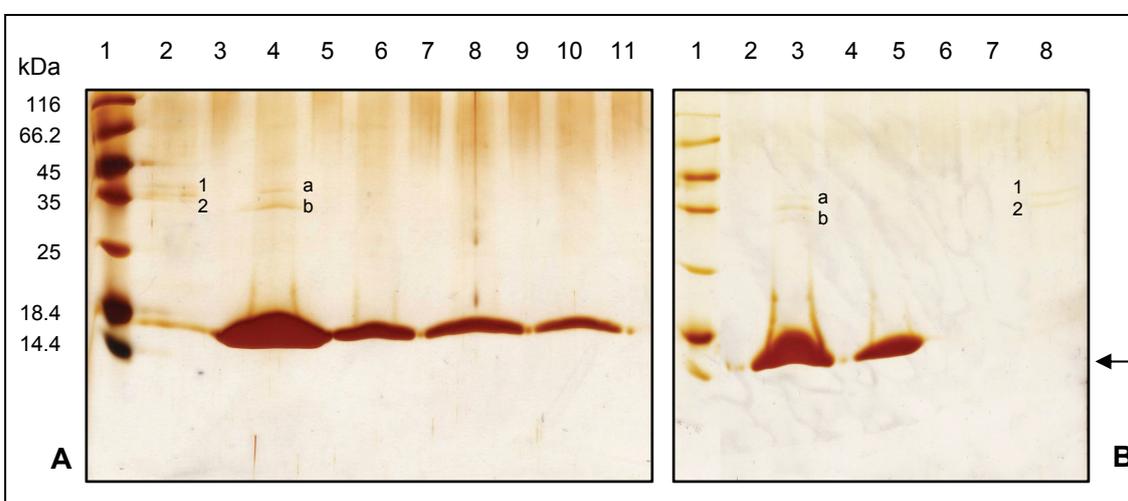


Figura 66. Ensayos de captura de ligando de EgFABP1, visualizados mediante SDS-PAGE al 15% con tinción con nitrato de plata. A: 1) Marcador de peso molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas); 2) eluato concentrado del control; 4) primer eluato concentrado del ensayo; 6) primer eluato sin concentrar; 8) segundo eluato concentrado del ensayo; 10) segundo eluato sin concentrar. B (réplica del ensayo A): 1) Marcador de peso molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas); 3) primer eluato concentrado del ensayo; 5) segundo eluato concentrado del ensayo; 8) eluato concentrado del control. La flecha señala a la proteína His-EgFABP1.

Decidimos cortar las bandas 1, 2, y a y b del gel A para ser sometidas a espectrometría de masas. Las dos primeras se obtienen de la elución del control, siendo proteínas del extracto proteico que se unirían a la resina y que probablemente posean varias histidinas consecutivas. Por otro lado, a y b son producto de la elución del ensayo con His-EgFABP1 y probablemente correspondan a proteínas que se unen específicamente a la proteína “cebo”. Estas cuatro bandas proteicas tienen una masa

molecular próxima a 35 kDa, pero no son coincidentes en tamaño, siendo 1 y 2 un poco más grandes. Las mismas bandas son visualizadas en uno de los ensayos réplica (Figura 66B). En este ensayo no se visualiza la banda de tamaño similar a His-EgFABP1 en la elución del control, confirmando así la contaminación con His-EgFABP1 desde el carril 4 en el gel A debido a su alta concentración.

Ninguna de las cuatro proteínas sometidas a espectrometría de masas pudo ser identificada debido a la obtención de espectros de mala calidad por baja cantidad de muestra. Si bien repetimos el ensayo por tercera vez con mayor cantidad de extracto proteico, obtuvimos resultados similares siendo las bandas proteicas (distintas a His-EgFABP1) presentes en la elución de muy baja intensidad. Lamentablemente no obtuvimos buenos resultados, no pudiendo repetir los ensayos ajustando condiciones debido a la falta de material parasitario.

5.2.2.4. Ensayos de captura de ligandos de MvFABPa

Continuamos aplicando este ensayo para capturar ligandos de MvFABPa y MvFABPb utilizando extractos proteicos totales de tetratiridios. En estos casos, a diferencia del anterior, las larvas son puestas en cultivo durante 5 días antes de generar el extracto proteico, buscando así activar el metabolismo de las mismas.

En la figura 67 se observan los resultados obtenidos de dos experimentos idénticos, donde se aprecia una gran cantidad de bandas proteicas distintas a His-MvFABPa en las eluciones de los ensayos, mientras que la elución del ensayo control no presenta ninguna banda (Figura 67A carril 2) validando así los resultados.

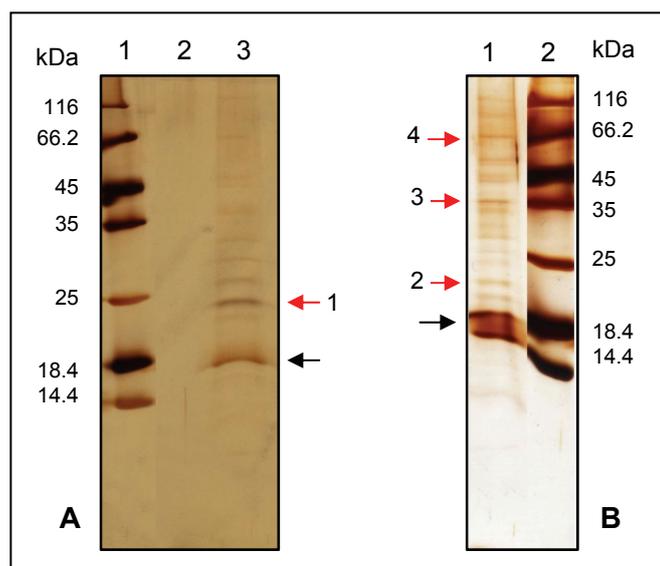


Figura 67. Ensayos de captura de ligando de MvFABPa, visualizados mediante SDS-PAGE al 15% con tinción con nitrato de plata. A: 1) Marcador de peso molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas); 2) eluato concentrado del control; 4) primer eluato concentrado del ensayo. B (réplica del ensayo A): 1) primer eluato concentrado del ensayo; 2) marcador de peso molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas). Las flechas rojas indican las bandas seleccionadas para su análisis mediante espectrometría de masa y las negras señalan a la proteína His-MvFABPa.

Se seleccionan cuatro bandas proteicas provenientes de ambos geles, en base a su intensidad, para ser sometidas al análisis mediante espectrometría de masa. Las bandas 1, 2, 3 y 4 presentan una masa molecular molecular aparente (según gel de electroforesis) de 25, 23, 40 y 67 kDa aproximadamente, respectivamente. Si bien los espectros de las señales son de mejor calidad que los anteriores, ninguna banda pudo ser identificada de manera estadísticamente significativa. Probablemente la dificultad en la identificación de proteínas en *M. vogae* se deba a la falta de información de secuencias disponible. De todas formas, se conservan los datos generados mediante espectrometría de masa para poder identificar estas proteínas cuando se aumente la información de secuencias de este organismo.

5.2.2.5. Ensayos de captura de ligandos de MvFABPb

Por último realizamos los ensayos de captura de ligando de MvFABPb utilizando la proteína recombinante His-MvFABPb pura y extracto proteico de tetratiridios. En la figura 68 se muestran los resultados obtenidos, en esta oportunidad

no se realiza el control ya que se realiza con los ensayos de MvFABPa, debido a que ambos experimentos utilizan el mismo extracto proteico. Seleccionamos las bandas 1, 2, y 3 para su análisis mediante espectrometría de masa ya que presentan mayor intensidad. Se visualiza una banda inferior a la proteína His-MvFABPb que probablemente corresponda al producto visualizado en la figura 64.

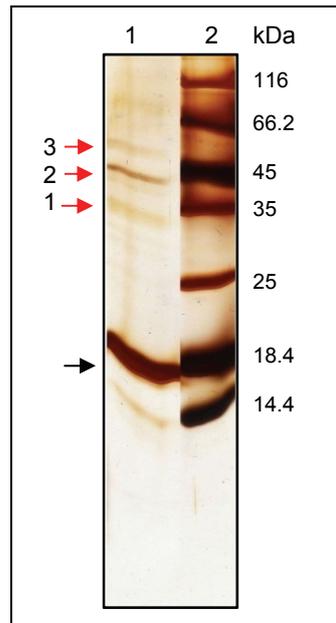


Figura 68. Ensayos de captura de ligando de MvFABPb, visualizados mediante SDS-PAGE al 15% con tinción con nitrato de plata. 1) Primer eluato concentrado del ensayo; 2) marcador de peso molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas). Las flechas rojas indican las bandas seleccionadas para su análisis mediante espectrometría de masa y la negra señalan a la proteína His-MvFABPb.

Nuevamente, las proteínas escogidas no pudieron ser identificadas mediante espectrometría de masa debido a la carencia de información de secuencias. De todos modos, al igual que en el ensayo anterior se almacena las masas de los péptidos generados en espera de la ampliación de la información disponible.

Debido a que esta serie de experimentos no fueron fructíferos decidimos abordar el estudio de las proteínas que podrían interactuar con las FABPs en cuestión mediante una metodología alternativa, como son los ensayos de inmunoprecipitación.

5.2.3. Estudios de interacción FABP-proteína: ensayos de inmunoprecipitación

Continuamos la búsqueda de proteínas capaces de interactuar con EgFABP1, EgFABP2, MvFABPa y MvFABPb, a través de experimentos de inmunoprecipitación utilizando los anticuerpos generados contra rEgFABP1, rMvFABPa o rMvFABPb purificados, y extractos proteicos ya sea de protoescoléces o tetratiridios, según corresponda. Cabe recordar que el anticuerpo contra rEgFABP1 purificado reconoce a la proteína EgFABP2 recombinante pero hasta el momento no se ha podido identificar a la proteína nativa en protoescoléces.

Si bien, como se explicó anteriormente, es difícil la identificación de proteínas de *M. vogae* utilizando esta metodología, no queremos descartar esta estrategia. Asimismo, intentamos capturar complejos formados en los organismos en estudio, donde probablemente ocurran interacciones proteína-proteína más estables que las que acontecen en los ensayos de captura de ligandos.

5.2.3.1. Ensayos de inmunoprecipitación de EgFABP1, MvFABPa y MvFABPb

Se realizan los tres ensayos en paralelo junto con dos controles empleando suero pre-inmune de conejo. Con estos controles descartamos a aquellas proteínas de los extractos que se unan inespecíficamente al suero normal de conejo, pudiendo generar falsos positivos.

La figura 69 muestra los resultados obtenidos, a partir de los cuales seleccionamos a aquellas bandas proteicas que están presentes en los inmunoprecipitados generados tanto con el anticuerpo contra rEgFABP1, como contra rMvFABPa o contra rMvFABPb, que no aparecen en los controles respectivos, para ser analizadas mediante espectrometría de masa.

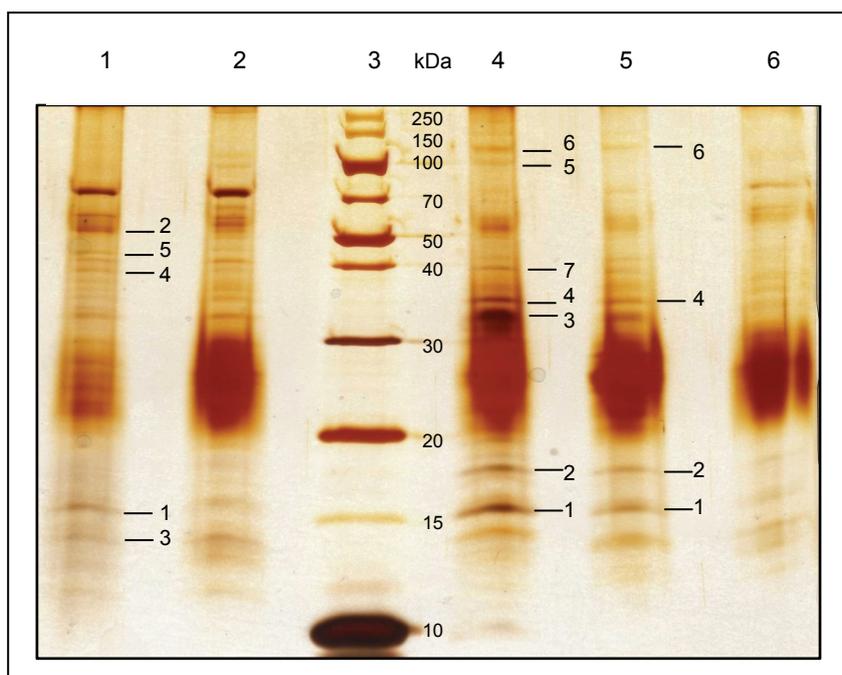


Figura 69. Ensayos de inmunoprecipitación de las FABPs en estudio, visualizados mediante SDS-PAGE al 15% y tinción con nitrato de plata. 1) Inmunoprecipitado con anticuerpo contra rEgFABP1 (PE); 2) inmunoprecipitado con suero normal de conejo y proteínas de protoescólec; 3) marcador de peso molecular PageRuler Unstained Broad Range Protein Ladder (Fermentas); 4) inmunoprecipitado con anticuerpo contra rMvFABPa (Tta); 5) inmunoprecipitado con anticuerpo contra rMvFABPb (Ttb); 6) inmunoprecipitado con suero normal de conejo y proteínas de tetratiridios. Las líneas negras indican las bandas seleccionadas para ser sometidas a espectrometría de masa.

Cada ensayo se realiza por duplicado, obteniéndose resultados reproducibles. Verificamos la presencia de las FABPs en los inmunoprecipitados, ya sea mediante el análisis por espectrometría de masa de las bandas de aproximadamente 15 kDa de masa molecular, o llevando a cabo ensayos de *Western Blot*.

En la figura 70 se aprecia un ensayo de *Western Blot* donde se confirma la presencia de MvFABPa y no se detecta a MvFABPb en el inmunoprecipitado con anticuerpo contra rMvFABPa (carril 8 y 3).

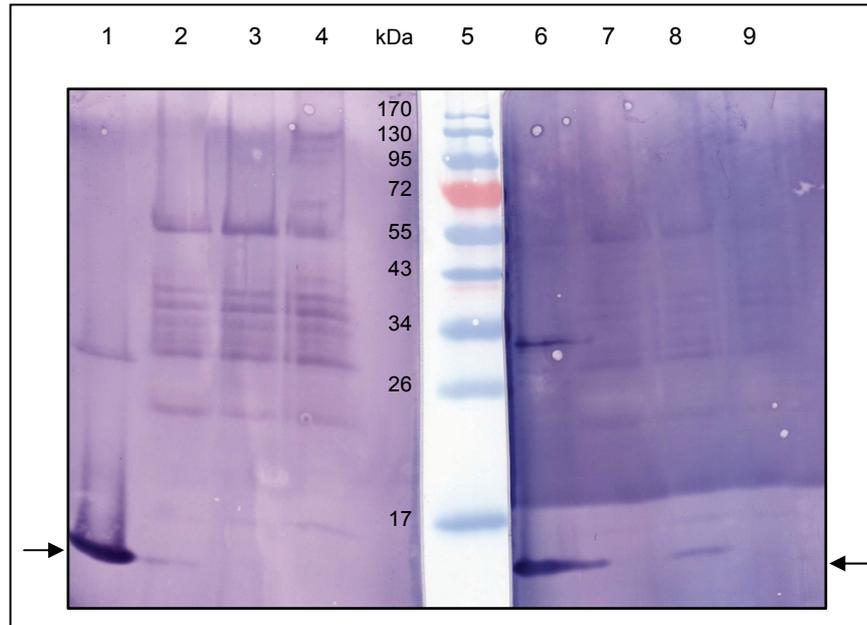


Figura 70. *Western Blots* de los ensayos de inmunoprecipitación con extractos proteicos de tetratiridios, a partir de SDS-PAGE al 15%. 1) Proteína MvFABPb recombinante en proceso de purificación (2 μ g); 2) inmunoprecipitado con anticuerpo contra rMvFABPb; 3) inmunoprecipitado con anticuerpo contra rMvFABPa; 4) inmunoprecipitado con suero normal de conejo; 5) marcador de peso molecular *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Fermentas); 6) proteína MvFABPa recombinante en proceso de purificación (2 μ g); 7) inmunoprecipitado con anticuerpo contra rMvFABPb; 8) inmunoprecipitado con anticuerpo contra rMvFABPa; 9) inmunoprecipitado con suero normal de conejo. Del carril 1 al 4 se utiliza anticuerpo contra rMvFABPb en el *Western Blot* mientras que del carril 6 al 9 se usa anticuerpo contra rMvFABPa. Las flechas señalan la presencia de las MvFABPs.

De la misma manera apreciamos la presencia de MvFABPb en el inmunoprecipitado con anticuerpo contra rMvFABPb (Figura 70 carril 2) y no se observa a MvFABPa en este inmunoprecipitado (Figura 70 carril 7). Asimismo, en el inmunoprecipitado con suero pre-inmune de conejo no se detecta ni MvFABPa (Figura 70 carril 9) ni MvFABPb (Figura 70 carril 4) como era esperable. Las proteínas recombinantes en proceso de purificación son utilizadas como controles positivos de los *immunoblots*. En los carriles correspondientes a los inmunoprecipitados (1-4 y 7-9) se visualiza una serie de bandas proteicas cuyos tamaños se distribuyen entre 22 y 55 kDa aproximadamente. Dichas bandas probablemente correspondan a las distintas cadenas de las diferentes IgGs de conejo (utilizadas para precipitar), que son reconocidas por el anticuerpo anti-IgGs de conejo utilizado como anticuerpo “secundario” en estos ensayos.

La figura 71 muestra la presencia de EgFABP1 en el inmunoprecipitado con el anticuerpo contra rEgFABP1 (carril 2), mientras en el inmunoprecipitado con suero normal de conejo no se observa ninguna proteína de tamaño similar a las FABPs. Como se mencionó anteriormente, no podemos descartar que la banda visualizada en el carril 2 pueda corresponder a EgFABP2.

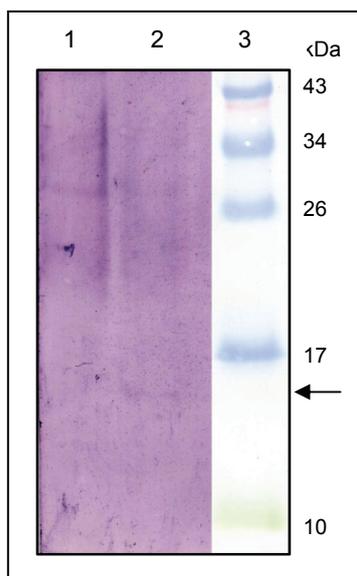


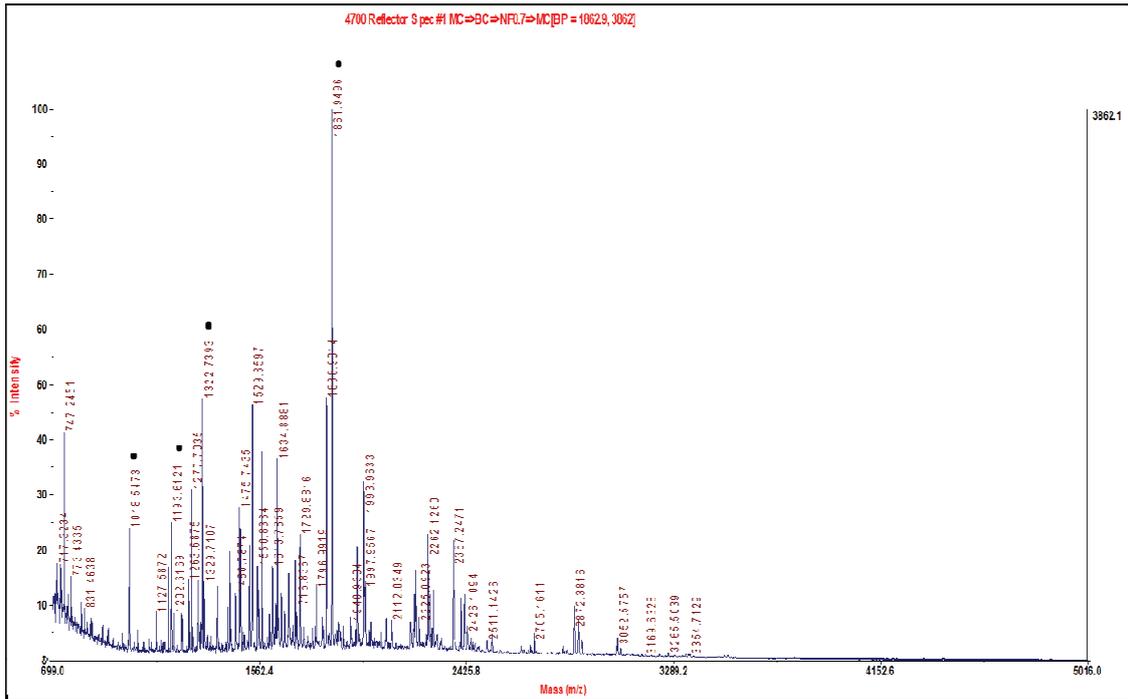
Figura 71. Western Blot del ensayo de inmunoprecipitación con extractos proteicos de protoescóceles, a partir de SDS-PAGE al 15%. 1) inmunoprecipitado con suero pre-inmune; 2) inmunoprecipitado con anticuerpo contra rEgFABP1; 3) marcador de peso molecular *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Fermentas). Se utiliza anticuerpo contra rEgFABP1 en el *Western Blot*. La flecha señala la presencia de EgFABP1 y/o EgFABP2.

A pesar de los sucesivos y exhaustivos lavados que se llevan a cabo luego de la inmunoprecipitación, en los inmunoprecipitados se observa una fuerte presencia de IgGs, apreciada tanto en los *immunoblots* de la figura 70 como en la figura 69. En esta última figura se visualiza un fuerte manchón conteniendo proteínas de 20 a 30 kDa que posiblemente correspondan a las cadenas livianas de las IgGs (22-25 kDa) y bandas más discretas de entre 50 y 70 kDa que podrían relacionarse con las cadenas pesadas de estas moléculas. A partir de esta figura seleccionamos algunas bandas de los experimentos de inmunoprecipitación, señaladas con líneas horizontales, para ser purificadas e identificadas mediante espectrometría de masa, los resultados obtenidos se analizan a continuación.

5.2.3.2. Identificación de proteínas en el inmunoprecipitado con anticuerpo contra rEgFABP1

A partir de la figura 69 se seleccionan las bandas PE1 de 15.5 kDa, PE2 de 55 kDa, PE3 de 14.5 kDa, PE4 de 41 kDa y PE5 de 45 kDa del carril 2, para ser identificadas mediante espectrometría de masa MALDI-TOF/TOF.

En la muestra PE1 de 15.5 kDa no se pudo identificar de manera estadísticamente significativa ninguna proteína, la banda proteica tampoco se correspondió con EgFABP1 o con EgFABP2. En la muestra PE2 se identifica de manera estadísticamente significativa a la cadena beta del fibrinógeno de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) con una masa molecular de 56 kDa (Figura 72). Al ser ésta una proteína del plasma sanguíneo de conejos posiblemente sea un contaminante del anticuerpo contra rEgFABP1 generado en conejo que no pudo ser eliminado. Asimismo, esta proteína también podría ser la proteína que se observa en el experimento control ya que en el carril 2 de la figura 69 visualizamos una proteína de masa similar. Este hecho nos indica que cualquier proteína identificada a partir de la metodología utilizada tiene que ser validada mediante otra técnica, para poder asegurar que interacciona con la FABP en estudio.



Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

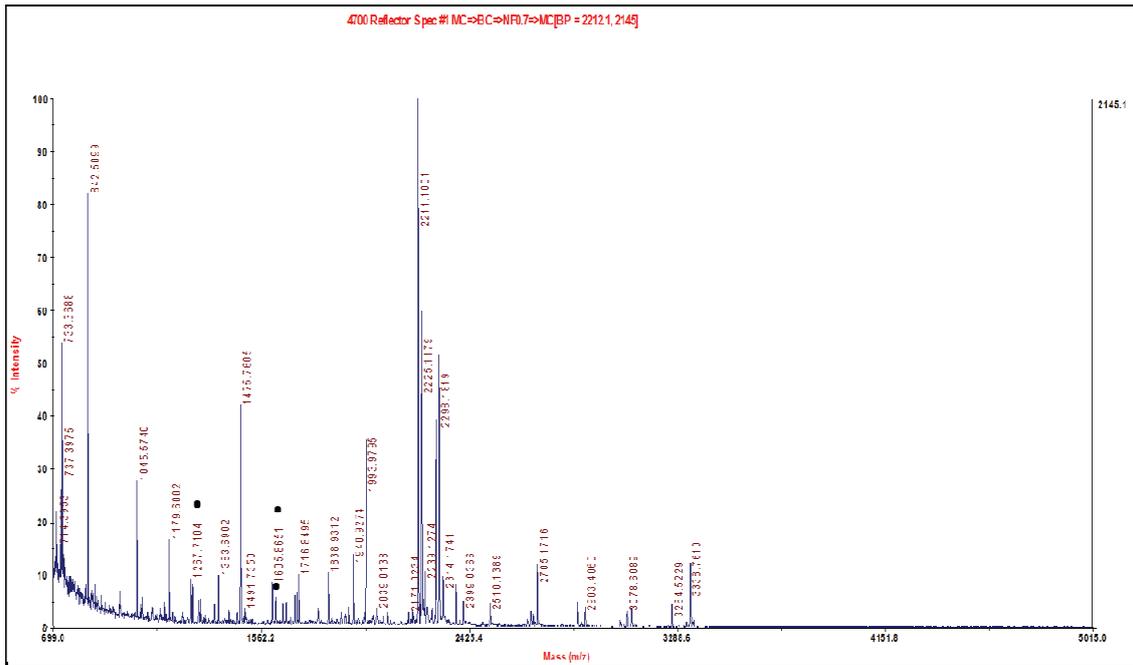
1015.5759, 1018.5473 ions(239.1571, 372.1148, 372.2049, 393.2230, 423.1130, 435.1667, 511.4899, 609.4044, 619.3345, 629.7587, 645.1443, 656.2902, 681.9108, 753.4273, 828.2681, 831.2524, 887.5528, 918.4895, 943.5918, 987.8938), 1127.5872, 1193.6121 ions(175.1375, 206.1186, 268.1154, 331.2030, 353.1431, 360.8651, 422.1142, 435.3664, 447.1609, 468.1793, 474.2640, 507.2574, 523.4328, 535.0616, 542.2008, 567.9318, 616.9321, 618.1359, 618.8471, 621.2751, 663.2693, 664.3962, 697.2949, 719.1633, 719.3470, 744.8708, 762.2325, 821.4518, 826.3200, 828.6895, 838.2116, 843.1980, 845.4590, 872.3600, 877.5048, 904.1583, 947.9339, 949.3264, 958.7317, 961.8711, 994.6269, 1002.1395, 1007.8837, 1069.3593, 1072.5273, 1091.7434, 1131.2146), 1202.6169, 1234.6711, 1239.5193, 1263.6875, 1322.7393 ions(175.1089, 368.1143, 385.1513, 387.1205, 444.4148, 550.1381, 569.1934, 584.7269, 640.1301, 642.0799, 653.1617, 697.3513, 728.2109, 760.3057, 781.4513, 786.0754, 1027.6346, 1057.0200, 1090.4159, 1142.7140, 1221.3159, 1259.1854), 1329.7107, 1383.6838, 1427.7800, 1434.7583, 1460.7874, 1475.7435, 1479.7852, 1481.8054, 1517.7864, 1527.7798, 1529.8597, 1550.8364, 1553.6875, 1558.6898, 1567.7335, 1601.7891, 1613.7859, 1629.7604, 1634.8881, 1639.8933, 1650.8738, 1664.8079, 1682.9343, 1727.8689, 1729.8816, 1796.9919, 1821.8138, 1838.9014, 1861.9496 ions(175.0667, 385.0879, 402.1628, 426.0293, 558.2130, 583.1790, 600.1785, 606.1188, 713.3101, 717.1994, 725.9047, 741.1863, 743.1571, 760.0377, 810.2484, 914.4269, 915.2653, 977.3782, 1028.4706, 1029.4343, 1037.3579, 1127.5631, 1228.4041, 1357.4618, 1587.4743, 1728.6131), 1966.9359, 2001.0221, 2025.9475, 2086.9331, 2111.0349, 2187.0752, 2207.0361, 2262.1260, 2270.0913, 2285.1023, 2413.1931, 2426.1094, 2442.1521, 2529.1985, 2689.3655

Figura 72. Análisis mediante espectrometría de masa de la proteína PE2 del inmunoprecipitado con anticuerpo contra EgFABP1. En la parte superior de la figura se muestra el espectro de masas obtenido por MALDI-TOF. Se marca con un punto los péptidos elegidos para fragmentación. En la parte inferior se presenta la lista de masas de los péptidos obtenidas experimentalmente.

En la muestra PE3 se identifica por espectrometría de masa y de manera estadísticamente significativa al factor de elongación del caucho “rubber elongation

factor protein" (REF) de *Hevea brasiliensis* (planta productora de caucho) (Figura 73) de 14.7 kDa. Esta proteína pertenece a la familia de proteínas REF/SRPP pudiendo ser parte de la maquinaria biosintética del caucho, jugando un rol en la elongación del caucho, además de causar reacciones alérgicas en humanos (Attanyaka y cols., 1991).

Continuando con el estudio de las proteínas presentes en el inmunoprecipitado con el anticuerpo contra rEgFABP1, en las muestras PE4 y PE5 no se pudo identificar ninguna proteína de manera estadísticamente significativa utilizando tanto bases de datos locales como públicas. Las señales obtenidas de la muestra PE4 son de baja intensidad, correspondiendo la mayoría de las señales a queratina y tripsina.



Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

1045.5740, 1179.6002, 1265.7827

1267.7104 ions(175.1014, 243.0888, 288.1867, 338.1277, 360.2310, 374.0724, 395.2048, 401.2585, 424.9801, 453.3578, 457.2633, 484.3649, 497.2700, 529.3440, 558.2081, 607.3569, 623.3251, 627.2660, 633.2543, 660.1725, 665.2920, 670.3062, 754.4518, 755.2972, 794.4767, 821.4092, 851.3906, 980.4995, 1076.0995, 1077.8325, 1110.4834, 1114.6317, 1126.3870, 1128.5049)

1277.7063, 1300.5458, 1307.6807, 1365.6484, 1383.6902, 1475.7605, 1491.7350

1605.8651 ions(175.1049, 366.1632, 400.2556, 416.1423, 483.2255, 529.3054, 549.1831, 595.2584, 625.4317, 642.4127, 643.3052, 724.3541, 736.3863, 755.4390, 771.3707, 793.1833, 797.0754, 852.4136, 852.9172, 853.4280, 870.4503, 964.5262, 969.5549, 977.5962, 1077.6155, 1106.5605, 1121.5750, 1123.6150, 1132.3799, 1152.4049, 1206.5919, 1207.7732, 1236.4646, 1251.6929, 1264.5581, 1461.6808)

1621.8785 ions(175.1028, 455.1678, 458.2050, 471.1595, 502.2346, 550.2088, 595.3188, 601.2322, 611.2004, 617.1918, 632.2388, 645.3251, 726.3207, 754.3809, 792.3023, 798.5100, 805.4913, 822.5394, 847.4222, 857.4959, 948.4835, 948.7480, 950.2396, 951.3073, 991.6761, 1016.3239, 1046.6239, 1071.8149, 1072.6042, 1090.3973, 1116.1724, 1134.4658, 1236.4720, 1255.2267, 1260.7233, 1279.0706, 1317.7117, 1333.5767, 1345.5857, 1359.5316, 1362.6310, 1404.3612, 1436.9012, 1439.7050, 1451.0634, 1459.3818, 1459.7271, 1471.6908)

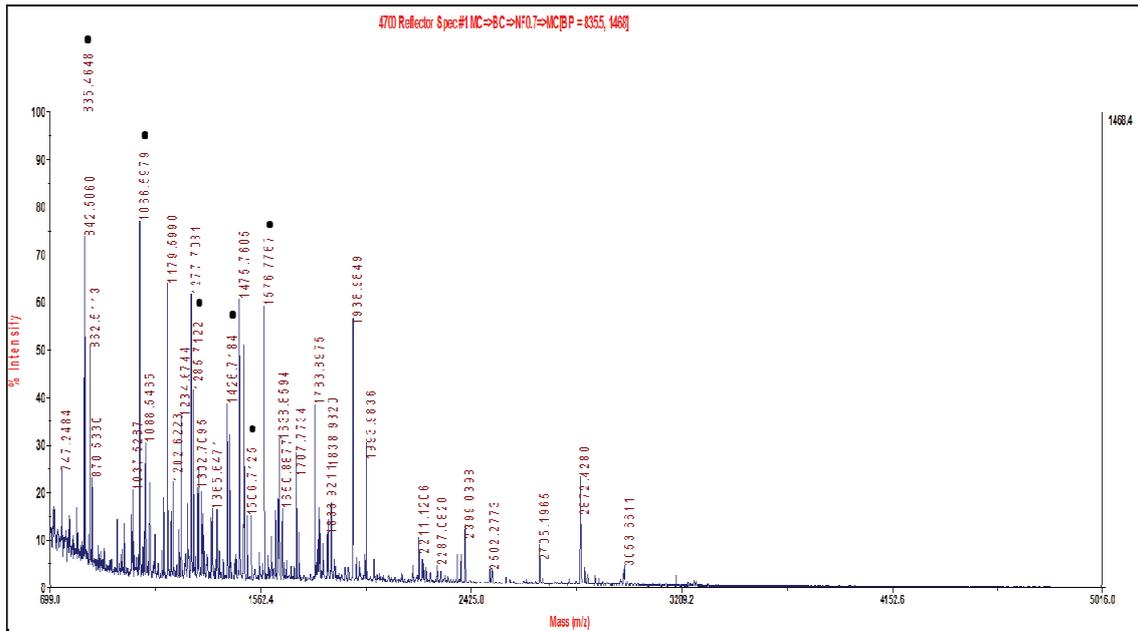
1649.8314, 1664.8011, 1699.8289, 1707.7767, 1708.7626, 1716.8495, 1794.8176, 1838.9312, 1891.9664, 1922.9255, 1940.9274, 1988.0278, 1993.9795, 2039.0138, 2083.0078

Figura 73. Análisis mediante espectrometría de masa de la proteína PE3 del inmunoprecipitado con anticuerpo contra rEgFABP1. En la parte superior de la figura se muestra el espectro de masas obtenido por MALDI-TOF. Se marca con un punto los péptidos elegidos para fragmentación. En la parte inferior se presenta la lista de masas de los péptidos obtenidas experimentalmente.

5.2.3.3. Identificación de proteínas en el inmunoprecipitado con anticuerpo contra rMvFABPa

A partir del inmunoprecipitado con anticuerpo contra rMvFABPa se seleccionan las bandas proteicas Tta1 de 15.5 kDa, Tta2 de 17.5 kDa, Tta3 de 33 kDa, Tta4 de 36 kDa, Tta5 de 100 kDa, Tta6 de 130 kDa y Tta7 de 41 kDa (carril 4 de la figura 69), para ser sometidas al análisis mediante espectrometría de masa. La banda proteica Tta1 es identificada de manera estadísticamente significativa como la proteína MvFABPa de *M. vogae* de 14.8 kDa (Figura 74). La búsqueda es realizada en la base de datos local del servicio UByPA (Instituto Pasteur) donde se encuentra depositada las secuencias de las cuatro FABPs en estudio. Previamente se había identificado su presencia en el inmunoprecipitado mediante *Western Blot* con el anticuerpo específico.

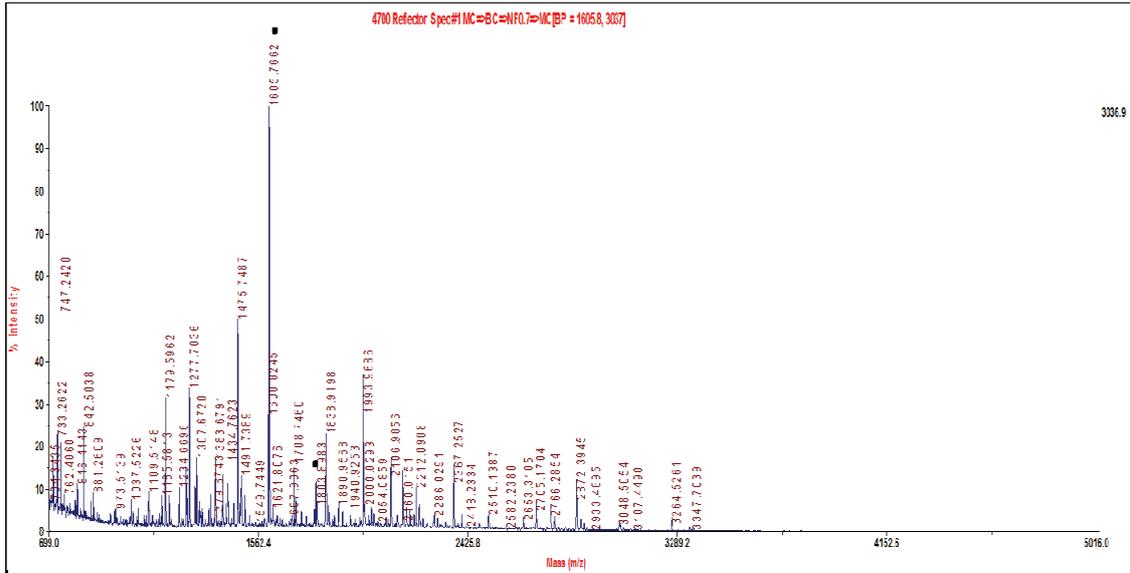
A posteriori, Tta2 es identificada de manera estadísticamente significativa mediante espectrometría MALDI-TOF/TOF como una proteína semejante a una proteína de la capa germinativa de *E. granulosus* cuya masa molecular teórica es de 20927 Da y su punto isoeléctrico 4.97 (CN653539 Eg_CWGRS_07F04_T7 *Echinococcus granulosus germinative layer cDNA*) (Figura 75). Luego de realizar una búsqueda mediante la herramienta *Blast* determinamos que dicha proteína es muy similar a la cadena liviana reguladora de la miosina de invertebrados en general, y en particular es más similar a la de *Taenia solium* (EL746428 LV0308078 *Taenia solium* UNAM-cd2) y *Schistosoma japonicum* (proteína SJCHGC06153, AAP06166.1).



Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

835.4648 ions(175.1177, 177.1145, 184.0935, 201.1256, 229.1281, 249.1898, 256.0932, 257.1462, 274.1788, 278.1385, 286.1340, 288.1751, 338.1620, 340.1849, 370.2512, 385.2047, 386.2435, 387.2572, 449.1839, 455.3029, 481.1692, 485.2346, 511.2887, 534.2531, 539.2976, 542.2734, 544.2767, 627.3465, 656.3562, 661.3616, 677.3152, 744.3475), 862.5113, 870.5330, 1037.5287, 1066.5979 ions(175.1385, 202.1073, 212.1174, 223.1541, 242.1777, 244.1857, 251.1469, 258.1377, 286.1952, 297.1851, 303.2712, 326.1460, 327.2649, 337.2147, 364.2663, 367.1516, 400.2485, 402.3125, 407.2776, 436.1527, 453.2554, 465.2483, 469.2670, 474.3311, 483.3024, 500.3516, 560.3357, 590.2427, 602.3264, 618.3320, 678.4843, 703.3988, 829.6099, 843.4800, 857.4147, 874.5567, 892.4349, 934.4476, 959.5234, 963.9034), 1088.5465, 1090.5430, 1107.5432, 1165.5847, 1179.5990, 1194.6077, 1202.6223, 1234.6744, 1263.6934, 1277.7081, 1285.7122 ions(175.0889, 186.0914, 201.0764, 271.1526, 288.1564, 310.0947, 315.0511, 317.1347, 354.0761, 355.1067, 361.0998, 372.0430, 372.1317, 401.0963, 422.1296, 440.1810, 442.1248, 457.1872, 458.9313, 467.1387, 471.2073, 475.0973, 484.2036, 485.1552, 514.1863, 526.0906, 554.2178, 573.0816, 580.1533, 598.2631, 601.2789, 605.1882, 627.2626, 637.2061, 640.2291, 667.3405, 685.2722, 748.3076, 798.2231, 829.3799, 851.8881, 887.4653, 912.2320, 914.4354, 972.4415, 998.3697, 1071.2682, 1094.4133, 1129.4993, 1156.5438, 1217.3768, 1227.5752, 1235.0422, 1242.5085, 1244.3213, 1245.8016), 1302.7095, 1307.6798, 1320.5839, 1324.7639, 1357.7183, 1365.6471, 1383.6880, 1426.7184 ions(175.1192, 212.7700, 236.8734, 244.0768, 245.0737, 246.1547, 256.0230, 265.2314, 289.1221, 342.2441, 355.0621, 355.2057, 361.2513, 362.1429, 365.3449, 366.1159, 370.1483, 382.3370, 421.0723, 439.1672, 446.1939, 467.2454, 468.1739, 469.2192, 481.2828, 489.2777, 527.3313, 536.2128, 549.1777, 553.1932, 554.5648, 558.1368, 592.4572, 597.3645, 602.2964, 602.4180, 628.2769, 660.7015, 662.4611, 665.4368, 695.3292, 707.5655, 731.3129, 731.7234, 736.4700, 764.4088, 772.3524, 780.3905, 782.2120, 806.3199, 810.2114, 825.3406, 859.4490, 859.5786, 902.4774, 924.3623, 939.3044, 960.7866, 971.3963, 976.4543, 1006.3574, 1071.5099, 1085.5406, 1198.5833, 1249.4523, 1264.4554, 1273.4636, 1278.5529, 1297.4805, 1304.4623, 1315.3829), 1434.7689, 1475.7605, 1491.7487, 1493.7347, 1506.7125 ions(174.3628, 175.1252, 177.1871, 181.2958, 207.4639, 230.3242, 232.1465, 244.1004, 312.1672, 316.1788, 322.1445, 322.9915, 345.7556, 363.2319, 363.8972, 367.1981, 394.1451, 403.2693, 414.2692, 424.2380, 427.1898, 429.2252, 462.9882, 464.3088, 485.5203, 509.0609, 526.3197, 545.3588, 624.4927, 685.3983, 834.4629, 934.4155, 961.6179, 1078.5271, 1207.7043, 1331.7770), 1523.7865, 1576.7767 ions(175.1361, 177.1480, 185.8884, 192.0066, 228.1426, 230.9333, 259.2370, 259.3858, 278.0623, 302.5322, 303.0466, 321.2285, 326.1259, 327.0763, 347.6061, 356.1556, 379.1689, 379.2812, 392.1720, 401.2086, 435.9107, 440.5105, 454.1161, 463.1763, 507.2299, 508.2478, 510.0121, 552.1864, 553.1733, 556.4492, 558.3008, 559.4040, 617.3450, 621.2951, 622.4086, 628.4085, 662.2425, 680.4010, 699.2625, 739.3674, 768.4268, 768.6150, 836.6835, 851.4213, 897.4782, 902.4562, 1123.6052, 1125.5453, 1237.5934, 1334.6511, 1351.6849), 1621.8168, 1634.9041, 1638.8594, 1650.8877, 1707.7734, 1716.8557, 1782.9080, 1783.8975, 1798.0065, 1800.9569, 1804.9579, 1833.9211, 1838.9320, 1851.9297, 1938.9849, 1993.9836, 2367.2751, 2383.9756, 2502.2773, 2510.1606, 2705.1965, 2872.4280, 2888.4324, 3048.5444, 3052.6611

Figura 74. Análisis mediante espectrometría de masa de la proteína Tta1 del inmunoprecipitado con anticuerpo contra rMvFABPa. En la parte superior de la figura se muestra el espectro de masas obtenido por MALDI-TOF. Se marca con un punto los péptidos elegidos para fragmentación. En la parte inferior se presenta la lista de masas de los péptidos obtenidos experimentalmente.



Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

731.3061, 732.2558, 733.2622, 734.3062, 747.2420, 749.2529, 762.4060, 816.4143, 827.4213, 830.4135, 842.5038, 847.4235, 851.4260, 870.5174, 881.2609, 968.4909, 973.5139, 1037.5226, 1045.5612, 1066.5261, 1107.5419, 1109.5148, 1151.5565, 1165.5813, 1179.5962, 1193.6072, 1234.6696, 1263.6886, 1265.6592, 1267.6942, 1277.7036, 1300.5333, 1302.7050, 1307.6720, 1323.6558, 1329.6902, 1357.7075, 1365.6443, 1383.6791, 1414.7360, 1427.7731, 1434.7623, 1437.6903, 1460.7762, 1475.7487, 1491.7389, 1493.7294, 1505.7526, 1524.7749, 1600.8245, 1605.7662 ions(175.0804, 258.0575, 259.0609, 286.0795, 322.1439, 354.0463, 355.0204, 357.0692, 359.1069, 372.0235, 397.1001, 399.0926, 400.1594, 415.1469, 416.1249, 421.1758, 459.1678, 484.1546, 512.0701, 519.1763, 527.1849, 529.1480, 533.1799, 550.0589, 550.2355, 586.1014, 625.1572, 642.1432, 644.1990, 658.1234, 699.2538, 755.2308, 771.3247, 786.3501, 787.2953, 792.3377, 797.3515, 814.2721, 815.9705, 845.1926, 871.3015, 890.3508, 907.3415, 927.4195, 947.3499, 964.3142, 1038.3536, 1056.4025, 1074.4149, 1077.1334, 1092.4250, 1123.5179, 1190.4373, 1207.4255, 1433.6893, 1490.6158, 1492.5132, 1543.3639, 1549.9150, 1587.8231, 1590.7081, 1591.9312), 1621.8076, 1707.7646, 1708.7460, 1716.8451, 1737.9211, 1790.8822, 1796.9896 ions(175.0890, 228.9859, 342.0921, 399.0363, 402.1385, 404.8875, 418.0365, 462.9578, 481.1605, 526.2346, 546.0925, 655.3729, 659.2211, 660.3267, 661.2088, 710.0975, 766.1390, 771.3985, 787.3618, 837.7965, 872.0925, 877.0452, 881.3414, 897.3103, 898.4770, 900.4320, 911.2889, 959.2573, 1011.3494, 1029.4828, 1068.5565, 1086.4452, 1138.4194, 1142.5427, 1226.5933, 1323.6084, 1338.5892, 1466.7091, 1467.5909, 1736.9347, 1755.7566), 1803.8983, 1837.9470, 1838.9198, 1851.9247, 1874.9374, 1890.9568, 1908.8257, 1940.9253, 1993.9686, 1996.9688, 1997.9679, 2000.0293, 2016.0273, 2025.9469, 2038.0007, 2088.9680, 2106.9856, 2134.9595, 2155.9917, 2171.0271, 2171.9985, 2186.1514, 2202.1436, 2211.0938, 2225.1089, 2231.1919, 2240.1240, 2284.1699, 2286.0291, 2298.1741, 2332.1213, 2367.2527, 2384.0212, 2399.0144, 2471.0662, 2508.1826, 2510.1387, 2636.2861, 2652.3704, 2653.3105, 2689.3567, 2697.3215, 2705.1704, 2749.2637, 2766.2854, 2782.2729, 2798.2793, 2872.3945, 2888.3909, 2902.4133, 3048.5054, 3052.5510, 3053.5840, 3264.5261

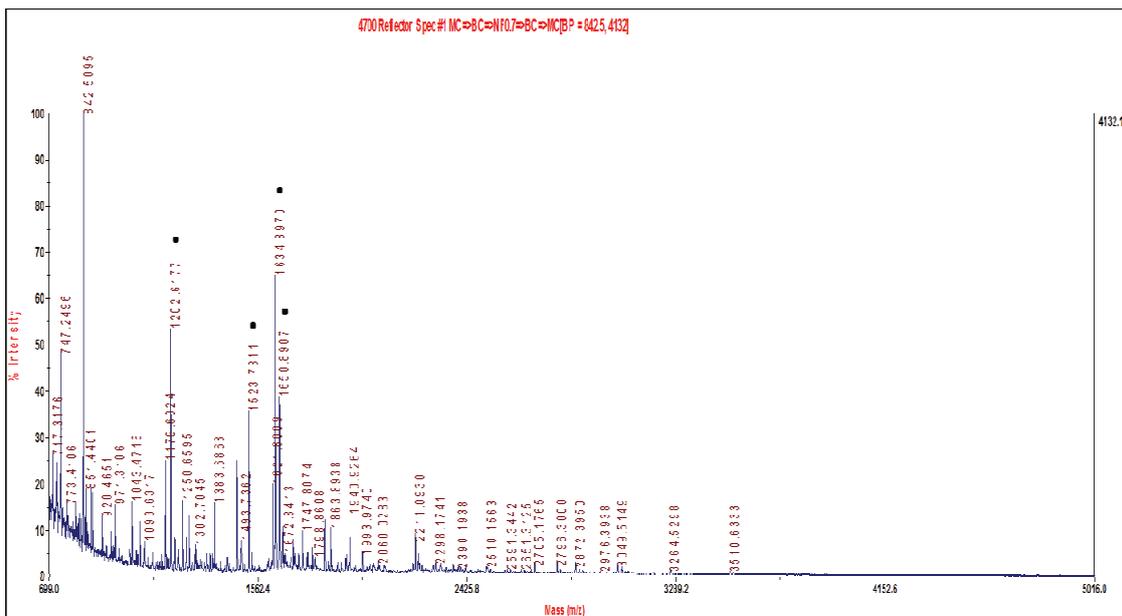
Figura 75. Análisis mediante espectrometría de masa de la proteína Tta2 del inmunoprecipitado con anticuerpo contra rMvFABPa. En la parte superior de la figura se muestra el espectro de masas obtenido por MALDI-TOF. Se marca con un punto los péptidos elegidos para fragmentación. En la parte inferior se presenta la lista de masas de los péptidos obtenidas experimentalmente.

En la muestra Tta3 se identifica de manera estadísticamente significativa a la cadena A del fragmento Fc de la IgG de conejo a partir de la búsqueda en la base de

datos pública NCBI nr (Figura 76). Con la búsqueda realizada tanto en EST-invertebrados como en la base de datos local no se identificó ninguna proteína de manera estadísticamente significativa. Probablemente, la proteína identificada de 24708 Da se encuentre contaminando la banda proteica de tamaño superior seleccionada para su análisis, ya que por su tamaño formaría parte del fuerte “manchón” proteico de proteínas de 22 a 30 kDa donde posiblemente se encuentren las cadenas livianas de las IgGs (carril 4 de Figura 69).

Las bandas proteicas Tta4 y Tta6 no pudieron ser identificadas de manera estadísticamente significativa, en el primer caso se obtuvieron espectros de fragmentación de mala calidad. De todas formas, almacenamos los datos generados para ser analizados cuando aumente la información de secuencias.

En la muestra Tta5 se identifica mediante espectrometría de masa y de forma estadísticamente significativa a una proteína similar a la proteína paramiosina de *E. granulosus* de masa molecular teórica de 98682 Da y punto isoeléctrico de 5.21 (Figura 77).

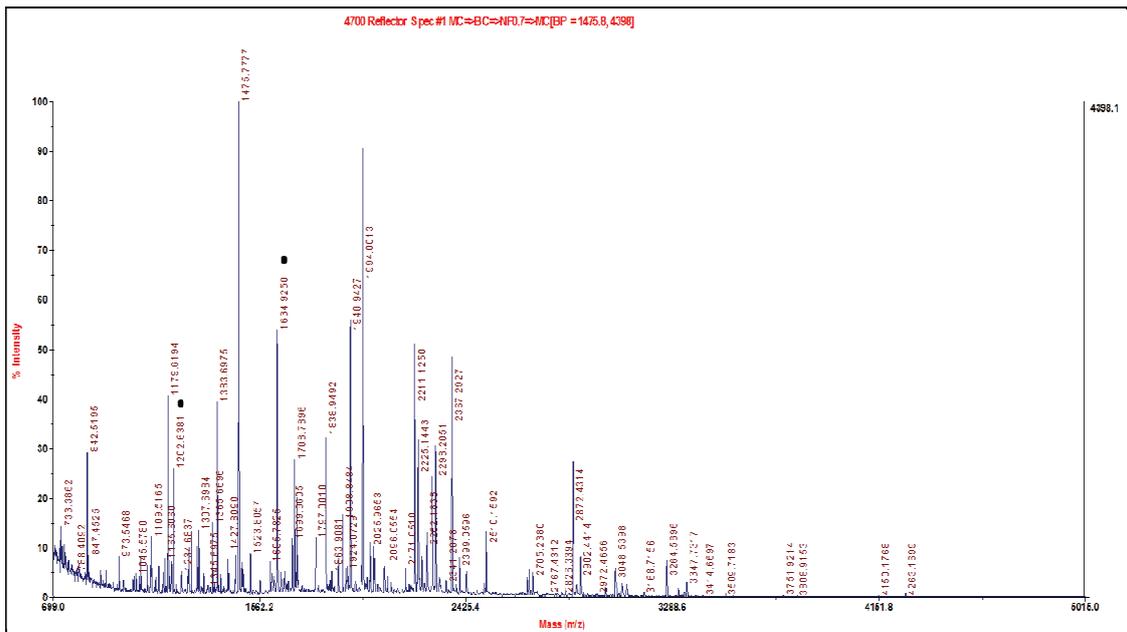


Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

810.4654, 831.4375, 851.4401, 870.5314, 881.2719, 920.4651, 971.3106, 1043.4716, 1077.1989, 1093.6317, 1179.6024,
 1202.6177 ions(169.1281, 175.1103, 193.1106, 216.0351, 229.0779, 236.0917, 245.1460, 265.1445, 272.1268,
 292.1176, 293.0982, 295.1736, 303.1729, 323.1382, 332.1838, 334.1838, 371.1562, 388.1866, 395.1102,
 400.3061, 408.9177, 415.1747, 416.1074, 444.0384, 489.2342, 505.5686, 510.1118, 548.2252, 549.2081,
 558.1926, 565.1959, 566.2401, 577.1880, 597.2416, 600.1385, 616.1373, 618.3139, 627.2889, 653.3270,
 671.2076, 678.2714, 688.4039, 713.3347, 719.3113, 777.3165, 827.4223, 886.5707, 900.7435, 901.3934,
 903.4207, 927.4308, 928.3564, 929.5416, 1008.3220)
 1218.6105, 1234.6409, 1250.6595, 1267.7003, 1277.7084, 1278.6903, 1302.7045, 1307.6753, 1309.6482,
 1351.6653, 1365.6543, 1374.6409, 1383.6868, 1475.7552, 1491.7439, 1493.7362
 1523.7811 ions(175.1170, 205.0789, 217.0092, 222.1315, 227.1249, 242.1920, 253.3472, 260.1679, 289.1626,
 294.0764, 314.0849, 315.6049, 343.0681, 348.5441, 358.7077, 359.6105, 377.5541, 411.1821, 412.3586,
 424.0619, 443.2574, 450.0782, 460.1888, 488.2596, 513.2977, 521.1229, 523.2514, 523.1175,
 547.4952, 555.0208, 557.3596, 571.2288, 576.1516, 579.1766, 582.2432, 582.4324, 584.1550, 601.2973,
 631.2844, 674.3506, 684.2863, 691.3868, 692.1003, 716.3032, 739.5072, 750.3815, 756.5355, 774.3363,
 801.3421, 805.2845, 825.7213, 841.3772, 849.5864, 873.4863, 877.7023, 911.5719, 918.4910, 936.5102,
 963.3471, 1319.7821, 1328.3956, 1371.6921, 1430.6757)
 1535.8049, 1621.8009, 1632.8739
 1634.8970 ions(158.4048, 171.0575, 175.1052, 177.4558, 199.1042, 215.1423, 228.1101, 237.1837, 265.1308,
 308.2584, 314.1066, 324.1643, 340.1384, 344.0565, 344.3226, 348.1647, 372.0806, 381.1096, 397.1895,
 409.1045, 419.2903, 431.1491, 433.1444, 436.2894, 464.2042, 474.1759, 474.2996, 482.2509, 484.3033,
 501.3198, 504.1417, 532.2016, 568.1299, 587.2474, 592.2841, 602.2774, 614.2178, 614.2178, 645.3589, 647.3928,
 650.2563, 663.2055, 666.3140, 678.2164, 715.2052, 715.3890, 717.3434, 718.2261, 726.8755, 797.5447,
 819.3267, 829.2943, 837.5186, 837.7091, 844.2120, 847.4551, 906.6219, 914.2576, 919.4993, 1034.4462,
 1135.6050, 1401.6432, 1459.7421, 1461.5912, 1465.6604, 1467.1345, 1467.8878)
 1638.8544
 1650.8907 ions(175.1358, 181.0838, 186.6904, 189.1836, 199.1273, 200.1931, 244.2132, 252.9576, 270.3961,
 277.7973, 296.3077, 328.3226, 333.2376, 340.1667, 345.6342, 357.1080, 369.1995, 402.2455, 414.6045,
 423.2425, 426.1792, 435.1777, 460.6010, 463.8495, 474.2280, 474.3429, 484.2592, 490.2876, 491.1499,
 527.3289, 541.2730, 547.1796, 573.9689, 574.2438, 580.7653, 602.2311, 616.0688, 644.9082, 651.6761,
 662.3113, 687.8319, 692.4604, 707.2509, 711.0063, 718.4150, 723.4118, 730.7393, 733.0521, 787.4637,
 825.3930, 876.5139, 887.4532, 914.5718, 1433.5629, 1481.4604, 1482.7251, 1625.4152)
 1666.8849, 1672.8413, 1707.7820, 1708.7554, 1730.8016, 1747.8074, 1763.8030, 1767.8336, 1787.8785,
 1798.8608, 1837.9452, 1851.9265, 1863.8938, 1891.9624, 1908.0096, 1926.9941, 1936.9486, 2025.9454,
 2038.0073, 2060.0283, 2065.1086, 2083.9949, 2202.1504, 2317.0884, 2333.1274, 2341.1741, 2367.2253,
 2390.1938, 2399.0879, 2406.2109, 2421.0496, 2506.1602, 2510.1563, 2522.1787, 2591.3442, 2603.2717,
 2651.3125, 2663.3528, 2688.2676, 2705.1765, 2796.3000, 2812.2959

Figura 76. Análisis mediante espectrometría de masa de la proteína Tta3 del inmunoprecipitado con anticuerpo contra rMvFABPa. En la parte superior de la figura se muestra el espectro de masas obtenido por MALDI-TOF. Se marca con un punto los péptidos elegidos para fragmentación. En la parte inferior se presenta la lista de masas de los péptidos obtenidas experimentalmente.

Por último, en la muestra Tta7 se identifica de manera estadísticamente significativa a la región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina gama de conejo de 20563 Da de masa molecular teórica (Figura 78). Probablemente, dicha proteína perteneciente al fuerte “manchón” de cadenas livianas de IgGs, se encuentre contaminando la banda seleccionada de tamaño superior, que lamentablemente no pudo ser identificada.



Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

973.5468, 993.5105, 995.5235, 1033.5358, 1037.5426, 1045.5780, 1060.5782, 1066.5232, 1090.5543, 1107.5674, 1109.5165, 1126.5420, 1140.5981, 1141.5660, 1158.6038, 1165.6060, 1179.6194, 1193.6353, 1194.6261, 1202.6381 ions(175.1384, 215.1355, 282.1601, 286.1547, 303.1673, 345.2207, 397.2198, 415.1709, 423.2372, 432.2812, 442.2784, 448.6464, 456.2862, 472.1740, 473.2222, 489.2863, 523.1905, 531.2761, 535.3217, 572.3431, 573.3332, 586.0334, 589.3635, 595.3498, 619.3174, 626.3765, 636.3275, 673.0863, 687.4556, 696.3951, 705.3151, 729.3845, 735.1322, 758.4337, 763.4551, 771.3765, 798.4048, 803.3758, 813.4637, 819.0684, 827.4540, 855.3702, 860.3856, 869.4938, 871.3521, 886.4257, 900.4164, 903.4200, 904.5263, 912.4880, 953.5150, 1027.4139, 1037.5183, 1045.4922, 1047.3820, 1057.5605, 1071.6373, 1083.6118), 1234.6837, 1235.6599, 1260.7090, 1263.6821, 1265.6580, 1277.7284, 1300.5566, 1302.6500, 1307.6984, 1329.6816, 1365.6696, 1373.6898, 1383.6975, 1390.7233, 1399.7029, 1412.6396, 1427.8090, 1434.7810, 1458.7587, 1460.8077, 1474.7581, 1475.7777, 1487.7716, 1491.7657, 1493.7561, 1523.8057, 1563.7903, 1605.7825, 1612.8583, 1614.8767, 1622.8456, 1634.9250 ions(175.0926, 199.1322, 288.1775, 323.2087, 369.1952, 472.2699, 474.2813, 500.3687, 501.2877, 509.6502, 510.2627, 547.2402, 572.2794, 575.3129, 589.3378, 591.2558, 614.4101, 637.2405, 662.3517, 670.5066, 675.3172, 717.3347, 771.3091, 787.7526, 837.4030, 843.5392, 854.4266, 906.3820, 925.4908, 951.5670, 957.7146, 963.4298, 1046.6161, 1047.7408, 1052.7711, 1064.4985, 1102.7382, 1117.6659, 1118.6483, 1119.6172, 1135.6055, 1161.7083, 1167.4855, 1190.5259, 1196.5122, 1236.6755, 1248.6685, 1280.7612, 1331.7942, 1332.7744, 1346.7106, 1348.7438, 1349.7921, 1378.6846, 1435.0562, 1436.7263, 1460.7854, 1478.6958, 1481.5603, 1482.7653, 1519.6014), 1638.9086, 1650.8944, 1666.8966, 1681.8673, 1699.8605, 1707.8033, 1708.7896, 1713.8276, 1716.8756, 1722.8755, 1763.8428, 1794.8522, 1797.0010, 1837.9843, 1838.9492, 1846.9712, 1851.9608, 1856.9836, 1863.9081, 1873.9871, 1891.0029, 1908.8484, 1924.0729, 1929.9427, 1940.9427, 1988.0500, 1994.0013, 2011.9904, 2021.0260, 2025.9653, 2038.0286, 2042.0288, 2043.0061, 2054.1218, 2058.0156, 2083.0232, 2086.0327, 2096.0554, 2171.0510, 2210.1558, 2262.1838, 2313.2209, 2367.2927, 2374.2395, 2384.0486, 2399.0596, 2403.2002, 2424.2739, 2425.3066, 2426.3003, 2500.2822, 2502.3079, 2508.2124, 2510.1592, 2516.2688, 2663.3955, 2680.3562, 2688.3096, 2689.3948, 2696.3323, 2705.2380, 2714.3474, 2722.3406, 2764.3994, 2767.4312, 2768.4385, 2797.3601, 2808.3804, 2811.3843, 2826.3394, 2842.3333, 2855.4817, 2872.4314, 2879.4287, 2886.4688, 2888.4314, 2892.3982, 2902.4414, 2914.4487, 2972.4656, 3007.4319, 3030.5720, 3041.4351, 3046.4702, 3048.5398, 3052.6023, 3053.6584, 3064.5459, 3066.5764, 3076.5986, 3077.6152, 3082.6316, 3094.5974, 3095.6338, 3102.4690, 3168.7156, 3173.6147, 3247.6580, 3264.5696, 3312.3784, 3324.8147, 3338.7886, 3341.7908, 3346.7256, 3347.7317, 3352.6909

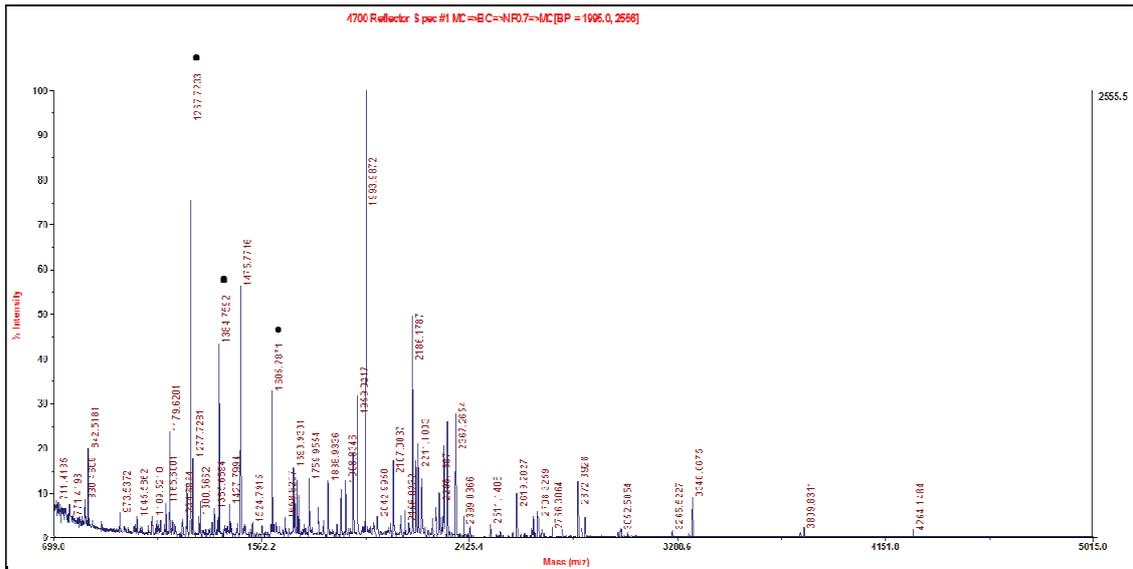
Figura 78. Análisis mediante espectrometría de masa de la proteína Tta7 del inmunoprecipitado con anticuerpo contra rMvFABPa. En la parte superior de la figura se muestra el espectro de masas obtenido por MALDI-TOF. Se marca con un punto los péptidos elegidos para fragmentación. En la parte inferior se presenta la lista de masas de los péptidos obtenidas experimentalmente.

5.2.3.4. Identificación de proteínas en el inmunoprecipitado con anticuerpo contra rMvFABPb

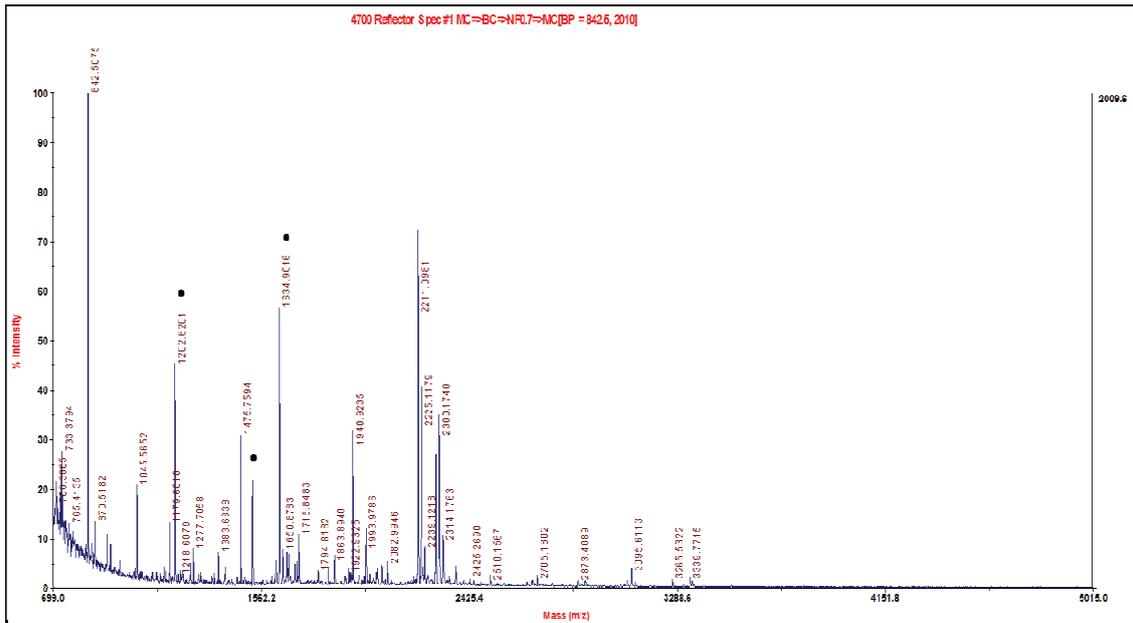
En este caso se seleccionan para el análisis mediante espectrometría de masa MALDI-TOF/TOF, a las bandas proteicas Ttb1 de 15.5 kDa, Ttb2 de 18 kDa, Ttb4 de 36 kDa y Ttb6 de 130 kDa del carril 5 de la figura 69, correspondientes a proteínas presentes en el inmunoprecipitado de proteínas de tetratiridios cuando utilizamos el anticuerpo contra rMvFABPb.

En las muestras Ttb1 y Ttb6 no se pudo identificar ninguna proteína de manera estadísticamente significativa, ni en bases de datos públicas, ni locales. Igualmente, reservamos los datos generados en espera de una futura ampliación de la información de secuencias de este organismo.

La banda proteica Ttb2 se identifica, de manera estadísticamente significativa y utilizando la base de datos EST de invertebrados, como una proteína similar a una proteína de la capa germinativa de *Echinococcus multilocularis* (EM_EST:BU493308; BU493308 Em_CW_04F12_T7 *Echinococcus multilocularis germinative layer*) de 21432 Da de masa molecular teórica y 5.21 de punto isoeléctrico (Figura 79). El ADNc respectivo presenta alta similitud con el ADNc EL746428 LV0308078 de *Taenia solium* que es semejante a la cadena liviana reguladora de la miosina de invertebrados. La proteína identificada coincide con la proteína Tta2 identificada previamente en el inmunoprecipitado con anticuerpo contra rMvFABPa.



