



Universidad de la República

Facultad de Ciencias

Cátedra de Inmunología- Instituto de Higiene

Tesina para optar al Título de Licenciado en Bioquímica.

Presentado por:

Bachiller AGUSTINA IRAZUSTA SILVESTRI

**ABORDAJE PRELIMINAR EN LA
IDENTIFICACIÓN DE GLICOPROTEÍNAS
PRESENTES EN ANTÍGENOS DE
ECHINOCOCCUS GRANULOSUS CON
POTENCIALES FUNCIONES INMUNO-
REGULADORAS.**

Tutor: Dra. Sylvia Dematteis

Co-Tutor: Lic. Marco Navatta

Montevideo, Uruguay. Año 2015.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer de todo corazón a mi familia, quienes siempre me brindan el aliento necesario para incentivarme a más. Luego, a mi tutora Sylvia Dematteis, por confiar en mí y guiarme en este momento tan importante de mi carrera. Así mismo, me gustaría extender el agradecimiento a Marco Navatta, el co-tutor y amigo más paciente del mundo.

A todos los amigos que fui encontrando a lo largo de la carrera, quienes hicieron de este recorrido algo genial: Verónica López, Claudio Rodríguez, Sebastián Miles, Lucía Alfaya, Cecilia Vallejo, Sabine De León, Alejandra Espíndola, Florencia Klein, Deborah Ernst y Ximena Doldán.

A la gente de la “casita de adelante” por su calidez y disposición: Verónica Fernández, Gustavo Mourglia-Ettlin, Ana Hernández, Emilia Villamil, Paula Arbildi y Cecilia Sónora. También me gustaría agradecer al resto de los integrantes del laboratorio por su buena onda.

A los amigos que conocí antes en mi vida y que siempre están a mi lado: Lucía Curbelo y Mariana Siniscalchi.

Me gustaría dedicar un agradecimiento especial a Andrés Amor, con sus constantes consejos y compañía todo se hizo más fácil.

Por último, pero no por eso menos importante, agradezco a la ANII por brindarme la Beca de Iniciación a la Investigación que me permitió finalizar esta tesina.

RESUMEN

La infección por *Echinococcus granulosus* (parásito cestodo) en humanos, se denomina equinococosis quística (conocida como hidatidosis). Cuando accidentalmente un quiste fértil se rompe, se produce una siembra del contenido interno del mismo (protoscoleces), que pueden originar nuevos quistes (infección secundaria).

Se ha estudiado el modelo de infección secundaria en ratones Balb/c, encontrándose que los glicoconjugados del protoescolex de *E. granulosus* (GPEG) muestran características bien interesantes. A su vez, resultados recientes han mostrado que una fracción de antígenos somáticos de protoscoleces de *E. granulosus* enriquecida en carbohidratos (denominada E4+) tendría un papel importante en la interrelación hospedero experimental-parásito (Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011a; Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011b; Baz *et al.*, 2006). En este contexto, resulta interesante identificar cuáles son las estructuras (glucídicas o proteicas) de los componentes de la fracción E4+.

Para el análisis de los componentes glucídicos, se utilizó un set de lectinas, y los resultados mostraron los componentes de E4+ fueron capaces de interaccionar de manera específica con las lectinas WGA y Con A. Estos resultados son consistentes con la estructura del motivo glucídico propuesto en un trabajo anterior por Khoo *et al.*, (1997).

En cuanto a los componentes proteicos, los resultados mostraron que uno de los componentes de la fracción E4+ es la Anexina de *E. granulosus*. Este resultado es bien relevante ya que reportes muy recientes muestran que las anexinas de parásitos podrían estar involucradas en las interacciones hospedador-parásito y en la modulación de la respuesta inmune del hospedador (Hofmann *et al.*, 2010).

En suma, los resultados obtenidos en este trabajo son la base de una nueva línea de investigación, la cual podría derivar en un diseño racional de inmuno-intervención en el hospedero intermediario natural.

Palabras clave: *Echinococcus granulosus*, Antígenos parasitarios.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
• Introducción general.	1
• <i>Echinococcus granulosus</i>	9
• Ciclo de vida.	9
• Equinococosis quística.	10
• Infección por <i>Echinococcus granulosus</i>	14
• Objetivo.	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
• Animales.....	19
• Antígenos parasitarios.....	19
• Antígenos somáticos de protoscoleces.	19
• Preparación de la fracción E4+ a partir de SPE.	20
• Ensayo del enriquecimiento en el epítipo reconocido por el E492/G1 en fracción E4+.....	25
• Puesta a punto del ensayo de unión de lectinas a SPE.	26
• Ensayo de unión de lectinas a SPE y E4+.	28
• Puesta a punto del ensayo de inhibición por sacáridos específicos de la unión de lectinas a antígenos de protoscoleces....	28
• Ensayo de inhibición por sacáridos específicos de la unión de lectinas a antígenos de la fracción E4+.	30
• Análisis por Western Blot de la inhibición específica de la unión de Con A a componentes de la fracción E4+.....	30

• Segundo método de purificación del anticuerpo monoclonal E492/G1.....	31
• Puesta a punto del ensayo de electroforesis bidimensional.	33