Por último, en la muestra Ttb4 se identifica, de manera estadísticamente significativa y utilizando la base de datos pública NCBI nr, a la región constante de la cadena pesada de IgG de conejo cuyo peso molecular teórico es 20563 Da (Figura 80). Es posible que el fragmento identificado, de menor masa molecular que la banda Ttb4, se encuentre contaminando la proteína seleccionada de 36 kDa, y que en la muestra en estudio no se haya podido identificar otra proteína de manera significativa.



Lista de masas MS (m/z) y MS/MS (m/z) obtenidas experimentalmente:

1045.5652, 1179.6010, 1202.6201 ions(175.1167, 216.1485, 282.1768, 286.1498, 300.2120, 303.1463, 391.0424, 397.1860, 415.1918, 455.2089, 467.3035, 472.2143, 489.2648, 521.2523, 565.2189, 573.2616, 601.2739, 618.2992, 620.2566, 681.3096, 688.2934, 696.3300, 715.3008, 728.2007, 729.2945, 745.2925, 788.4421, 817.5151, 869.2766, 886.3801, 888.4948, 903.4017, 986.3506, 992.6401, 1004.4943, 1023.3352, 1028.5208, 1043.6345, 1064.4845, 1101.3519), 1218.6079, 1226.7029, 1234.6193, 1267.6926, 1277.7058, 1300.5615, 1307.6620, 1365.6470, 1383.6838, 1409.6650, 1475.7594, 1523.7795 ions(175.1054, 255.0604, 272.1261, 370.1834, 435.1731, 487.2456, 573.9878, 582.2628, 658.2569, 675.1108, 675.3894, 679.3726, 681.2889, 697.2802, 714.2051, 733.2861, 749.2985, 812.3271, 817.4874, 928.5030, 936.3588, 943.5051, 1037.4602, 1249.5463), 1524.7853, 1621.8218, 1634.9016 ions(175.1131, 282.1525, 288.1438, 369.2030, 387.1609, 391.2142, 401.1705, 419.2465, 457.1766, 474.2581, 483.1515, 500.2594, 547.1893, 548.3422, 563.2457, 565.3246, 567.2232, 572.2487, 589.2360, 645.3223, 662.3248, 664.2434, 717.3963, 760.4462, 807.4455, 814.8508, 837.3070, 854.2986, 854.5046, 869.4805, 890.5927, 908.3954, 918.4731, 925.4556, 961.5523, 1046.5021, 1117.6149, 1118.5378, 1135.5627, 1161.5886, 1163.3463, 1164.5533, 1191.8605, 1248.5229, 1268.6034, 1332.7034, 1347.6235, 1349.6489, 1351.7668, 1359.2626, 1429.5306, 1437.7791, 1444.6094, 1460.7148, 1478.7257, 1481.4913, 1481.9323), 1650.8783, 1664.8452, 1665.8379, 1666.8741, 1675.8866, 1676.8976, 1699.8390, 1707.8052, 1708.7679, 1714.8282, 1716.8483, 1794.8182, 1796.8538, 1838.9183, 1863.8940, 1907.0088, 1911.9292, 1922.9325, 1929.9325, 1940.9235, 1965.0038, 1988.0413, 1993.9786, 2011.9611, 2038.0024, 2041.9923, 2042.9932, 2060.0154, 2082.9946, 2194.1394, 2317.1606, 2318.1653, 2341.1909, 2367.2544, 2425.2690, 2441.2625, 2510.1567, 2682.3601, 2689.2876, 2705.1802, 2873.4089, 2903.3970, 3079.5994, 3095.6113, 3265.5322

Figura 80. Análisis mediante espectrometría de masa de la proteína Ttb4 del inmunoprecipitado con anticuerpo contra rMvFABPb. En la parte superior de la figura se muestra el espectro de masas obtenido por MALDI-TOF. Se marca con un punto los péptidos elegidos para fragmentación. En la parte inferior se presenta la lista de masas de los péptidos obtenidas experimentalmente.

A modo de resumen de los resultados obtenidos a partir de los experimentos de inmunoprecipitación, se presenta la siguiente tabla:

Banda seleccionada	Proteína identificada
PE1	No identificada
PE2	Cadena beta del fibrinógeno de conejo (56 kDa)
PE3	Similar a factor de elongación del caucho de <i>H. brasiliensis</i> (14.7 kDa)
PE4	No identificada
PE5	No identificada
Tta1	MvFABPa (14.8 kDa)
Tta2	Similar a la cadena liviana reguladora de la miosina de invertebrados (20.9 kDa)
Tta3	Cadena A del fragmento Fc de IgG de conejo (24.7 kDa)
Tta4	No identificada
Tta5	Similar a la paramiosina de <i>E. granulosus</i> (98.7 kDa)
Tta6	No identificada
Tta7	Región constante de la cadena pesada de IgG de conejo (20.6 kDa)
Ttb1	No identificada
Ttb2	Similar a la cadena liviana reguladora de la miosina de invertebrados (20.9 kDa)
Ttb4	Región constante de la cadena pesada de IgG de conejo (20.6 kDa)
Ttb6	No identificada

Como se observa en la tabla, varias proteínas no pudieron ser identificadas mediante la metodología utilizada pero los datos generados son almacenados hasta disponer de mayor información de secuencias, como se explica anteriormente. Asimismo, se identifican bandas correspondientes a regiones de IgGs de conejo, utilizadas para inmunoprecipitar, y varias proteínas con alta similitud con proteínas de organismos filogenéticamente cercanos a los estudiados.

6. DISCUSIÓN

Si bien han transcurrido varias décadas desde el descubrimiento de las primeras FABPs y existe una vasta bibliografía sobre ellas, la comunidad científica aún no ha podido descifrar completamente el rol específico que cumplen las distintas FABPs. Estas proteínas adquieren particular relevancia en los cestodos ya que son esenciales para su supervivencia en tanto no sintetizan *de novo* sus propios AG. Este trabajo se centró en la búsqueda de elementos que contribuyan a determinar las funciones de las FABPs de *E. granulosus* y *M. vogae*. En este sentido comenzamos explorando sus destinos subcelulares.

Iniciamos nuestra investigación analizando la localización subcelular de las FABPs de *E. granulosus* y de *M. vogae*, utilizando estrategias complementarias. De esta manera encontramos tres isoformas de EgFABP1 en la fracción citosólica, nuclear, mitocondrial y microsomal de protoescólecidos, de distinto punto isoeléctrico y masa molecular similar. Sugerimos que aquellas que presentan un pI de 8 y 6.5 posiblemente porten alguna modificación postraduccional, siendo además minoritarias con respecto a la isoforma de pI 7.7. Las modificaciones postraduccionales son modificaciones químicas que juegan un rol clave en la biología molecular mediante la regulación de la actividad, localización e interacción con otras moléculas celulares tales como proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y cofactores. Los análisis realizados no nos pueden asegurar el tipo de modificación que estas isoformas poseen.

Pocas modificaciones postraduccionales han sido descritas en las FABPs. Se ha reportado la fosforilación de la H-FABP de rata en la Tyr 19 en respuesta a la estimulación por insulina. Esta forma fosforilada constituye una fracción menor (menos del 0.2%) comparada con la gran cantidad de H-FABP presente en el miocito cardíaco (Nielsen et Spener, 1993). En este caso, la isoforma mayoritaria de la H-FABP (sin modificar) presenta un pI alrededor de 6.0 mientras que la minoritaria es de 4.8 aproximadamente. Esta diferencia de pI es de igual magnitud a la detectada entre las isoformas de EgFABP1 de pI 6.5 y 7.7, sugiriéndonos que esta proteína de punto isoeléctrico menor y masa molecular apenas mayor, podría poseer una fosforilación. Además, de la misma manera que en el caso mencionado, la proteína de pI 6.5 también presenta una concentración mucho menor que la de pI 7.7. Asimismo, cabe mencionar que la fosforilación es la modificación postraduccional más frecuente. Esta modificación no es pronosticada por el programa bioinformático utilizado, pero no nos sorprende que el péptido fosforilado no se detecte por espectrometría de masa, ya que

la metodología usada presenta limitaciones para la identificación de modificaciones postraduccionales. En particular, las fosforilaciones y algunas glicosilaciones son lábiles y es difícil mantener la modificación durante la preparación de la muestra. Además, si la separación es inefectiva, los péptidos o proteínas no modificados pueden enmascarar las formas modificadas durante el análisis de MS. La modificación de un péptido dado puede reducir su eficiencia de ionización comprometiendo así el espectro de masas. Existen varias metodologías alternativas para analizar las modificaciones postraduccionales, las mismas requieren métodos de MS altamente sensibles y/o estrategias de enriquecimiento de modificaciones (Farley et Link, 2009).

Asimismo, un mecanismo similar al que acontece con la H-FABP podría ocurrir en los cestodos, ya que el receptor de insulina ha sido aislado en *E. multilocularis* y en *M. vogae* (Konrad et al., 2003; Canclini et Esteves, 2009). Resultados de nuestro grupo de investigación han demostrado que la insulina humana afecta la biología de los tetratiridios modificando los niveles de glucosa libre, la sobrevivencia, la reproducción asexual y el estado de fosforilación de las tirosinas (Canclini et Esteves, 2009). Recientemente, Hemer y colaboradores demostraron que la insulina humana estimula la formación de las larvas de *E. multilocularis* a partir de células madre y promueve el crecimiento asexual de las mismas. Reportan que la insulina produce un aumento de la captura de glucosa y estimula la fosforilación de componentes de la vía de señalización de la insulina, y además caracterizan un segundo miembro de la familia de receptores de insulina (Hemer et al., 2014). También se ha reportado que luego que la A-FABP de adipocito se une a ácidos grasos (AG) sufre un cambio conformacional donde la Tyr 19 se vuelve accesible para la fosforilación por el receptor tirosín quinasa de insulina (Hresko et al., 1990). A pesar que EgFABP1 no tiene una Tyr 19, presenta una Thr 29 que podría ser blanco de fosforilación para la proteína quinasa C, ya que está localizada en un motivo consenso de fosforilación y está expuesta al solvente (Paulino et al., 1998). Además, este aminoácido está localizado en el dominio helical al igual que la Tyr 19 de la A-FABP.

En la literatura se encuentran FABPs con otras modificaciones. Ha sido reportada la acilación por ácidos grasos en la L-FABP (Dempsey et al., 1981), la carbonilación de la A-FABP y la L-FABP (Grimsrud et al., 2007; Smathers et al., 2012) y la nitración de la A-FABP (Koeck et al., 2009). Asimismo, se ha considerado la posibilidad de la desaminación de la Asn98 generando un Asp en la H-FABP de bovino. Ambas isoformas se encontraron en el citosol (pl 5.1 y 4.9), mientras que en mitocondrias sólo se encuentra la isoforma modificada de menor pl (Unterberg et al.,

1990). Ninguna de estas modificaciones sería aplicable para la isoforma de pI 8, ya que las mismas no cambian o disminuyen el punto isoeléctrico.

Por otro lado, en la isoforma de pI 8, el aumento en el pI podría deberse a la modificación postraduccional metilación de Lys, ya que la trimetil-Lys tiene carga positiva y es muy frecuente en algunas proteínas como las histonas (Walsh, 2006). El programa FindMod utilizado pronostica, para esta isoforma, posibles trimetilaciones de Lys en los péptidos ¹MEAF LGTWK⁹ , ¹⁰MEKSEGF DK¹⁸ y ⁸⁰EVASLITVENGVMKHEQDDK⁹⁹. Además, también es posible que algunos péptidos sufran amidación, que consiste en la pérdida de la mayor parte del aminoácido carboxilo terminal, quedando en el extremo sólo el grupo amino (Walsh, 2006).

No podemos descartar la existencia de alguna FABP modificada postraduccionalmente en tetratiridios, ya que en algunos geles bidimensionales se observa que una tercer proteína es reconocida por el anticuerpo. Esta proteína no fue analizada mediante MS.

Los resultados obtenidos en esta instancia abren un nuevo e interesante tema de investigación referido a la determinación de las posibles modificaciones postraduccionales que podrían portar las FABPs y las implicancias que podrían tener en la biología de *E. granulosus*.

Nos llama la atención que a pesar de someter al análisis mediante espectrometría de masa a una gran cantidad de proteínas de masa molecular similar a la de las FABPs, tanto de la fracción citosólica como nuclear, EgFABP2 no pudo ser identificada. Además, el anticuerpo utilizado, que reconoce tanto a EgFABP1 como EgFABP2, no reconoce ninguna proteína diferente a EgFABP1 en las fracciones analizadas. Estos hechos nos sugieren una expresión baja o nula de la proteína EgFABP2 en el estadio de protoescoleces, de manera tal que sería imposible detectarla utilizando esta metodología. Cabe mencionar que el ARNm de EgFABP2 sí se ha encontrado, ya que fue clonada a partir de RT-PCR, utilizando ARN de protoescoleces (Esteves et al., 2003a; Alvite, 2006). Sin embargo, puede estar ocurriendo algún mecanismo de regulación postranscripcional que impida la síntesis de la proteína correspondiente, como por ejemplo la regulación por microARNs. Este tipo de regulación ha sido encontrado recientemente en *E. granulosus* (Cucher et al., 2011). Asimismo, Mei y colaboradores sugieren una fuerte regulación de la traducción

de la As-p18, FABP del nemátodo *Ascaris suum*, ya que el ARNm se encuentra presente en estadios donde la proteína no es detectable (Mei et al., 1997).

La proteína EgFABP2 podría buscarse mediante una estrategia que requiere de una gran cantidad de material parasitario. La misma consiste en realizar una purificación parcial de FABPs mediante cromatografía de exclusión molecular a partir del extracto proteico del citosol, y someter este material, enriquecido en proteínas de tamaño similar a las FABPs, a electroforesis bidimensional-*Western Blot*-identificación mediante MS, como se realizó previamente. Se elegiría la fracción citosólica ya que en comparación con el resto de las fracciones obtenidas, es la fracción con mayor cantidad de proteínas totales y presenta una mayor proporción de FABPs respecto a las proteínas totales. Además, nos intriga el hecho de que la proteína EgFABP2 recombinante sufra problemas de solubilidad y una vez purificada mantenga su inestabilidad precipitándose rápidamente.

A partir del análisis de las fracciones subcelulares de *M. vogae* determinamos que tanto MvFABPa como MvFABPb se localizan en la fracción citosólica de las células de tetratiridios. Además, dichas proteínas son muy abundantes en relación a las proteínas totales, siendo MvFABPb más abundante que MvFABPa en esta fracción. Asimismo, tanto MvFABPa como MvFABPb están presentes en la fracción nuclear, mitocondrial y microsomal.

Era esperable la localización de las FABPs en estudio en el citosol. Sin embargo, nos intriga la detección de las tres isoformas de EgFABP1 y de las dos MvFABPs en la mayoría de los compartimentos analizados, ya que no se esperaba que colocalizaran en los mismos compartimentos. Descartamos una contaminación de las fracciones subcelulares, no sólo porque verificamos el enriquecimiento de las mismas, sino también porque en el caso de *M. vogae* este resultado es confirmado por otra metodología. De todas formas, vale la pena realizar un fraccionamiento subcelular más fino a nivel mitocondrial como el ejecutado por Börchers y colaboradores en donde aplicando ultracentrifugaciones en gradientes de sacarosa diferenciales separan membrana externa, interna y matriz mitocondrial (Börchers et cols., 1989). Además, sería interesante determinar la presencia de EgFABP1 fosforilada mediante *Western Blot* utilizando anticuerpos contra-fosfotirosina.

La otra estrategia utilizada para determinar la localización subcelular consistió en estudios de inmunolocalización usando marcadores subcelulares a través de microscopía confocal. Los experimentos de inmunolocalización en tetratiridios detectan

tanto a MvFABPa como a MvFABPb en citosol, núcleos y mitocondrias, verificando así los resultados obtenidos mediante el análisis de las fracciones subcelulares respectivas. Sería muy informativo llevar a cabo inmunomicroscopías electrónicas de transmisión utilizando los anticuerpos que reconocen específicamente a MvFABPa y a MvFABPb.

En este trabajo se demuestra por primera vez, la capacidad de las larvas de *M. vogae* de captar AG del medio. Nuestros resultados señalan que los AG capturados por los tetratiridios colocalizan con las MvFABPs, distribuyéndose de manera homogénea en el citosol. Es interesante el hallazgo de MvFABPb colocalizando con el BODIPY FL en gotas lipídicas, sugiriéndonos una posible función en el almacenamiento de AG. A pesar de no encontrar a MvFABPa en estas estructuras, no podemos descartar esta posibilidad. Sería necesario confirmar la identidad de estas estructuras con tinciones específicas, así como hacer un análisis más exhaustivo de distintas regiones de la larva buscando la presencia de MvFABPa en gotas lipídicas. Furlong y colaboradores demostraron, hace varios años, que análogos de fosfolípidos y AG fluorescentes se incorporan en cercarias y schistosomulas de *Schistosoma mansoni* (platelminto parásito, trematodo) y que éstos análogos de AG pueden ser metabolizados en lípidos neutros y fosfolípidos. Además, los AG fluorescentes se encuentran distribuidos difusamente y también en gotas lipídicas dispersas a lo largo de ambas formas (Furlong et al., 1995). En 1997, Brouwers y colaboradores también demuestran que los AG son capturados por las larvas de *S. mansoni* y son rápidamente incorporados preferentemente en fosfolípidos. Los AG sobrantes son empleados para la síntesis de TAG (Brouwers et al., 1997). Este grupo propone que la síntesis de TAG impide una concentración intracelular alta de AG libres. Además, una vez que los AG acilados se incorporan en TAG, están sujetos a deacilación o reacilación, posibilitando así su transferencia a otra clase de lípidos.

Los cestodos no poseen sistema digestivo, pero el tegumento está recubierto de pequeñas microvellosidades denominadas microtricas, las cuales tienen funciones mecánica, absorptiva, quimiorreceptora y táctil. Las microtricas son más cortas y finas en la región apical que en la región caudal, las primeras miden alrededor de 3 μm mientras que las segundas pueden llegar a medir hasta 6 μm de largo (Hess, 1980). Microtricas similares se observan en los protoescólecidos (Antoniou et Tselentis, 1993), detectándose diferencias en el tamaño entre la región apical y caudal de la misma índole. Además, el tegumento de la región apical es más fino y el citoplasma superficial que recubre las ventosas solamente tiene de 0.6 a 0.8 μm de espesor

(Hess, 1980). Detectamos en los tetratiridios analizados que las MvFABPs y el análogo de ácido graso son más abundantes a nivel del tegumento y del parénquima de la región apical. El mayor número de microtricas cortas y finas junto con un tegumento de menor espesor y un citoplasma superficial fino, facilitaría la entrada de anticuerpos, ácidos grasos y marcadores subcelulares en general, en la región apical. A nivel apical también se encuentran los canales excretores por los cuales podrían ingresar moléculas del medio al parásito.

Los platelmintos parásitos captan precursores lipídicos (AG, glicerol, colina, fosfocolina, etanolamina, fosfoetanolamina, inositol y fosfoinositol) para la síntesis de AG de cadena larga, fosfolípidos, TAG y esteroides (Young et Podesta, 1982, Meyer et al., 1966; Jacobsen et Fairbairn, 1967). Estos organismos necesitan de estos lípidos para realizar la biosíntesis y renovación de membranas debido al continuo crecimiento y reproducción asexual (Alvite et Esteves, 2011). En particular, Hess en los 80' observó que los tetratiridios de *M. vogae* crecen continuamente, aún cuando no se están dividiendo. Estos organismos tienen un crecimiento longitudinal en la parte posterior del cuerpo, dependiente del crecimiento del tegumento que ocurriría mediante la invasión de células germinativas en el sincitio del tegumento. El crecimiento continuo de los tetratiridios junto con el proceso de multiplicación requieren de una alta tasa de síntesis de lípidos y proteínas (Hess, 1980). Recientemente, se ha demostrado en *Echinococcus multilocularis* la presencia de lípidos en células germinativas, del tegumento y de almacenamiento de glucógeno y lípidos, en éstas últimas los lípidos marcados se encuentran mayoritariamente formando gotas lipídicas (Koziol et al., 2014).

A partir de la colocalización de MvFABPa y MvFABPb con el BOPIPY FL-C₁₆ no podemos afirmar que las MvFABPs unen este ligando *in vivo*. Sin embargo, apoyamos fuertemente esta hipótesis ya que previamente integrantes de nuestro grupo han demostrado mediante estudios de unión *in vitro*, donde se monitorea el aumento de fluorescencia al agregar cantidades crecientes de ligando a una cantidad fija de proteína, que tanto la MvFABPa como la MvFABPb recombinantes unen este análogo de AG (Tesina de grado de Cecilia Silvarrey, artículo en preparación). Para poder aseverar la unión *in vivo* sería necesario llevar a cabo ensayos que involucren el cultivo de las larvas con el ácido graso fluorescente, tal como se desarrolló para las microscopías, con la posterior preparación de extractos proteicos para ser sometidos a electroforesis bidimensionales en condiciones nativas. A partir de estos geles 2D se

podría visualizar el ácido graso fluorescente mediante un equipo de captación de imágenes fluorescentes (G-Box), realizando en paralelo *Western Blots* con los anticuerpos específicos. Si la señal de la proteína coincide con la del ácido graso no existirá duda que ocurre la unión *in vivo*. Un estudio similar al propuesto puede llevarse a cabo utilizando un AG marcado con C¹⁴, el mismo se detecta por autoradiografía. Otra alternativa podría ser aplicar estudios de FRET por microscopía (Transferencia de Energía de Resonancia de Förster) que permiten visualizar la transferencia de energía entre el donante y el aceptor si los mismos se encuentran entre 1-10 nm de distancia. En este caso la transferencia ocurriría entre el ligando y la FABP, cuyo anticuerpo específico tiene que ser reconocido por un anticuerpo marcado con un fluoróforo acorde al sistema. Cabe mencionar que este método determina que dos moléculas se encuentren a una determinada distancia entre sí, lo que no necesariamente implica que exista unión, pero la misma es muy probable.

En los últimos años, se ha debatido intensamente si los ácidos grasos son ingresados activamente a las células o si hay una difusión pasiva (Hamilton et al., 2002; Koonen et al., 2005). Recientemente se llega al consenso, postulando que en vertebrados los ácidos grasos ingresan a la célula por la acción facilitadora de proteínas (Chabowski et al., 2007). El mecanismo exacto por el cual se realiza el ingreso aún se desconoce, pero sí se han identificado proteínas de membrana que están vinculadas al mismo (Bonen et al., 2007). Estas proteínas serían la FABPpm de 43kDa, (Stremmel et al., 1985; Schwieterman, et al., 1988); la CD36 (FAT/CD36) una proteína fuertemente glicosilada de 88 kDa (Kobylka y Carraway, 1972; Abumrad et al., 1993) y proteínas de la familia de las FATPs (63-70 kDa) (Schaffer y Lodish, 1994; Gimeno et al., 2003; Hirsch et al., 2007). La descarga de los ácidos grasos desde la cara interna de la membrana celular hacia el citosol, sería facilitada por las FABPs o la ACBP (proteína de unión de acil-CoA) (Schaffer y Lodish, 1994; Doege y Stahl, 2006). Hay evidencias que indican que la proteína FAT/CD36 contactaría con las FABPs citosólicas (Spitsberg et al., 1995).

Nosotros demostramos que el análogo de ácido graso es incorporado por los tetratiridios y colocaliza con las MvFABPs. Nuestro grupo postula que tanto las HLBP como las FABPs están involucradas en el secuestro y transporte de lípidos (Alvite et Esteves, 2012). Miembros de la familia de proteínas de HLBP han sido identificados en *Echinococcus granulosus* (EgAgB) (Oriol et al., 1971), *Taenia solium* (TsHLBPs) (Sako et al., 2000; Lee et al., 2007; Kim et al., 2011), *Taenia crassiceps* (Tc-HLBP) (Zarlenga et al., 1994), *Moniezia expansa* (MeHLBP) (Jansen et Barrett, 1995; Barrett et al.,

1997) y en *Himenolepys diminuta* (H-HLBP) (Saghir et al., 2000; Saghir et al., 2001). La larva metacestode de *T. solium* expresa un complejo proteico hetero-oligomérico de 150 kDa, nombrado TsM, en la membrana sincitial. El mismo se acumula en el fluido del quiste, es secretado en los tejidos del hospedero y está involucrado en la captura de lípidos del hospedero (Lee et al., 2007). En *E. granulosus* el antígeno B (EgAgB) fue inicialmente identificado en el líquido hidático (Oriol et al., 1971). El mismo es altamente inmunogénico y es el componente mayoritario del líquido hidático correspondiendo al 90% de los antígenos purificados. Obal y colaboradores analizaron la composición lipídica de EgAgB aislados de quistes bovino y humano, identificando lípidos de varias clases, siendo los triglicéridos, una variedad de fosfolípidos, y el colesterol los más abundantes (Obal et al., 2012). El EgAgB adoptaría una estructura polimérica similar a las lipoproteínas plasmáticas animales. De esta manera, las HLBP se acumularían en el líquido del quiste y se secretarían en los tejidos del hospedero para participar en la captura de un amplio rango de ligandos hidrofóbicos (Obal et al., 2012). En cambio, como se menciona previamente, las FABPs son principalmente proteínas intracelulares que preferentemente unen ácidos grasos (Alvite et al., 2001; Storch et Thumser, 2010). En base a lo expuesto, se propone que las HLBP transportan los AG libres, fosfolípidos, triglicéridos y colesterol desde el hospedero hacia el parásito, y las FABPs remueven los AG de la superficie interna de la membrana celular transportándolos hacia compartimentos celulares. De esta forma, estos dos tipos de proteínas tendrían funciones biológicas distintivas y complementarias (Alvite et Esteves, 2012).

Al encontrar a MvFABPa y MvFABPb colocalizando con el análogo de ácido graso a nivel nuclear, podemos sugerir que dichas proteínas podrían ser en parte responsables del transporte de los AG hacia y desde el núcleo. Una función similar podría tener EgFABP1 ya que se encuentra presente en la fracción nuclear. Luego de buscar en EgFABP1, MvFABPa y MvFABPb, la presencia de la señal de localización nuclear (NLS) descrita en la A-FABP (Lys21-Arg30-Lys31) (Ayers et al., 2007, Gillian et al., 2007), hemos encontrado dicha señal tridimensional en MvFABPb y EgFABP1 (Esteves et Paulino, 2013). No descartamos que exista en MvFABPa una señal tridimensional de localización nuclear diferente a la ya reportada. Mediante modelado molecular identificamos tres residuos (Lys22-Arg30-Lys34) en MvFABPa, cuyos grupos R se encuentran en la misma región de la proteína y a distancias similares a las presentadas entre los grupos R de los residuos de la NLS mencionada previamente. Asimismo, analizamos si la señal de exportación nuclear (NES) descrita

en la A-FABP (Leu66-Leu86-Leu91) (Ayers et al., 2007, Gillian et al., 2007) está presente en las FABPs en estudio. Es así que encontramos esta señal tridimensional únicamente en MvFABPa (Leu67-Leu87-Leu92). Si bien tanto MvFABPb como EgFABP1 poseen la Leu 67, ambas carecen de las otras dos leucinas.

A través de los poros nucleares de la membrana nuclear podrían ingresar al núcleo complejos FABP-AG (Huang et al., 2004). Existen fuertes evidencias que postulan a las FABPs como candidatos para llevar adelante dicha función (Isseman et al., 1992; Schroeder et al., 2008; Hostetler et al., 2009). Una vez en el núcleo podrían interactuar con factores de transcripción, tales como los PPARs, para transferirles sus ligandos y así participar de los procesos de regulación de la expresión de genes involucrados en el metabolismo lipídico, desde genes codificantes para transportadores de lípidos hasta los que codifican para moléculas que intervienen en la síntesis o degradación de lípidos. La presencia de miembros de las FABPs de vertebrados en el núcleo y su interacción con los PPARs han sido demostradas (Isseman et al., 1992; Schroeder et al., 2008; Hostetler et al., 2009). En los invertebrados se han identificado miembros de esta familia de receptores (Thornton, 2003), compartiendo todos ellos la región de unión al ADN. Cabe mencionar el hallazgo de receptores nucleares tipo PPAR, en *Schistosoma mansoni*, platelminto parásito de la clase Trematoda (de Mendonça et al., 2000). También es factible que las FABPs sean las responsables del transporte de AG excedentes del núcleo hacia el citosol. De esta forma comienzan a descifrarse las etapas e identificarse las moléculas que intervienen en el proceso de señalización que conecta, a través de los AG, el medio extracelular con el núcleo. En base a la presencia de las FABPs en estudio y del análogo de ácido graso en el núcleo, y a las señales NLS y NES de estas proteínas, sugerimos que EgFABP1 y MvFABPb podrían llevar AG al núcleo, mientras que MvFABPa podría exportar del núcleo los AG excedentes impidiendo así su acción deletérea. Asimismo, cabe pensar en la existencia de receptores nucleares tipo PPAR en *E. granulosus* y *M. vogae* y en la probable interacción con EgFABP1 y MvFABPb.

Por otro lado, nuestros resultados nos permiten relacionar a MvFABPa con otros procesos ya que, a diferencia de MvFABPb, esta proteína colocaliza con el aparato de Golgi. Este organelo se encarga de modificar proteínas y lípidos que han sido sintetizados previamente tanto en el retículo endoplasmático rugoso (RER) como en el liso (REL) y etiquetarlos para enviarlos a donde corresponda, fuera o dentro de la célula. Además, el aparato de Golgi es responsable de los procesos de secreción celular mediante exocitosis, interviniendo en el proceso de producción de membrana

plasmática ya que los gránulos de secreción cuando se unen a la membrana pasan a formar parte de ésta, aumentando el volumen y la superficie de la célula. De la región del trans-Golgi también emergen vesículas lisosomales que transportan proteínas destinadas a los lisosomas (Alberts et al., 2008).

MvFABPa podría transportar sus ligandos hacia el aparato de Golgi, ayudando así a cubrir los requerimientos celulares de lípidos modificados, o podría sufrir ciertas modificaciones post-traduccionales, o secretarse al medio mediante exocitosis eliminando AG al medio. De verificarse alguna de estas funciones hipotéticas, sería específica de MvFABPa ya que MvFABPb no pudo ser encontrada en este organelo en el estadio larvario estudiado. Si existiera una fracción de MvFABPa modificada, esta sería pequeña ya que los *Western Blots* de las fracciones subcelulares no indican claramente la presencia de una tercera *spot*.

Recientemente se han identificado FABPs de cestodos como productos de excreción-secreción. EgFABP1 fue encontrada en el líquido hidático *in vivo* y en productos de excreción/secreción de protoescoléces (Aziz et al., 2011; Virginio et al., 2012). Asimismo, Kim y colaboradores encontraron que las FABPs de *Taenia solium* presentan un comportamiento diferencial, TsMFABP1 se secreta en el líquido hidático mientras que TsMFABP2 está confinada al interior celular (Kim et cols., 2012). El mecanismo por el cual se secretan estas FABPs de cestodos es desconocido, pudiendo darse a través de vesículas de secreción provenientes del aparato de Golgi o a través de un mecanismo independiente de péptido. No hemos podido detectar la presencia de secuencias señal clásicas de localización para retículo endoplásmico y aparato de Golgi en las proteínas EgFABP1 y MvFABPa, aplicando los programas bioinformáticos PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp>) y SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>), al igual que ocurrió con TsMFABP1 (Kim et cols., 2012). Además, analizamos a EgFABP1 y a MvFABPa con el programa Secretome 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP>) (Bendtsen et cols., 2004), no siendo clasificadas como proteínas secretadas mediante un mecanismo no-clásico. Cabe mencionar que esta última herramienta bioinformática se desarrolló en base a secuencias de proteínas de mamíferos que se secretan a través de una vía no clásica, son por ejemplo proteínas que carecen de péptido señal N-terminal (Bendtsen et cols., 2004). Todas las FABPs conocidas, con excepción de las de nemátodos (Mei et al., 1997; Plenefisch et al., 2000), carecen de péptido líder de secreción. Sería interesante investigar la presencia de las MvFABPs en el producto de excreción/secreción de los tetratiridios, así como en los tejidos de ratones infectados. Si encontráramos

únicamente a MvFABPa en el producto de excreción/secreción podríamos relacionar la señal de exportación nuclear que posee con su presencia en el aparato de Golgi. Podríamos pensar en una posible función específica de MvFABPa, exportando los AG excedentes del núcleo hacia el exterior celular, a través de vesículas de secreción generadas en el Golgi. Se ha reportado que las proteínas del hospedero atraviesan las capas del quiste hidático (Aziz et al., 2011), por lo tanto es posible que, debido a esta permeabilidad, EgFABP1 pudiera dejar el quiste. Esta hipótesis podría investigarse buscando la presencia de esta proteína en las capas del quiste y en el suero de pacientes infectados.

Tanto el metabolismo energético, como la presencia o ausencia de catabolismo de AG en estos organismos, son temas controversiales. Otro hallazgo interesante de este trabajo involucra la detección de EgFABP1, MvFABPa y MvFABPb en mitocondrias. Los cestodos utilizan como fuente preferencial de energía la glucosa almacenada en forma de glucógeno. Los parásitos adultos de la familia *Taeniidae* presentan un metabolismo anaeróbico estricto debido a la baja concentración de oxígeno en su hábitat natural (intestino de los hospederos definitivos). Además de vivir en ambientes con suministro de oxígeno limitado, estos organismos no presentan ni sistema circulatorio ni pigmentos respiratorios (Smyth et McManus, 1989). Sin embargo, los estadios larvarios presentan actividad aeróbica *in vivo* dependiente de la presencia de oxígeno que difunde a través de los tejidos de los hospederos intermediarios. De esta manera, el metabolismo energético de los cestodos varía de acuerdo al suministro de oxígeno del hábitat (Del Arenal et al., 2001).

Vinaud y colaboradores profundizaron el estudio del metabolismo energético en el cestodo *Taenia crassiceps* (Vinaud et al., 2007; Vinaud et al., 2009). Este grupo detectó la presencia de propionato y β -hidroxibutirato en las larvas de este organismo, indicando la existencia de oxidación de ácidos grasos como fuente alternativa de energía en circunstancias de escasez de fuentes energéticas del hospedero. La acción del propionato sería similar a la que lleva a cabo en el metabolismo de vertebrados, siendo un producto del catabolismo de ácidos grasos y actuando como una sustancia energética al ser convertido en succinato para ser utilizado en la cadena respiratoria (complejo de la fase II) para producir ATP, bajo condiciones de anaerobiosis (Lehninger, 1993). La producción de β -hidroxibutirato (cuerpo cetónico) podría indicar una mayor oxidación de AG, lo cual produciría una mayor cantidad de acetil-CoA que es indicativo del uso de una fuente de energía alternativa en el caso de escasez de glucógeno o glucosa.

Asimismo, la producción de acetato (precursor del β -hidroxibutirato) ha sido descrita en los estadios larvario y adulto de *Fasciola hepatica* en condiciones anaeróbicas (Tielens et al., 1987). Además, la presencia de ácidos orgánicos del ciclo de Krebs como oxalacetato, citrato, piruvato, succinato y fumarato (Zenka et Prokopic, 1987; Corbin et al, 1998, Vinaud et al 2007), muestran que en el estadio larvario de este platelminto el metabolismo energético es aeróbico a pesar de la baja tensión de oxígeno de su hábitat. McManus y Smyth también detectaron altas concentraciones de oxalacetato en *E. granulosus*, demostrando así la producción citosólica de este ácido cuando existe escasez de sustancias de almacenamiento energético (McManus et Smyth, 1982). No encontramos una explicación a la presencia de FABPs en mitocondrias distinta a la oxidación de AG. Considerando los antecedentes mencionados, así como nuestros resultados sería importante profundizar en el estudio de la oxidación de AG en mitocondrias en *E. granulosus* y *M. vogae*. Una aproximación viable sería la búsqueda de la actividad de las enzimas que participan en la oxidación de AG y la detección de sus productos metabólicos. Además, sería interesante determinar, mediante inmunomicroscopías electrónicas de transmisión o fraccionamientos subcelulares más finos, en qué regiones mitocondriales (matriz, membrana interna y externa) se localizan las FABPs.

En una segunda instancia nos centramos en el estudio de las interacciones que podrían llevar a cabo las proteínas de unión de ácidos grasos de los cestodos en estudio con membranas artificiales y con proteínas de los parásitos. Las FABPs podrían participar no sólo en la entrada y salida de AG a través de la membrana celular, sino también en el transporte hacia y desde los compartimentos intracelulares. En este recorrido, además de interactuar con diversas membranas, podrían interactuar con proteínas participando de alguna vía metabólica o regulatoria.

Previamente se ha demostrado la capacidad de unir ácidos grasos de rEgFABP1 (Alvite et al., 2001), de rMvFABPa y de rMvFABPb (Tesina de grado de Cecilia Silvarrey). En esta instancia nos centramos en el mecanismo de transferencia de ligandos desde estas tres FABPs hacia membranas artificiales mediante ensayos de FRET. Es así que hemos determinado que el mecanismo de transferencia de ligandos que utilizan estas tres proteínas es colisional, al igual que una FABP de *S. japonicum* y varias FABPs de mamíferos (Storch et Córscico, 2008; Hsu et Storch, 1996; McDermott et al., 2002). Este mecanismo implica un contacto directo entre la proteína y la membrana que facilita la transferencia del ligando. rEgFABP1 y

rMvFABPa presentan un comportamiento similar. Los resultados indican que la interacción de rEgFABP1 y rMvFABPa con las SUVs es mediada por factores iónicos e hidrofóbicos, y es probable que las interacciones iniciales entre la proteína y los grupos cargados de los fosfolípidos sean iónicas seguidas de interacciones hidrofóbicas directas y transitorias con la membrana.

Por otro lado, rMvFABPb posee un comportamiento dual dependiente del tipo de membrana fosfolípida con que se encuentre, de forma tal que presenta un mecanismo de transferencia del tipo colisional fuerte al transferir el ligando a las membranas negativas mientras que adopta un mecanismo del tipo colisional débil para entregar el ligando a las membranas neutras. Nuestros resultados sugieren que la alta densidad de carga positiva en la región helical de MvFABPb sería la responsable de la fuerte interacción electroestática que se establece con las membranas negativas o con proteínas de membrana que exponen residuos negativos. No encontramos una significación biológica clara para este comportamiento dual. Debido a la presencia de MvFABPb en gotas lipídicas sería interesante estudiar la posibilidad de que esta proteína interactúe con alguna proteína de este compartimento que exhiba residuos con carga negativa.

Varias experiencias establecen la importancia de los residuos básicos del dominio α -helicoidal, en particular las lisinas, para el establecimiento de contactos entre la FABP y las membranas (Herr et al., 1995, Herr et al.1996; Cistola et al., 1996; Córscico et al., 1998; Liou et al., 2001; Wu et al., 2001; Córscico et al., 2004; Córscico et al., 2005; Franchini et al., 2008). Se ha identificado a la Lys22 de la hélice α -I de la H-FABP como uno de los residuos responsables de la interacción (Herr et al., 1996). EgFABP1, MvFABPa y MvFABPb presentan en la posición 22 Arg, Lys e His, respectivamente, que podrían establecer interacciones electroestáticas con los fosfolípidos de membrana. MvFABPb tiene además una Arg21. Asimismo, EgFABP1 y MvFABPb poseen una Lys31 y MvFABPa una Arg30, localizados en la hélice α -II. Estos residuos básicos también podrían estar involucrados en el establecimiento de interacciones electroestáticas. Los modelos de las proteínas MvFABPa y MvFABPb indican una diferencia en la densidad de carga presente en la región helical. Al igual que otras FABP colisionales, rEgFABP1, rMvFABPa y rMvFABPb presentan un par de aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas y voluminosas expuestas al solvente, Phe 27 y Val 28, Phe 27 y Leu 28, y Phe 27 e Ile 28, respectivamente. Las cadenas laterales de estos aminoácidos ubicados en la hélice α -II adyacente al portal podrían atraer y orientar al ligando en su ingreso a la proteína, o estar involucradas en

las interacciones de la proteína con membranas u otras proteínas (Kennedy et Beauchamp, 2000).

Vale la pena aplicar metodologías complementarias que puedan confirmar y aportar más información a la forma de interacción FABP-membrana. Entre ellas se encuentra el método de Disrupción de vesículas; método sensible que puede ser usado directamente para monitorear las interacciones proteína-membrana. Se monitorea la disminución de la fluorescencia debida a la disrupción de un complejo fluorescente (terbio-ácido dipicolínico) que ha sido atrapado dentro de una vesícula, luego que una proteína se une a la membrana. Este método ha sido empleado para analizar las interacciones que llevan a cabo la I-FABP y la L-FABP con membranas (Falomir-Lockhart et al., 2011). El estudio de este tipo de interacciones también podría ser abordado mediante experimentos de mutagénesis dirigidas y ensayos de FRET, cambiando o deletando regiones o aminoácidos que se sospechan serían claves para la interacción. Por otro lado, el uso de modelos y dinámicas moleculares también han sido muy útiles para estudiar este tipo de relaciones (Villarreal et al., 2008; Falomir-Lockhart et al., 2011).

La interacción de las FABPs con otras proteínas puede ayudar a comprender sus funciones específicas. Tanto los factores de transcripción, como las enzimas que participan en el metabolismo de lípidos y las proteínas de membrana serían los principales candidatos para coordinar sus funciones con las de las FABPs. En este trabajo decidimos identificar las proteínas que interaccionan con las FABPs de los cestodos de interés. Como una primera aproximación aplicamos los métodos de captura de ligandos e inmunoprecipitación con anticuerpos específicos.

De esta manera identificamos tres proteínas relevantes: una proteína similar al factor de elongación de la planta del caucho (REF), precipitando con EgFABP1 (PE3); una proteína similar a una cadena liviana de la miosina (CLRM) de invertebrados, precipitando con MvFABPa y MvFABPb (Tta2 y Ttb2); y una proteína similar a la paramiosina de *E. granulosus*, precipitando con MvFABPa (Tta5). Nos resulta sumamente interesante que la mayoría de los candidatos a interactuar con estas FABPs sean proteínas musculares, a pesar que no encontramos la significancia biológica de este hallazgo. Es indudable que cualquier proteína identificada a partir de la metodología utilizada tiene que ser validada mediante otra técnica, para poder asegurar su interacción con las proteínas en estudio.

La proteína REF es altamente hidrofóbica e interacciona con monocapas lipídicas a nivel experimental (Berthelot y cols., 2012). PE3 podría ser una proteína de *E. granulosus* de unión a lípidos de membranas que de alguna manera podría interaccionar con la FABP. Por otro lado, resulta llamativo que la proteína identificada en tetratiridios, similar a la CLRM de invertebrados, sea un candidato a interactuar con las dos MvFABPs. La miosina es una proteína muy conservada y ubicua, localizada en todas las células eucarióticas, es responsable de la función motora generadora de diversos movimientos tales como citoquinesis, fagocitosis, y contracción muscular. Se han descrito siete clases de miosinas en base a las propiedades de los dominios “cabeza”. La miosina de clase II forma filamentos y está compuesta de dos subunidades de cadena pesada y cuatro subunidades de cadena liviana, dos esenciales y dos reguladoras (Trybus, 1994). Las cadenas reguladoras (CRLM) juegan un rol importante en la regulación de la contracción en el músculo liso y en las células no musculares, en donde la CLRM sufre fosforilaciones y desfosforilaciones. Cuando la CLRM se encuentra desfosforilada, la miosina II es inactivada. El músculo liso se contrae cuando la CLRM es fosforilada por una quinasa dependiente de calcio (Lodish et al., 2005). La proteína CRLM de *Schistosoma mansoni* podría estar vinculada con el efecto de la droga antiparasitaria Praziquantel, razón por la cual resulta interesante el estudio de una posible interacción FABP-CMRL. El Praziquantel se une directamente a la CLRM disparando su fosforilación (Gnanasekar et al., 2009). Hasta el momento no se ha reportado la existencia de este tipo de interacción en ningún organismo.

La proteína Tta5 similar a la paramiosina es otro candidato a interaccionar con MvFABPa. La paramiosina es el principal componente de los filamentos gruesos en varios invertebrados (Levin et al., 1976) e interacciona directamente con la cadena pesada de miosina (Mackenzie et Epstein, 1980). En esta instancia tampoco se encuentran reportes en la bibliografía de la interacción entre FABP y paramiosina. Podríamos verificar si es posible esta interacción mediante Resonancia Plasmónica de Superficie utilizando la paramiosina recombinante de *E. granulosus* (disponible en nuestro laboratorio).

Para verificar si los candidatos mencionados interactúan con las FABPs en estudio podríamos utilizar una metodología más compleja, como podría ser el uso de sistemas de doble híbrido de levaduras. También podríamos aplicar el método recientemente utilizado en *E. granulosus*, que involucra el marcado de las proteínas recombinantes con un agente entrecruzador como es Sulfo-SBED (Pierce) y su posterior incubación con el extracto proteico del parásito con luz UV, permitiendo así la

formación de complejos con las proteínas interactuantes. Luego el complejo es clivado y las proteínas de interés marcadas con biotina se recuperan por cromatografía de afinidad para ser identificada por espectrometría de masa (Rodrigues et al., 2012). Mediante esta estrategia podrían surgir nuevos candidatos de interacción.

Cabe mencionar que la mayoría de las proteínas candidatas a interaccionar con las FABPs en estudio, que surgen a partir de los ensayos de captura de ligandos e inmunoprecipitación, son sometidas a MS sin poder ser identificadas. En algunos casos esto se debe a la mala calidad de los espectros producto de la baja concentración proteica y podría mejorarse utilizando extractos proteicos más concentrados. En otros casos, en especial para *M. vogae*, la incapacidad para la identificación se debe a la falta de secuencias disponibles. De todas formas, se conservan los datos generados mediante espectrometría de masa para poder identificar estas proteínas cuando se aumente la información de secuencias de este organismo. Esperamos que esto ocurra a corto plazo ya que actualmente se está llevando a cabo el proyecto genoma de este organismo en el Instituto Sanger de Inglaterra (www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/helminth_genome_initiative/).

7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Este trabajo es un acercamiento a la dilucidación de las funciones de las FABPs de cestodos. Con este objetivo, abordamos dos aspectos esenciales que involucraron estudios de localización subcelular y de interacción (FABP-membrana y FABP-proteínas).

A partir de nuestros resultados concluimos que tres isoformas de EgFABP1 están presentes en la fracción citosólica, nuclear, mitocondrial y microsomal de células de protoescoléces de *E. granulosus*. Sugerimos que la proteína más abundante y con punto isoeléctrico igual al teórico es EgFABP1 sin modificaciones post-traduccionales, mientras que aquellas con pI menor y mayor, y menor concentración, posiblemente porten alguna modificación. Existen antecedentes que apoyan la hipótesis que postula que la fosforilación de un residuo de treonina en la región helical sería la modificación que porta la isoforma de pI menor. Por otro lado, la isoforma de pI mayor podría poseer trimetilaciones de lisinas. Nos planteamos como perspectiva el análisis de las modificaciones de estas isoformas mediante metodologías de MS más sensibles y estrategias de enriquecimiento de modificaciones.

A pesar de los esfuerzos realizados, EgFABP2 no pudo ser identificada en las fracciones analizadas, sugiriéndonos una expresión baja o nula en el estadio de protoescoléces. Nos planteamos en un futuro, repetir la metodología utilizada pero realizando una purificación parcial de FABPs previa, para así generar un extracto proteico enriquecido en estas proteínas. Asimismo, no descartamos que exista un mecanismo de regulación postranscripcional que impida la síntesis de la proteína correspondiente.

Por otro lado, tanto MvFABPa como MvFABPb se localizan en la fracción citosólica, nuclear, mitocondrial y microsomal, de las células de tetratiridios de *M. vogae*. La presencia de MvFABPa y MvFABPb en citosol, núcleo y mitocondrias fue verificada a través de inmunolocalizaciones.

Destacamos que este trabajo muestra, por primera vez, que los tetratiridios son capaces de capturar ácidos grasos del medio, y proporciona evidencias que indican que MvFABPa y MvFABPb podrían ser las responsables de distribuirlo en el citosol. Además, sugerimos la participación de MvFABPb en el almacenamiento de AG en gotas lipídicas en el citosol. Para investigar si las FABPs unen *in vivo* AG planeamos someter extractos proteicos de larvas cultivadas con el AG fluorescente, a electroforesis bidimensionales en condiciones nativas, con la posterior visualización de proteínas mediante *Western Blot* y del AG mediante un equipo de captación de fluorescencia en geles. Debido a que los cestodos son incapaces de la síntesis *de novo* de AG, proponemos que las formas larvarias de estos organismos capturan AG del medio para realizar la biosíntesis y renovación de membranas debido al continuo crecimiento y reproducción asexual.

En base a la localización nuclear de EgFABP1, MvFABPa y MvFABPb, así como del ácido graso fluorescente, y a la presencia de la señal de localización nuclear en dichas proteínas y de la señal de exportación nuclear exclusivamente en MvFABPa, sugerimos que EgFABP1 y MvFABPb podrían llevar AG al núcleo, mientras que MvFABPa podría exportar AG excedentes hacia el citosol. Asimismo, planteamos la posibilidad de que EgFABP1 y MvFABPb interactúen con factores de transcripción, transfiriéndoles sus ligandos y participando así de la regulación de la expresión génica. Actualmente, nuestro grupo de investigación se está centrando en esta problemática a través de la búsqueda de receptores nucleares tipo PPAR en *E. granulosus*.

A partir de la localización de MvFABPa en el aparato de Golgi proponemos dos hipótesis que restan ser investigadas. Sugerimos que esta proteína podría dirigirse al Golgi para ser modificada, o para ser secretada al medio llevando, posiblemente, AG hacia el exterior y así evitar su acción deletérea. Esta última hipótesis podría verificarse investigando la presencia de MvFABPa en el producto de excreción/secreción de los tetratiridios, así como en los tejidos de ratones infectados.

Asimismo, este trabajo demuestra la presencia de EgFABP1, MvFABPa y MvFABPb en mitocondrias. Es posible que estas proteínas transporten los AG hacia las mitocondrias para ser utilizados como vía alternativa de energía. Como perspectiva planteamos profundizar el estudio de la oxidación de AG en las larvas de *E. granulosus* y *M. vogae*, caracterizando a los productos metabólicos generados y a las

enzimas involucradas, así como determinar las regiones mitocondriales donde se localizan las FABPs.

A partir de los resultados generados en este trabajo, así como de los antecedentes en el tema, proponemos un modelo de transporte lipídico para cestodos en donde las HLBP_s capturan los AG del hospedero incorporándolos al parásito y las FABP_s remueven los AG de la superficie interna de la membrana celular y los transportan hacia compartimentos subcelulares. De esta forma, estas dos familias de proteínas de unión a lípidos tendrían funciones biológicas distintivas y complementarias.

Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que las FABP_s de los platelmintos parásitos llevarían a cabo la mayoría de las funciones que actualmente cumplen los diversos tipos de FABP_s de vertebrados, tal como se ha sugerido para la FABP ancestral (Esteves et Ehrlich, 2006).

Debido a la presencia de las tres isoformas de EgFABP1 y de las dos MvFABP_s en todos los compartimentos analizados, nos planteamos en un futuro llevar a cabo fraccionamientos subcelulares más finos, así como inmunomicroscopías electrónicas de transmisión con anticuerpos específicos. Buscamos así, abordar el estudio de la localización subcelular de estas proteínas con mayor profundidad y precisión, intentando encontrar localizaciones diferenciales atribuibles a funciones específicas.

En este trabajo, también determinamos que el mecanismo de transferencia de ligandos desde EgFABP1, MvFABP_a y MvFABP_b hacia membranas modelo es colisional. EgFABP1 y MvFABP_a presentan un comportamiento similar donde la interacción proteína-membrana es mediada por factores iónicos e hidrofóbicos. En cambio, MvFABP_b presenta un mecanismo de transferencia del tipo colisional fuerte al transferir el ligando a las membranas negativas mientras que adopta un mecanismo del tipo colisional débil para entregar el ligando a las membranas neutras. Sugerimos que la alta densidad de carga positiva en la región helical de MvFABP_b sería la responsable de la fuerte interacción electrostática que podría establecerse con las membranas negativas o con proteínas de membrana que exponen residuos negativos. Planteamos como perspectiva la aplicación de metodologías complementarias que puedan confirmar y aportar más información a la forma de interacción FABP-

membrana. Entre ellas se encuentra el método de Disrupción de vesículas, ensayos de FRET con FABPs mutadas mediante mutagénesis dirigida, y el uso de modelos y dinámicas moleculares.

A partir del análisis de las proteínas que podrían interactuar con las FABPs encontramos que una proteína similar al factor de elongación de la planta del caucho podría interactuar con EgFABP1, una proteína similar a la cadena liviana reguladora de la miosina (CLRM) de invertebrados podría interactuar con MvFABPa y MvFABPb, y una proteína similar a la paramiosina de *E. granulosus* podría interactuar con MvFABPa. Nos proponemos en un futuro verificar la interacción de los candidatos encontrados con las FABPs respectivas utilizando sistemas de doble híbrido de levaduras, o mediante un método que consiste en el marcado de la FABP recombinante con un agente entrecruzador y posterior incubación con el extracto proteico del parásito, los complejos formados son clivados y las proteínas interactuantes marcadas se recuperan por cromatografía de afinidad para ser identificada por espectrometría de masa. Mediante esta estrategia podrían surgir nuevos candidatos de interacción. La confirmación de la interacción de las FABPs con las proteínas musculares identificadas podría dar origen a un nuevo e interesante tema de investigación, totalmente desconocido hasta el momento.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abreu P.A., Miyasato P.A., Vilar M.M., Dias W.O., Ho P.L., Tendler M. et Nascimento A.L. (2004). Sm14 of *Schistosoma mansoni* in Fusion with Tetanus Toxin Fragment C Induces Immunoprotection against Tetanus and Schistosomiasis in Mice. *Infect. Immun.* 72: 5931.
- Abumrad N.A., El-Maghrabi M.R., Amri W.Z., López E. et Grimaldi P. (1993). Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long chain fatty acids that is induced during preadipocytes differentiation. Homology with human CD 36. *J. Biol. Chem.* 268:17665.
- Aebi H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*: 105: 121.
- Ahmadi N.A. et Meshkehkar M. (2011). An abattoir-based study on the prevalence and economic losses due to cystic echinococcosis in slaughtered herbivores in Ahwaz, south-western Iran. *J. Helminthol.* 85: 33.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. et Walter P. (2008). Capítulo 13: "Intracellular Vesicular Traffic". En *Molecular Biology of the Cell*, quinta edición publicada por Garland Science, Taylor & Francis Group NY USA, pp 749-812.
- Alpers D.H., Strauss A.W., Ockner R.K., Bass N.M. et Gordon J.I. (1984). Cloning of a cDNA encoding rat intestinal fatty acid binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 313.
- Alvite G. (2006). Tesis de Maestría PEDECIBA. "Tropomiosina: isoformas y vacunas". UdelaR, Uruguay.
- Alvite G. et Esteves A. (2011) Lipidic metabolism in parasitic plathyhelminthes. En: *Research in Helminths*. A. Esteves Ed. Transworld Research Network, Kerala, India, pp.107-120.
- Alvite G. et Esteves A. (2012). Mini review article: Lipid binding proteins from parasitic plathyhelminthes. *Frontiers in Physiology/Fatty Acid and Lipid Physiology*, 3: 363.
- Alvite G., Canclini L., Corvo I. et Esteves A. (2008). Two novel *Mesocestoides vogae* fatty acid binding proteins: functional and evolutionary implications. *FEBS J.* 275: 107.
- Alvite G., Di Pietro S., Santomé J., Ehrlich R. et Esteves A. (2001). Binding properties of *Echinococcus granulosus* fatty acid binding protein. *Biochem. Biophys. Acta* 1533: 293.

- Ammann R.W. et Eckert J. (1996). Cestodes. Echinococcus. *Gastroenterol Clin North Am.* 25: 655-689.
- Angelucci F., Johnson K.A., Baiocco P., Miele A.E., Brunori M., Valle C., Vigorosi F., Troiani A.R., Liberti P., Cioli D., Klinkert M.Q. et Bellelli A. (2004). *Schistosoma mansoni* fatty acid binding protein: specificity and functional control as revealed by crystallographic structure. *Biochemistry* 43: 13000.
- Antonenkov V.D., Sormunen R.T., Ohlmeier S., Amery L., Fransen M., Mannaerts G.P. et Hiltunen J.K. (2006). Localization of a portion of the liver isoform of fatty acid binding protein (L-FABP) to peroxisomes. *Biochem. J.* 394: 475.
- Antoniou M. et Tselentis Y. (1993). Studies on *Echinococcus granulosus* using scanning electron microscope. *Parasitol. Res.* 79: 537.
- Attanyaka D.P., Kekwick R.G. et Franklin F.C. (1991). Molecular cloning and nucleotide sequencing of the rubber elongation factor gene from *Hevea brasiliensis*. *Plant Mol. Biol.* 16: 1079.
- Ayers S.D., Nedrow K.L., Gillilan R.E. et Noy N. (2007). Continuous Nucleocytoplasmic Shuttling Underlies Transcriptional Activation of PPAR γ by FABP4. *Biochemistry* 46: 6744.
- Aziz A., Zhang W., Li J., Loukas A., McManus D.P. et Mulvenna J. (2011). Proteomic characterisation of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid from sheep, cattle and humans. *J. Proteomics.* 74:1560.
- Banaszak L., Winter N., Xu Z., Bernlohr D.A., Cowan S. et Jones T.A. (1994) Lipid-binding proteins- a family of fatty-acid and retinoid transport proteins. *Adv. Protein Chem.* 45: 89.
- Barrett J. (1981). *Biochemistry of Parasitic Helminths*. London: MacMillan
- Barrett J. (1983). *Biology of Eucestoda*, C. Arme and P.W. Pappas (Ed), Academic Press London, 391.
- Barrett J. et Körting W. (1976). Studies on beta-oxidation in the adult liver fluke *Fasciola hepatica*. *Int. J. Parasitol.* 6: 155.
- Barrett J., Saghir N., Timanova A., Clarke K. et Brophy P.M. (1997). Characterisation and properties of an intracellular lipid-binding protein from the tapeworm *Moniezia expansa*. *Eur. J. Biochem.* 250: 269.
- Bass N.M. (1985). Regulation of the Biosynthesis of Two Distinct Fatty Acid-binding Proteins in Rat Liver and Intestine. Influences of sex difference and of clofibrate. *Chem. Phys. Lipids* 38: 95.

- Bass N.M., Barker M.E., Manning J.A., Jones A.L. et Ockner R.K. (1989). Acinar heterogeneity of fatty acid binding protein expression in the livers of male, female and clofibrate-treated rats. *Hepatology* 9: 12.
- Becker M., Kalinna B.H., Waine G.J. et McManus D.P. (1994). Gene cloning, overproduction and purification of a functionally active cytoplasmic fatty acid-binding protein (Sj-FABPc) from the human blood fluke *Schistosoma japonicum*. *Gene* 148: 321.
- Belley A. et Chadee K. (1995). Eicosanoid production by parasites: from pathogenesis to immunomodulation? *Parasitol. Tod.* 11: 327.
- Bendtsen J.D., Jensen L.J., Blom N., von Heijne G. et Brunak S. (2004). Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Eng Des Sel* 17: 349.
- Bennett M.W. et Caulfield J.P. (1991). Specific binding of human low-density lipoprotein to the surface of schistosomula of *Schistosoma mansoni* and ingestion by the parasite. *Am. J. Pathol.* 138: 1173.
- Benning M. M., Smith A. F., Wells M. A. et Holden H. M. (1992). Crystallization, structure determination and least-squares refinement to 1.75 Å resolution of the fatty acid-binding protein isolated from *Manduca sexta*. *J. Mol. Biol.* 228: 208.
- Bernlohr D.A., Angus C.W., Lane M.D., Bolanowski M.A. et Kelly T.J. (1984). Expression of specific mRNAs during adipose differentiation: identification of an mRNA encoding a homologue of myelin P2 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 5468.
- Binas B., Danneberg H., McWhir J., Mullins L. et Clark A. J. (1999). Requirement for the heart-type fatty acid binding protein in cardiac fatty acid utilization. *FASEB J.* 13: 805.
- Bonen A., Chabowski A., Luiken J.J. et Glatz J.F.C. (2007). Is membrane transport of FFA mediated by lipid, protein or both? Mechanism and regulation of protein mediated cellular fatty acid uptake molecular biochemical and physiological evidence. *Physiology (Bethesda)* 22: 15.
- Borchers T., Unterberg C., Rtidel H., Robenek H. et Spener F. (1989). Subcellular distribution of cardiac fatty acid-binding protein in bovine heart muscle and quantitation with an enzyme-linked immunosorbent assay. *Biochim. Biophys. Acta.* 1002: 54.
- Britos L. (2000). Estudios celulares y moleculares del desarrollo estrobilar de *Mesocestoides corti*. Tesis de Maestría PEDECIBA. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

- Britos L., Dominguez L., Ehrlich R. et Marin M. (2000). Effect of praziquantel on the strobilar development of *Mesocestoides vogae* *in vitro*. *J. Helminthol.* 74: 295.
- Brouwers J.F.H.M., Smeenk M.B., van Golde L.M.G. et Tielens A.G.M. (1997). The incorporation, modification and turnover of fatty acids in adults of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 88: 175.
- Bruins Slot M., van der Heijden G., Rutten F., van der Spoel O., Mast E., Bredero A., Doevendans P., Glatz J. et Hoes A. (2008). Heart-type Fatty acid-binding protein in Acute Myocardial infarction Evaluation (FAME): Background and design of a diagnostic study in primary care. *BMC Cardiovascular Disorders* 8: 8.
- Canclini L. et Esteves A. (2009). *In vivo* response of *Mesocestoides vogae* to human insulin. *Parasitology.* 136: 203.
- Chabalgoity J.A., Harrison J.A., Esteves A., Demarco de Hormaeche R., Ehrlich R., Anjam K. et Hormaeche C. (1997). Expression and Immunogenicity of an *Echinococcus granulosus* Fatty Acid-Binding Protein in Live Attenuated *Salmonella* Vaccine Strains. *Infect. Immun.* 65: 2402.
- Chabalgoity J.A., Moreno M., Carol H., Dougan G. et Hormaeche C.E. (2000). *Salmonella typhimurium* as a basis for a live oral *Echinococcus granulosus* vaccine. *Vaccine* 19: 460.
- Chabowski A., Gorski J., Luiken J.J., Glatz J.F.C. et Bones A. (2007). Evidence for concerted action of FAT/CD36 and FABPpm to increase fatty acid transport across the plasma membrane. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 77: 345.
- Chalar C., Martínez C., Agorio A., Salinas G., Soto J. et Ehrlich R. (1999). Molecular Cloning and Characterization of a Thioredoxin Gene from *Echinococcus granulosus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262: 302.
- Chan C.P., Sum K.W., Cheung K.Y., Glatz J.F., Sanderson J.E., Hempet A., Lehmann M., Renneberg I. et Renneberg R. (2003). Development of a quantitative lateral-flow assay for rapid detection of fatty acid-binding protein. *J. Immunol. Methods* 279: 91.
- Chan L., Wei C.F., Li W.H., Yang C.Y., Ratner P., Pownall H., Gotto A.M. et Smith L.C. (1985). Human liver fatty acid binding protein cDNA and amino acid sequence. Functional and evolutionary implications. *J. Biol. Chem.* 260: 2629.
- Chiang C. P. et Caulfield J. P. (1989). Human lipoprotein binding to schistosomula of *Schistosoma mansoni*. Displacement by polyanions, parasite antigen masking, and persistence in young larvae. *Am. J. Pathol.* 135: 1015.
- Cistola D.P., Kim K., Rogl H. et Frieden C. (1996). Fatty acid interactions with a helix-less variant of intestinal fatty acid-binding protein. *Biochem.* 35: 7559.

- Cobo F., Yarnoz C., Sesma B., Fraile P., Aizcorbe M., Trujillo R., Diaz-de-Liaño A. et Ciga M.A. (1998). Albendazole plus praziquantel versus albendazole alone as a preoperative treatment in intra-abdominal echinococcosis caused by *Echinococcus granulosus*. *Trop. Med. Int. Health* 3: 462.
- Coe N.R. et Bernlohr D.A. (1998). Physiological properties and functions of intracellular fatty acid-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 139: 287.
- Coe N.R., Simpson M.A. et Bernlohr D.A. (1999). Targeted disruption of the adipocyte lipid-binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels. *J. Lipid Res.* 40: 967.
- Cooper T.G. et Beevers H. (1969). Mitochondria and glyoxysomes from castor bean endosperm. Enzyme constituents and catalytic capacity. *J. Biol. Chem.* 244: 3507.
- Corbin I., Simcoff R., Novak M. et Blackburn B.J. (1998). Metabolism of [3-¹³C]-pyruvate by cysticerci of *Taenia crassiceps*. *Parasitol. Res.* 84: 516.
- Córscico B., Cistola D.P., Frieden C. et Storch J. (1998). The helical domain of intestinal fatty acid binding protein is critical for collisional transfer of fatty acids to phospholipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 12174.
- Corsico B., Franchini G.R., Hsu K.T. et Storch J. (2005). Fatty acid transfer from intestinal fatty acid binding protein to membranes: electrostatic and hydrophobic interactions. *J. Lipid Res.* 8: 1765.
- Córscico B., Franchini G.R., Hsu K.T. et Storch J. (2005). Fatty acid transfer from intestinal fatty acid binding protein to membranes: electrostatic and hydrophobic interactions. *J. Lipid Res.* 46: 1765.
- Corsico B., Liou H.L. et Storch J. (2004). The alpha-helical domain of liver fatty acid binding protein is responsible for the diffusion-mediated transfer of fatty acids to phospholipid membranes. *Biochem.* 43: 3600.
- Córscico B., Liou H.L. et Storch J. (2004). The alpha-helical domain of liver fatty acid binding protein is responsible for the diffusion-mediated transfer of fatty acids to phospholipid membranes. *Biochemistry* 43: 3600.
- Cucher M., Prada L., Mourglia-Ettlin G., Dematteis S., Camicia F., Asurmendi S. et Rosenzvit M. (2011). Identification of *Echinococcus granulosus* microRNAs and their expression in different life cycle stages and parasite genotypes. *International J. Parasitol.* 41: 439.
- Davis A., Dixon H. et Pawlowski Z. (1989). Multicentre clinical trials of benzimidazole carbamates in human cystic echinococcosis (phase 2). *Bull World Health Organ* 67: 503.

- De Gerónimo E., Hagan R.M., Wilton D.C. et Córscico B. (2010). Natural ligand binding and transfer from liver fatty acid binding protein (LFABP) to membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1801: 1082.
- de Mendonça R.L., Escrivá H., Bouton D., Laudet V. et Pierce R.J. (2000). Hormones and nuclear receptors in schistosome development. *Parasitol Today* 16: 233.
- Dempsey M. E., McCoy K. E., Bakery H. N., Dimitriadou-Vafiadou A., Lorsbach T. et Howard J.B. (1981). Large Scale Purification and Structural Characterization of Squalene and Sterol Carrier Protein. *J. Biol. Chem.* 256: 1867.
- Del Arenal I.P., Flores A.G., Poole R.K. et Escamilla J.E., (2001). *Taenia crassiceps* metacestodes have cytochrome oxidase aa3 but not cytochrome c cytochrome o functioning as terminal oxidase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 114: 103.
- Doege H. et Stahl A. (2006). Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models. *Physiology (Bethesda)* 21: 259.
- Donovan M., Olofsson B., Gustafson A.L., Dencker L. et Eriksson U. (1995). The cellular retinoic acid binding proteins. *J. Steroid Biochem Mol Biol* 53: 459.
- Elola, S. (2009). Nuevas estrategias de la vigilancia de la Equinococosis quística. XXII Congreso de Hidatología, Colonia, Uruguay.
- El-On J. (2003). Benzimidazole treatment of cystic echinococcosis. *Acta Trop.* 85: 243.
- Erasmus D.A. (1975). *Schistosoma mansoni*: development of the vitelline cell, its role in drug sequestration, and changes induced by astiban. *Exp. Parasitol.* 38: 240.
- Espino A.M., Hillyer G.V. (2001). Identification of fatty acid molecules in a *Fasciola hepatica* immunoprophylactic fatty acid-binding protein. *J. Parasitol.* 87: 426-428.
- Esteves A. (2009). FABPs as vaccines. En: Fatty acid binding proteins. A. Esteves Ed. Singpost Research, India, pp. 69-87.
- Esteves A. et Ehrlich R. (2006). Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 142: 262.
- Esteves A., Dallagiovanna B. et Ehrlich R. (1993). A developmentally regulated gene of *Echinococcus granulosus* codes for a 15.5 kilodalton polypeptide related to fatty acid binding proteins. *Mol. Biochem. Parasitol.* 58: 215.
- Esteves A., Joseph L., Paulino M. et Ehrlich R. (1997). Remarks on the phylogeny and structure of fatty acid binding proteins from parasitic platyhelminths. *Int. J. Parasitol.* 27: 1013.

- Esteves A., Portillo V. et Ehrlich R. (2003a). Genomic structure and expression of a gene coding for a new fatty acid binding protein from *Echinococcus granulosus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1631: 26.
- Esteves A., Señorale M. et Ehrlich R. (2003b). A tropomyosin gene is differentially expressed in the larval stage of *Echinococcus granulosus*. *Parasitol. Res.* 89: 501.
- Esteves A. et Paulino M. (2013) *In silico* studies of *Echinococcus granulosus* FABPs. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 31: 224.
- Estuningish S.E., Smooker P.M., Wiedosri E., Widjajanti S., Vaiano S., Partoutomo S. et Spithill T.W. (1997). Evaluation of antigens of *Fasciola gigantica* as vaccines against tropical fasciolosis in cattle. *Int. J. Parasitol.* 27: 1419.
- Falomir-Lockhart L., Laborde L., Khan C., Storch J. et Córscico B. (2006). Protein-Membrane Interaction and Fatty Acid Transfer from Intestinal Fatty Acid Binding Protein: Support for a multi step process. *J. Biol. Chem.* 281: 14232.
- Falomir-Lockhart L.J., Franchini G.R., Guerbi M.X., Storch J. et Córscico B. (2011). Interaction of enterocyte FABPs with phospholipid membranes: Clues for specific physiological roles. *Biochim. Biophys. Acta* 1811:452.
- FAO (2007). Estimación del impacto económico de la Equinococosis Quística en el Cono Sur (Argentina, Brasil, Chile y Uruguay), pp10-14.
- Farley A.R. et Link A.J. (2009). Identification and quantification of protein posttranslational modifications. *Meth. Enzymol.* 463: 725.
- Feng L., Hatten M.E., Heintz N. (1994). Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron* 12: 895.
- Flower D.R. (1993). Structural relationship of streptavidin to calycins protein superfamily. *FEBS Lett.* 333: 99.
- Flower D.R. (1996). The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J.* 318: 1.
- Fournier N.C., Geoffrey M. et Deshusses J. (1978). Purification and characterization of a long chain, fatty-acid-binding protein supplying the mitochondrial beta-oxidative system in the heart. *Biochim. Biophys. Acta* 533: 457.
- Fraize M., Sarciron M.E., Saboulard D., Azzouz S., Debard A.L., Issaadi N., Bosquet G. et Petavy A.F. (2004). An *in vitro* model to evaluate the cytokine response in *Echinococcus* infections. *Parasitol. Res.* 92: 506.
- Franchini G.R., Storch J. et Córscico B. (2008). The integrity of the alpha-helical domain of intestinal fatty acid binding protein is essential for the collision-mediated transfer of fatty acids to phospholipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1781: 192.

- Fu Y., Martinez C., Chalar C., Craig P. S., Ehrlich R., Petavy A. F. et Bosquet G. (1999). A new potent antigen from *Echinococcus granulosus* associated with muscles and tegument. *Mol. Biochem. Parasitol.* 102: 43.
- Fukushima T., Isobe A., Hojo N., Shiwaku K., Yamane Y. et Torii M. (1993). *Parasitol. Res.* 79: 634.
- Furlong S.T., Thibault K.S., Morbelli L.M., Quinn J.J. et Rogers R.A. (1995). Uptake and compartmentalization of fluorescent lipid analogs in larval *Schistosoma mansoni*. *J. Lipid Res.* 36: 1.
- Furuhashi M. et Hotamisligil G.S. (2008). Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 7: 489.
- Ganformina M.D., Gutiérrez G., Bastiani M. et Sánchez D. (2000). A phylogenetic analysis of the lipocalin protein family. *Mol. Biol. Evol.* 17: 114.
- Gantz. I., Nothwehr S.F., Lucey M., Sacchettini J.C., Del Valle J., Banaszak L.J., Naud M., Gordon J. et Yamada T. (1989). Gastrotropin: not an enterooxyntin but a member of a family of cytoplasmic hydrophobic ligand binding proteins. *J. Biol. Chem.* 264: 20248.
- Gao T., Fukushima .T, Isobe A., Hojo N., Shiwaku K., Yamane Y. (1998). Arachidonic acid metabolism to prostaglandin E2, D2, F2alpha, and I2 in the plerocercoid of *Spirometra erinaceieuropaei*. *J. Parasitol.*, 84: 1107.
- Garcia T.C., Fonseca C.T., Pacifico L.G., Durães Fdo V., Marinho F.A., Penido M.L., Caliarí M.V., de Melo A.L., Pinto H.A., Barsante M.M., Cunha-Neto E. et Oliveira S.C. (2008). Peptides containing T cell epitopes, derived from Sm14, but not from paramyosin, induce a Th1 type of immune response, reduction in liver pathology and partial protection against *Schistosoma mansoni* infection in mice. *Acta Trop.* 106: 162.
- Garippa G., Varcasia A. et Scala A. (2004). Cystic echinococcosis in Italy from the 1950s to present. *Parasitología* 46: 387.
- Gillian R.E., Ayers S.D. et Noy N. (2007). Structural basis for activation of fatty acid-binding protein 4. *J. Mol. Biol.* 372: 1246.
- Gillilan R.W., Ayers A.D. et Noy N. (2007). Structural basis for activation of fatty acid-binding protein 4. *J. Mol. Biol.* 372: 1246.
- Gimeno R.E., Hirsch D.J., Punreddy S., Sun Y., Ortegon A.M., Wu H., Daniels T., Stricker- Krongrad A., Lodish, H.F. et Stahl A. (2003). Targeted deletion of fatty acid transport protein-4 results in early embryonic lethality. *J. Biol. Chem.* 278: 49512.

- Glatz J.F., van Breda E., Keizer H.A., de Jong Y.F., Lakey J.R. et Rajotte R.V. (1994). Rat heart fatty acid-binding protein content is increased in experimental diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* 199: 639.
- Glatz J.F., Vork M.M., Cistola D.P. et van der Vusse G.J. (1993). Cytoplasmic fatty acid binding protein: significance for intracellular transport of fatty acids and putative role on signal transduction pathways. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 48: 33.
- Gnanasekar M., Salunkhe A.M., Mallia A.K., He Y.X., Kalyanasundaram R. (2009). Praziquantel Affects the Regulatory Myosin Light Chain of *Schistosoma mansoni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 1054.
- Glatz J.F.C. et van der Vusse G.J. (1996). Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance. *Prog. Lipid Res.* 35: 243.
- Gobert G.N. (1998). Immunolocalization of schistosome proteins. *Microsc. Res. Tech.* 42: 176.
- Gomori G. (1942). A modification of the colorimetric phosphorus determination for use with the photoelectric colorimeter. *J. Lab. Clin. Med.* 27: 955.
- Gordon J.I., Alpers D.H., Ockner R.K. et Strauss A.W. (1983). The nucleotide sequence of rat liver fatty acid binding protein mRNA. *J. Biol. Chem.* 258: 3356.
- Grimsrud P.A., Picklo M.J., Griffin T.J. et Bernlohr D.A. (2007). Carbonylation of adipose proteins in obesity and insulin resistance. *Mol. Cell. Proteomics* 4: 624.
- Guarnera E.A. (2005). Echinococcosis quística: costos de la comunidad. *Parasitología Latinoamericana* 60: 101.
- Hamilton J., Guo W. et Kamp F. (2002). Mechanisms of cellular uptake of long-chain fatty acids: do we need cellular proteins?. *Mol. Cell Biochem.* 239: 17.
- Hanhoff T, Lucke C. et Spener F. (2002). Insights into binding of fatty acids by fatty acid binding proteins. *Mol. Cell. Biochem.* 239: 45.
- Haunerland N. H., Jacobson B. L., Wesenberg G., Rayment I. et Holden H. M. (1994). Three-dimensional structure of the muscle fatty-acid-binding protein isolated from the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Biochem* 33: 12378.
- Haunerland N.H. et Spener F. (2004). Properties and physiological significance of fatty acid binding proteins. *Adv. Mol. Cell. Biol.* 33: 99.
- He Y., Yang X., Wang H., Estephan R., Francis F., Kodukula S., Storch J. et Stark R.E. (2007). Solution-state molecular structure of apo and oleate-liganded liver fatty acid-binding protein. *Biochemistry* 46: 12543.
- Heath D.D., Jensen O. et Lightowlers M.W. (2003). Progress in control of echinococcosis using vaccination - a review of formulation and delivery of the

vaccine and recommendations for practical use in control programs. *Acta. Trop.* 85: 133.

- Hemer S., Konrad C., Spiliotis M., Koziol U., Schaack D., Förster S., Gelmedin V., Stadelmann B., Dandekar T., Hemphill A. et Brehm K. (2014). Host insulin stimulates *Echinococcus multilocularis* insulin signalling pathways and larval development. *BMC Biology* 12: 5.
- Herr F.M., Aronson J. et Storch J. (1996). Role of portal region lysine residues in electrostatic interactions between heart fatty acid binding protein and phospholipid membranes. *Biochemistry* 35: 1296.
- Herr F.M., Li E., Weinberg R.B., Cook V.R. et Storch J. (1999). Differential mechanisms of retinoid transfer from cellular retinol binding proteins types I and II to phospholipid membranes. *J. Biol. Chem.* 274: 9556.
- Herr F.M., Matarese V., Bernlohr D.A. et Storch J. (1995). Surface lysine residues modulate the collisional transfer of fatty acid from adipocyte fatty acid binding protein to membranes. *Biochemistry* 34: 11840.
- Hertz A.V. et Bernlohr D.A. (2000). The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function. *Trends Endocrinol Metab* 11: 175.
- Hertz A.V., Bennaars-Eiden A. et Bernlohr D.A. (2002). Increased lipolysis in transgenic animals overexpressing the epithelial fatty acid binding protein in adipose cells. *J. Biol. Chem.* 277: 50693.
- Hess E. (1980). Ultrastructural Study of the Tetrathyridium of *Mesocestoides corti* Hoespli, 1925: Tegument and Parenchyma. *Z. Parasitenkd* 61: 135.
- Hirsch D., Stahl A. et Lodish H.F. (2007). A family of fatty acid transporters conserved from mycobacterium to man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 8625.
- Horton R.J. (1989). Chemotherapy of Echinococcus infection in man with albendazole. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83: 97.
- Hostetler H.A., Avery L., McIntosh A.L., Atshaves B.P., Storey S.M., Payne H.R., Kier A.B. et Schroeder F. (2009). L-FABP directly interacts with PPAR in cultured primary hepatocytes. *J. Lipid Res.* 50: 1663.
- Koonen D.P., Glatz J.F., Bonen A. et Luiken J.J. (2005). Long-chain fatty acid uptake and FAT/CD36 translocation in heart and skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 1736: 163.
- Koziol U., Rauschendorfer T., Zanon Rodríguez L., Krohne G. et Brehm K. (2014). The unique stem cell system of the immortal larva of the human parasite *Echinococcus multilocularis*. *EvoDevo* 5:10.

- Hotamisligil G.S., Johnson R.S., Distel R.J., Ellis R., Papaioannou V.E. et Spiegelman B.M. (1996). Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science* 274: 1377.
- Hresko R.C., Hoffman R.D., Flores-Riveros J.R. et Lane D. (1990). Insulin receptor tyrosine kinase-catalyzed phosphorylation of 422(ap2) protein. *J. Biol. Chem.* 265: 21075.
- Hsu K.T. et Storch J. (1996). Fatty acid transfer from liver and intestinal fatty acid-binding proteins to membranes occurs by different mechanisms. *J. Biol. Chem.* 271: 13317.
- Huang H., Starobud O., McIntosh A., Kier A.B. et Schroeder F. (2002). Liver fatty acid-binding protein targets fatty acids to the nucleus. Real time confocal and multiphoton fluorescence imaging in living cells. *J. Biol. Chem.* 277: 29139.
- Irabedra P. (2009). Epidemiología y control de la equinocosis quística en el Uruguay. XXII Congreso Mundial de Hidatología. Colonia, Uruguay.
- Irabedra P. et Salvatella R. (2010). El proyecto subregional cono sur de control y vigilancia de la Hidatidosis. *Rev. Peru Med. Exp. Salud Pública* 27: 598.
- Isseman I., Prince R., Tugwood S. et Green S. (1992). A role for fatty acids and liver fatty acid binding protein in preriosome proliferation? *Biochem. Soc. Trans.* 20: 834.
- Jacobsen N.S. et Fairbairn D. (1967). Lipid metabolism in helminth parasites. 3. Biosynthesis and interconversion of fatty acids by *Hymenolepis diminuta* (Cestoda). *J. Parasitol.* 53: 355.
- Jakobsson E., Alvite G., Bergfors T., Esteves A. et Kleywegt G.J. (2003). The crystal structure of *Echinococcus granulosus* fatty-acid-binding protein 1. *Biochim. Biophys. Acta.* 1649: 40.
- Jansen D. et Barrett J. (1995). A novel lipid-binding protein from the cestode *Moniezia expansa*. *Biochem J.*, 311(Pt 1): 49.
- Karsenty J., Helal O., Lechene de la Porte P., Beauclair-Deprez P., Martin-Elyazidi C., Planells R., Storch J. et Gastaldi M. (2009). I-FABP expression alters the intracellular distribution of the BODIPY C16 fatty acid analog. *Mol. Cell. Biochem.* 326: 97.
- Kennedy M.W. et Beauchamp J. (2000). Sticky-finger interaction sites on cytosolic lipid-binding proteins?. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 1379.

- Kim H.K. et Storch J. (1992a). Mechanism of free fatty acid transfer from rat heart fatty acid-binding protein to phospholipid membranes. Evidence for a collisional process. *J. Biol. Chem.* 267: 20051.
- Kim H.K. et Storch J. (1992b). Free fatty acid transfer from rat liver fatty acid-binding protein to phospholipid vesicles. Effect of ligand and solution properties. *J. Biol. Chem.* 267: 77.
- Kim S.H., Bae Y.A., Yang Y., Hong S.T. et Kong Y. (2011). Paralogous proteins comprising the 150 kDa hydrophobic-ligand-binding-protein complex of the *Taenia solium* metacestode have evolved non-overlapped binding affinities toward fatty acid analogs. *Int J Parasitol.* 41: 1207.
- Kim S.H., Bae Y.A., Yang H.J., Shin J.H., Diaz-Camacho S.P., Nawa Y., Kang I., Kong Y. (2012). Structural and binding properties of two paralogous fatty acid binding proteins of *Taenia solium* metacestode. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 6: e1868.
- Kobyłka D. et Carraway K.L. (1972). Proteins and glycoproteins of the milk fat globule membrane. *Biochim Biophys Acta.* 288: 282.
- Koeck T., Willard B., Crabb J.W., Kinter M., Stuehr D.J. et Aulak K.S. (2009). Glucose-mediated tyrosine nitration in adipocytes: targets and consequences. *Free Radic. Biol. Med.* 46: 884.
- Konrad C., Kroner A., Spiliotis M., Zavala-Góngora R. et Brehm K. (2003). Identification and molecular characterisation of a gene encoding a member of the insulin receptor family in *Echinococcus multilocularis*. *Int. J. Parasitol.* 33: 301.
- Koziol U. et Castillo E. (2011). Cell proliferation and differentiation in cestodes. En: Research in Helminths. A. Esteves Ed. Transworld Research Network, Kerala, India, pp.121-138.
- Kubata B.K., Duszenko M., Martin S. et Urade Y. (2007). Molecular basis for prostaglandin production in hosts and parasites. *Trends Parasitol.* 23: 325.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680.
- Larrieu E. et Zanini F. (2012). Critical Analysis of cyst echinococcosis control programs and praziquantel use in South America, 1974-2010. *Rev. Panam. Salud Publica* 31: 1.
- Lee E.G., Kim S.H., Bae Y.A., Chung J.Y., Suh M., Na B.K., Kim T.S., Kang I., Ma L. et Kong Y. (2007). A hydrophobic ligand-binding protein of the *Taenia solium* metacestode mediates uptake of the host lipid: implication for the maintenance of parasitic cellular homeostasis. *Proteomics* 7: 4016.

- Leid R.W. et McConnell L.A. (1983b). Thromboxane A2 generation by the larval cestode, *Taenia taeniaeformis*. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 28: 67.
- Leid R.W. et McConnell L.A. (1983a). PGE2 generation and release by the larval stage of the cestode, *Taenia taeniaeformis*. *Prostaglandins Leukotrienes Med.* 11: 317.
- Lehninger A.L. (1993). *Principios de Bioquímica*. Segunda edición, Ediciones Omega, S.A., Barcelona.
- Levine R.J.C., Elfvin M, Dewey M.M. et Walcott B. (1976). Paramyosin in invertebrate muscles. II. Content in relation to structure and function. *J. Cell Biol.* 71: 273.
- Lightowers M.W., Jensen O., Fernandez E., Iriarte J.A., Woollard D.J., Gauci C.G., Jenkins D.J. et Heath D.D. (1999). Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep. *Int. J. Parasitol.* 29: 531.
- Liou H.L. et Storch J. (2001). Role of surface lysine residues of adipocyte fatty acid-binding protein in fatty acid transfer to phospholipid vesicles. *Biochemistry* 40: 6475.
- Liu R.Z., Denovan-Wright E.M. et Wright J.M. (2003). Structure, linkage, mapping and expression of the heart-type fatty acid-binding protein gene (fabp 3) from zebrafish (*Danio rerio*). *Eur. J. Biochem.* 270: 3223.
- Lodish, Berk, Matsudaina, Kraisler, Krieger, Scott, Zipursky et Darnell (2005). *Biología celular y molecular*, cap.9: Movimientos celulares impulsados por miosina. Quinta edición, Ed. Médica Panamericana, Bs-As, Argentina.
- Long E.K., Hellberg K., Foncea R., Hertzell A.V., Suttles J. et Bernlohr D.A. (2013). Fatty acids induce leukotriene C4 synthesis in macrophages in a fatty acid binding protein-dependent manner. *Biochim. Biophys. Acta.* 1831: 1199.
- López-Abán J., Casanueva P., Nogal J., Arias M., Morrondo P., Diez-Baños P., Hillyer G.V., Martínez-Fernández A.R. et Muro A. (2007). Progress in the development of *Fasciola hepatica* vaccine using recombinant fatty acid binding protein with the adjuvant adaptation system ADAD. *Vet. Parasitol.* 145: 287.
- Lowry O.H. (1957). Micromethods for the assay of enzymes. *Methods Enzymol.* 4: 366.
- Lücke C., Gutiérrez-Ganzález L.H. et Hamilton J.A. (2004). Cellular proteins and their fatty acids in health and disease. A.K. Duttaroy, F. Spener (Eds), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, capítulo 5, 95.

- Mackenzie J.M. et Epstein H.F. (1980). Paramyosin is necessary for determination of nematode thick filament length *in vivo*. *Cell* 22: 747.
- Madsen P., Rasmussen H.H., Leffers H., Honore B. et Celis J.E. (1992). Molecular cloning and expression of a novel keratinocyte protein (psoriasis-associated fatty acid binding protein [PA-FABP]) that is highly up-regulated in psoriatic skin and that shares similarity to fatty acid-binding proteins. *J. Invest. Dermatol.* 99: 299.
- Martin G.G., Danneberg H., Kumar L.S., Atshaves B.P., Erol E., Bader M., Schroeder F. et Binas B. (2003). Decreased liver fatty acid binding capacity and altered liver lipid distribution in mice lacking the liver fatty acid-binding protein gene. *J. Biol. Chem.* 278: 21429.
- Massey J.B., Bick D.H. et Pownall H.J. (1997). Spontaneous transfer of monoacyl amphiphiles between lipid and protein surfaces. *Biophys. J.* 4: 1732.
- McDermott L., Kennedy M.W., McManus D.P., Bradley J.E., Cooper A. et Storch J. (2002). How helminth lipid-binding proteins offload their ligands to membranes: differential mechanisms of fatty acid transfer by the ABA-1 polyprotein allergen and Ov-FAR-1 proteins of nematodes and Sj-FABPc of schistosomes. *Biochemistry* 41: 6706.
- McManus D.P. et Smyth J.D. (1982). Intermediary carbohydrate metabolism in protoescoleces of *Echinococcus granulosus* (horse and sheep strains) and *E. multilocularis*. *Parasitol.* 84: 351.
- Mei B., Kennedy M. W., Beauchamp J. et Komuniecki R. (1997). Secretion of a novel, developmentally regulated fatty acid-binding protein into the previtellic fluid of the parasitic nematode, *Ascaris suum*. *J. Biol. Chem.* 272: 9933.
- Mendes R.E., Zafra R., Pérez-Ecija R.A., Buffoni L., Martínez-Moreno A., Tendler M. et Pérez J. (2010). Evaluation of local immune response to *Fasciola hepatica* experimental infection in the liver and hepatic lymph nodes of goats immunized with Sm14 vaccine antigen. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105: 698.
- Meyer F., Kimura S. et Mueller J.L. (1966). Lipid metabolism in the larval and adult forms of the tapeworm *Spirometra mansonioides*. *J. Biol. Chem.* 241: 4224.
- Meyer F., Meyer H. et Bueding E. (1970). Lipid metabolism in the parasitic and free-living flatworms *Schistosoma mansoni* and *Dugesia dorotocephala*. *Biochim. Biophys. Acta* 210: 257.
- Mishkin S., Stein L., Gatmaitan Z. et Arias I.M. (1972). The binding of fatty acids to cytoplasmic proteins: binding to Z protein in liver and other tissues of the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47: 997.

- Mohamed A.E., Yasawy M.I. et Al Karawi M.A. (1998). Combined albendazole and praziquantel versus albendazole alone in the treatment of hydatid disease. *Hepatogastroenterology* 45: 1690.
- Moro P. et Schantz P.M. (2009). Echinococcosis: a review. *Int. J. Infect. Dis.* 13: 125.
- Moser D., Tendler M., Griffiths G. et Klinkert, M.Q. (1991). A 14-kDa *Schistosoma mansoni* polypeptide is homologous to a gene family of fatty acid binding proteins. *J. Biol. Chem.* 266: 8447.
- Motojima K. (2000). Differential effects of PPAR α activators on induction of ectopic expression of tissue-specific fatty acid binding protein genes in the mouse liver. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32, 1085.
- Nevhutalu P.A., Salafsky B., Haas W. et Conway T. (1993). *Schistosoma mansoni* and *Trichobilharzia ocellata*: comparison of secreted cercarial eicosanoids. *J. Parasitol.* 79: 130.
- Nielsen S.U. et Spener F. (1993). Fatty acid-binding protein from rat heart is phosphorylated on Tyr19 in response to insulin stimulation. *J. Lipid Res.* 34: 1355.
- Obal, G., Ramos, A.L., Silva, V., Lima, A., Batthyany, C., Bessio, M.I., Ferreira, F., Salinas, G. et Ferreira, A.M. (2012). Characterisation of the Native Lipid Moiety of *Echinococcus granulosus* Antigen B. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1642.
- Ockner R.K., Manning J.A., Poppenhausen R.B. et Ho W.K. (1972). A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues. *Science* 177: 56.
- Oko R. et Morales C.R. (1994). A novel testicular protein, with sequence similarities to a family of lipid binding proteins, is a major component of the rat sperm perinuclear theca. *Dev. Biol.* 166: 235.
- Oppermann M. (1992). Purified monoclonal antibodies and producing antibody fragments. In: *Monoclonal Antibodies*, edited by Peters J.H., Baumgarten H. (Springer Verlag), pp 258-261.
- Oriol R., Williams J.F., Esandi M.V.P. et Oriol C. (1971). Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20: 569.
- Owada Y., Abdelwahab S.A., Kitanaka N., Sakagami H., Takano H., Sugitani Y., Sugawara M., Kawashima H., Kiso Y., Mobarakeh J.I., Yanai K., Kaneko K., Sasaki H., Kato H., Saino-Saito S., Matsumoto N., Akaike N., Noda T. et Kondo H. (2006). Altered emotional behavioral responses in mice lacking brain-type fatty acid binding protein gene. *Eur. J. Neurosci.* 24: 175.

- Owada Y., Suzuki I., Noda T. et Kondo H. (2002). Analysis on the phenotype of E-FABP-gene knockout mice. *Mol. Cell. Biochem.* 239: 83.
- Paulino M., Esteves A., Vega M., Tabares G., Ehrlich R. et Tapia O. (1998). Modelling a 3D structure for EgDf1 from *Echinococcus granulosus*: putative epitopes, phosphorylation motifs and ligand. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 12: 351.
- Peeters R.A. et Veerkamp J.H. (1989). Does fatty acid-binding protein play a role in fatty acid transport? *Mol. Cell. Biochem.* 88: 45.
- Pelsers M.M. et Glatz J.F.C. (2009). Fatty acid-binding proteins: early biomarkers of tissue injury. En: Fatty acid binding proteins. A. Esteves Ed. Singpost Research, India, pp. 55-68.
- Pelsers M.M., Lutgerink J.T., Nieuwenhoven F.A., Tandon N.N., van der Vusse G.J., Arends J.W., Hoogenboom H.R. et Glatz J.F. (1999). A sensitive immunoassay for rat fatty acid translocase (CD36) using phage antibodies selected on cell transfectants: abundant presence of fatty acid translocase/CD36 in cardiac and red skeletal muscle and up-regulation in diabetes. *Biochem. J.* 337: 407.
- Porfido J.L., Alvite G., Silva V., Kennedy M.W., Esteves A. et Corsico B. (2012). Direct Interaction between EgFABP1, a Fatty Acid Binding Protein from *Echinococcus granulosus*, and Phospholipid Membranes. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 6: e1893.
- Ramajo V., Oleaga A., Casanueva P., Hillyer G.V. et Muro A. (2001). Vaccination of sheep against *Fasciola hepatica* with homologous fatty acid binding proteins. *Vet. Parasitol.* 97: 35.
- Richieri G.V., Ogata R.T. et Kleinfeld A.M. (1999). Fatty acid interactions with native and mutant fatty acid binding proteins. *Mol. Cell. Biochem.* 192: 77.
- Lorenzatto K.R., Monteiro K.M., Paredes R., Paludo G.P., da Fonseca M.M., Galanti N., Zaha A. et Ferreira H.B. (2012). Fructose-bisphosphate aldolase and enolase from *Echinococcus granulosus*: Gene expression patterns and protein interactions of two potential moonlighting proteins. *Gene* 506: 76.
- Rodríguez-Perez J., Rodríguez-Medina J.R., García-Blanco M.A. y Hillyer G.V. (1992). *Fasciola hepatica*: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a gene encoding a polypeptide homologous to a *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein. *Exp. Parasitol.* 74: 400.
- Rogers M.V., Henkle K.J., Fidge N.H. et Mitchell G.F. (1989). Identification of a multispecific lipoprotein receptor in adult *Schistosoma japonicum* by ligand blotting analyses. *Mol. Biochem. Parasitol.* 35: 79.

- Romig T., Dinkel A. et Mackensted U. (2006). The present situation of echinococcosis in Europe. *Parasitol. Int.* 55: S187.
- Rumjanek F.D. et Simpson A.J.G. (1980). The incorporation and utilization of radiolabelled lipids by adult *Schistosoma mansoni* *in vitro*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1: 31.
- Rumjanek F.D., Campos E.G. et Afonso L.C. (1988). Evidence for the occurrence of LDL receptors in extracts of schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 28: 145.
- Rumjanek F.D., McLaren D.J. et Smithers S.R. (1983). Serum induced expression of a surface protein in schistosomula of *Schistosoma mansoni*: a possible receptor for lipid uptake. *Mol. Biochem. Parasitol.* 9: 337.
- Ruse M., Broome A.M. et Eckert R.L. (2003). S100A7 (psoriasin) interacts with epidermal fatty acid binding protein and localizes in focal adhesion-like structures in cultured keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 121: 132.
- Sacchettini J.C., Gordon J.I. et Banaszak L.J. (1989) Crystal structure of rat intestinal fatty-acid-binding protein. Refinement and analysis of the *Escherichia coli*-derived protein with bound palmitate. *J. Mol. Biol.* 208: 327.
- Saghir N., Conde P.J., Brophy P.M. et Barrett J. (2000). A new diagnostic tool for neurocysticercosis is a member of a cestode specific hydrophobic ligand binding protein family. *FEBS Lett.* 487:181.
- Saghir N., Conde P.J., Brophy P.M. et Barrett, J. (2001). Biochemical characterisation of a hydrophobic ligand binding protein from the tapeworm *Hymenolepis diminuta*. *Int. J. Parasitol.* 31: 653.
- Sako Y., Nakao M., Ikeyima T., Piao X.Z., Nakaya K. et Ito A. (2000). Molecular characterization and diagnostic value of *Taenia solium* low-molecular-weight antigen genes. *J. Clin. Microbiol.* 38: 4439.
- Sambandam N. et Lopaschuk G.D. (2003). AMP-activated protein kinase (AMPK) control of fatty acid and glucose metabolism in the ischemic heart. *Prog. Lipid Res.* 42: 238.
- Schachtrup C., Emmler T., Bleck B., Sandqvist A. et Spener F. (2004). Functional analysis of peroxisome-proliferator-responsive element motifs in genes of fatty acid-binding proteins. *Biochem. J.* 382: 239.
- Schaffer J.E. et Lodish J.F. (1994). Expression, cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell* 74: 393.

- Scheja L., Makowski L., Uysal K.T., Wiesbrock S.M., Shimshek D.R., Meyers D.S., Morgan M., Parker R.A. et Hotamisligil G.S. (1999). Altered insulin secretion associated with reduced lipolytic efficiency in aP2^{-/-} mice. *Diabetes* 48: 1987.
- Schroeder F., Petrescu A.D., Huang H., Atshaves B.P., McIntosh A.L., Martin G.G., Hostetler H.A., Vespa A., Landrock D., Landrock K.K., Payne H.R. et Kier A.B. (2008). Role of fatty acid binding proteins and long chain fatty acids in modulating nuclear receptors and gene transcription. *Lipids* 43: 1.
- Schwieterman W., Sorrentino D., Potter B.J., Rand J., Kiang C.L., Stump D.D. et Berk P.D. (1988). Uptake of oleate by isolated rat adipocytes is mediated by a 40-kDa plasma membrane fatty acid binding protein closely related to that in liver and gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 359.
- Seubert W., Lamberts I., Kramer R. et Ohly B. (1968). On the mechanism of malonyl-CoA-independent fatty acid synthesis. I. The mechanism of elongation of long-chain fatty acids by acetyl-CoA. *Biochim. Biophys. Acta* 164: 498.
- Shaughnessy S., Smith E.R., Kodukula S., Storch J. et Fried S.K. (2000). Adipocyte metabolism in adipocyte fatty acid binding protein knockout mice (aP2^{-/-}) after short-term high-fat feeding: functional compensation by the keratinocyte fatty acid binding protein. *Diabetes* 49: 904.
- Shen W.J., Sridhar K., Bernlohr D.A. et Kraemer F.B. (1999). Interaction of rat hormone-sensitive lipase with adipocyte lipid-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5528.
- Shen W.J., Sridhar K., Bernlohr D.A. et Kraemer F.B. (1999). Interaction of rat hormone-sensitive lipase with adipocyte lipid-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5528.
- Shimizu F., Watanabe T.K., Shinomiya H., Nakamura Y. et Fujiwara T. (1997). Isolation and expression of a cDNA for human brain fatty acid-binding protein (B-FABP). *Biochem. Biophys. Acta*.1354: 24.
- Siegenthaler G., Hotz R., Chatellard-Gruaz D., Jaconi S. et Saurat J.H. (1993). Characterization and expression of a novel human fatty acid-binding protein: the epidermal type (E-FABP). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190: 482.
- Siles-Lucas M. (2009). Avances en el diagnóstico inmunológico. XXIII Congreso Mundial de Hidatología, Colonia del Sacramento, Uruguay.
- Silvarrey M.C. (2012). Tesis de grado de la Licenciatura en Bioquímica (UdelaR): "Caracterización de la proteína de unión a ácidos grasos de *Mesocestoides vogae* (MvFABPs): estudios estructurales y de unión a ligandos".

- Smathers R.L., Fritz K.S., Galligan J.J., Shearn C.T., Reigan P., Marks M.J. et Petersen D.R. (2012). Characterization of 4-HNE modified L-FABP reveals alteration in structural and functional dynamics. *PLoS ONE* 7: e38459.
- Smego Jr.R.A. et Sebanego P. (2005). Treatment options for hepatic cystic echinococcosis. *Int. J. Infect. Dis.* 9: 69.
- Smith A.J., Thompson B.R., Sanders M.A. et Bernlohr D.A. (2007). Interaction of the adipocyte fatty acid-binding protein with the hormone-sensitive lipase: regulation by fatty acids and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 282: 32424.
- Smith A.J., Sanders M.A., Juhlmann B.E., Hertzell A.V. et Bernlohr D.A. (2008). Mapping of the hormone-sensitive lipase binding site on the adipocyte fatty acid-binding protein (AFABP). Identification of the charge quartet on the AFABP/aP2 helix-turn-helix domain. *J. Biol. Chem.* 283: 33536.
- Smyth J.D. (1990). *In vitro* cultivation of parasitic helminths. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Smyth J.D. et McManus D.P. (1989). "The physiology and biochemistry of cestodes", en *Echinococcus and Hydatid Disease*, de R.C.A.Thompson, Oxford, Cambridge University Press, 135-171.
- Spetch D. et Vogt M. (1965). Asexual multiplication of *Mesocestoides* tetrathyridia in laboratory animals. *J. Parasitol.* 51: 268.
- Spitsberg V.L., Matitiashvili R.C., Gorewit R.C. (1995). Association and coexpression of fatty-acid binding protein and glycoprotein CD 36 in the bovine mammary gland. *Eur. J. Biochem.* 230: 872.
- Storch J. et Córscico B. (2008). The emerging functions and mechanisms of the mammalian fatty acid-binding proteins. *Ann. Rev. Nutrition* 28: 73.
- Storch J. et Kleinfeld A.M. (1986). Transfer of long-chain fluorescent free fatty acids between unilamellar vesicles. *Biochem.* 7: 1717.
- Storch J. et McDermott L. (2009). Structural and functional analysis of fatty acid-binding proteins. *J. Lipid Res.* 50: S126.
- Storch J. et Thumser A.E. (2000). The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1486: 28.
- Storch J., Bass N.N. et Kleinfeld A.M. (1989). Studies of the fatty acid-binding site of rat liver fatty acid-binding protein using fluorescent fatty acids. *J. Biol. Chem.* 264: 8708.
- Stremmel W., Strohmeyer G., Borchard F., Kochwa S. et Berk P.D. (1985). Isolation and partial characterization of a fatty acid binding protein in rat liver plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4.

- Tan N.S., Shaw N.S., Vinckenbosch N., Liu P., Yasmin R., Desvergne B., Wahli W. et Noy N. (2002) Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating transcription. *Mol. Cell Biol.* 22: 5114.
- Tempone A.J., Bianconi M.L. et Rumjanek F.D. (1997). The interaction of human LDL with the tegument of adult *Schistosoma mansoni*. *Mol. Cell. Biochem.* 177: 139.
- Tendler M., Brito C.A., Vilar M.M., Serra-Freire N., Diogo C.M., Almeida M.S., Delbem A.C., Da Silva J.F., Savino W., Garrat R.C., Katz N. et Simpson A.S. (1996). A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 269.
- Thompson J., Ory J., Reese-Wagoner A. et Banaszak L. (1999). The liver fatty acid binding protein-comparison of cavity properties of intracellular lipid-binding proteins. *Mol. Cell. Biochem.* 192: 9.
- Thompson R.C.A. (1995). Biology and Systematics of *Echinococcus*. En *Echinococcus* and Hydatid Disease (Thompson R.C.A. ed.), pp. 1-2 CAB INTERNATIONAL, Wallingford, UK.
- Thornton N.W. (2003). Nonmammalian nuclear receptors: Evolution and endocrine disruption. *Pure Appl. Chem.* 75: 1827.
- Thumser A.E. et Storch J. (2000). Liver and intestinal fatty acid-binding proteins obtain fatty acids from phospholipid membranes by different mechanisms. *J. Lipid Res.* 41: 647.
- Thumser A.E. et Storch J. (2007). Characterization of a BODIPY-labeled fluorescent fatty acid analogue. Binding to fatty acid-binding proteins, intracellular localization, and metabolism. *Mol. Cell. Biochem.* 299: 67.
- Tielens A.G., van den Heuvel J.M. et van den Bergh, S.G. (1987). Differences in intermediary energy metabolism between juvenile and adult *Fasciola hepatica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 24: 273.
- Todorov T., Mechkov G., Vutova K., Georgiev P., Lazarova I., Tonchev Z. et Nedelkov G. (1992). Factors influencing the response to chemotherapy in human cystic echinococcosis. *Bull World Health Organ* 70: 347.
- Torgerson P.R. (2006). Mathematical models for the control of cystic echinococcosis. *Parasitol. Int.* 55 (Suppl): S253.
- Trybus K. M. (1994). Role of myosin light chains. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 15: 587.

- Turnes A. (2011). Hydatid disease as a public health concern: A historical view. En: Research in helminths. A. Esteves (ed). Transworld Research Network, pp.1-20
- Unterberg C., Börchers T., Højrup P., Roepstorff P., Knudsen J. et Spener F. (1990). Cardiac fatty acid-binding protein. *J. Biol. Chem.* 265: 16255.
- van Breda E., Keizer H.A., Vork M.M., Surtel D.A., de Jong Y.F., van der Vusse G.J. et Glatz J.F. (1992). Modulation of fatty-acid-binding protein content of rat heart and skeletal muscle by endurance training and testosterone treatment. *Pflugers Arch.: Eur. J. Physiol.* 421: 274.
- van der Vusse G.J., van Bilsen M., Glatz J.F.C., Hasselbaink D.M. et Luiken J.J.F.P. (2002). Critical steps in cellular fatty acid uptake and utilization. *Mol. Cel. Biochem.* 239: 9.
- Varaldo P.B., Leite L. C., Dias W.O., Miyaji E.N., Torres F.I., Gebara V.C., Armôa G.R., Campos A.S., Matos D.C., Winter N., Gicquel B., Vilar M.M., McFadden J., Almeida M.S., Tendler M., et McIntosh D. (2004). Recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing the Sm14 antigen of *Schistosoma mansoni* protects mice from cercarial challenge. *Infect. Immun.* 72: 3336.
- Vassileva G., Huwyler L., Poirier K., Agellon L.B. et Toth M.J. (2000). The intestinal fatty acid binding protein is not essential for dietary fat absorption in mice. *FASEB J.* 14: 2040.
- Veerkamp J.H. et Maatman R.G. (1995). Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: their structure and genes. *Prog. Lipid Res.* 34: 17.
- Veerkamp J.H., van Kuppevelt T.H., Maatman R.G. et Prinsen C.F. (1993). Structural and Functional Aspects of Cytosolic Fatty Acid-Binding Proteins. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 49: 887.
- Ves-Losada A., Maté S.M. et Brenner R.R. (2001). Incorporation and distribution of saturated and unsaturated fatty acids into nuclear lipids of hepatic cells. *Lipids* 36: 273.
- Vilar M.M., Barrientos F., Almeida M., Taumaturgo N., Simpson A., Garratt R., et Tendler M. (2003). An experimental bivalent peptide vaccine against schistosomiasis and fascioliasis. *Vaccine* 22: 137.
- Villarreal M.A., Perduca M., Monaco H.L. et Montich G.G. (2008). Binding and interactions of L-BABP to lipid membranes studied by molecular dynamic simulations. *Biochim. Biophys. Acta* 1778: 1390.
- Vinaud M.C., Lino Rde S. Jr. et Bezerra J.C. (2007). *Taenia crassiceps* organic acids detected in cysticerci. *Exp. Parasitol.* 116: 335.

- Vinaud M.C., Ferreira C.S., Lino Rde S Jr. et Bezerra J.C. (2009). *Taenia crassiceps*: fatty acids oxidation and alternative energy source in *in vitro* cysticerci exposed to anthelmintic drugs. *Exp. Parasitol.* 122: 208.
- Virginio V.G., Monteiro K.M., Drumond F., de Carvalho M.O., Vargas D.M., Zaha A. et Ferreira H.B. (2012). Excretory/secretory products from *in vitro*-cultured *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Mol. Biochem. Parasitol.* 183:15.
- Waggoner D.W. et Bernlohr D.A. (1990). *In situ* labeling of the adipocyte lipid binding protein with 3-[125I]iodo-4-azido-N-hexadecylsalicylamide. Evidence for a role of fatty acid binding proteins in lipid uptake. *J. Biol. Chem.* 265: 11417.
- Walsh C.T. (2006). Posttranslational modification of proteins, Expanding nature's inventory. Roberts and Company Publishers, Englewood, Colorado USA.
- Walz D.A., Wider M.D., Snow J.W., Dass C. et Desiderio D.M. (1988). The complete amino acid sequence of porcine gastrotropin, an ileal protein which stimulates gastric acid and pepsinogen secretion. *J. Biol. Chem.* 263: 14189.
- Wang M., Liu Y.E., Goldberg I.D. et Shi Y.E. (2003). Induction of mammary gland differentiation in transgenic mice by the fatty acid-binding protein MRG. *J. Biol. Chem.* 278: 47319.
- Ward C. et Fairbairn D. (1970). Enzymes of beta-oxidation and the tricarboxylic acid cycle in adult *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) and *Ascaris lumbricoides* (Nematoda). *J. Parasitol.* 56: 1009.
- Webster J.D. (1949). Fragmentary studies on the life history of the cestode *Mesocestoides latus*. *J. Parasitol.* 35: 83.
- Weise M.J., Hsieh D., Hoffman P.M., Powers J.M. et Brostoff S.W. (1980). Bovine peripheral nervous system myelin P2 protein: chemical and immunological characterization of the cyanogen bromide peptides. *J. Neurochem.* 35:393.
- Wolfrum C., Borrmann C.M., Borchers T. et Spener F. (2001). Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors alpha - and gamma-mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: a signaling path to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci* 98: 2323.
- Wootan M.G., Bernlohr D.A. et Storch J. (1993). Mechanism of fluorescent fatty acid transfer from adipocyte fatty acid binding protein to membranes. *Biochemistry* 32: 8622.
- Wu F., Corsico B., Flach C.R., Cistola D.P., Storch J. et Mendelsohn R. (2001). Deletion of the helical motif in the intestinal fatty acid-binding protein reduces its interactions with membrane monolayers: Brewster angle microscopy, IR reflection-absorption spectroscopy, and surface pressure studies. *Biochemistry* 40: 1976.

- Yang Y., Spitzer E., Kenney N., Zschiesche W., Li M., Kromminga A., Muller T., Spener F., Lezius A., Veerkamp J.H., Smith G.H., Grosse R. et Salomon D.S. (1994). Members of the fatty acid binding protein family are differentiation factors for the mammary gland. *J. Cell. Biol.* 127: 1097.
- Young B.W. et Podesta R.B. (1982). Major phospholipids and phosphatidylcholine synthesis in adult *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 5: 165.
- Yuan H., You-En S., Long-Jiang Y., Xiao-Hua Z., Liu-Zhe L., Cash M., Lu Z., Zhi L. et Deng-Xin S. (2007). Studies on the protective immunity of *Schistosoma japonicum* bivalent DNA vaccine encoding Sj23 and Sj14. *Exp. Parasitol.* 115: 379.
- Zarlenga D.S., Rhoads M.L. et al-Yaman F.M. (1994). A *Taenia crassiceps* cDNA sequence encoding a putative immunodiagnostic antigen for bovine cysticercosis. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 67: 215.
- Zenka J. et Prokopic J. (1987). Malic enzyme, malate dehydrogenase, fumarate reductase and succinate dehydrogenase in the larvae of *Taenia crassiceps* (Zeder 1800). *Folia Parasitol.* 34: 131.
- Zhang F., Lucke C., Baier L.J., Sacchettini J.C. et Hamilton J.A. (2003). Solution structure of human intestinal fatty acid binding protein with a naturally-occurring single amino acid substitution (A54T) that is associated with altered lipid metabolism. *Biochemistry* 42: 7339.

9. ABREVIATURAS

12AS 12-(9-antioiloxi) ácido esteárico
1D unidimensional
2D bidimensional
2TY 16 g/l triptona, 10 g/l extracto de levadura, 5 g/l NaCl, se ajusta pH 7 con NaOH
ADN ácido desoxi-ribonucleico
ADNc ácido desoxi-ribonucleico copia
AG ácidos grasos
AOFA antioiloxi ácidos grasos
ARN ácido ribonucleico
ARNm ácido ribonucleico mensajero
BCA ácido bicinconínico
BCIP 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BODIPY fluoróforo 4,4-difloro-3a,4a-diaza-s-indaceno
BODIPY FL C₁₆ ácido palmítico unido al fluoróforo 4,4-difloro-3a,4a-diaza-s-indaceno
CL cardiolipina
D.E. desviación estándar
DAPI 4',6-diamidino-2-fenilindol, dihidrocloro
DTT ditioneitol
EDTA etilen diamino tetra acetato disódico
EPC fosfatidilcolina de huevo
FRET Transferencia de Energía de Resonancia de Förster
Ig inmunoglobulina
IPTG isopropil β-D-tiogalactopiranósido
K_D constante de disociación
kDa kilodalton
K_p coeficiente de partición relativo
LB Luria Bertoni
MALDI-TOF matrix assisted laser desorption ionization-time of flight
MitoTracker Orange CMTMRos chloromethyltetramethylrosamine
MS espectrometría de masa MALDI TOF-TOF
NADH nicotinamida adenina dinucleótido
NBD-PC N-(7-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazol-4-yl)-fosfatidilcolina

NBT nitroblue tetrazolium
PAGE electroforesis en gel de poliacrilamida
pb pares de bases
PBS buffer fosfato salino
PCR reacción en cadena de la polimerasa
PE protoescólecis
PHEM 25 mM Hepes, 60 mM Pipes, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂
PMSF fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PS fosfatidilserina
PVDF Polyvinylidene difluoride
RT-PCR retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa
SDS dodecil sulfato de sodio
solución de Hank's NaCl 136,89 mM, KCl 5,36 mM, Na₂HPO₄ H₂O 0,34 mM, KH₂PO₄ 0,44 mM, MgSO₄ 7H₂O 8 mM, CaCl₂ 2H₂O 1,27 mM, Glucosa H₂O 5,85 mM, ajustado a pH 7,4 con solución de NaHCO₃ al 8,4%
SUVs vesículas unilamelares pequeñas
TBS 25 mM Tris-HCl pH 7.4, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl
TBST 25 mM Tris, 8 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 0.05% Tween20
Tt tetratiridios
WB *Western Blot*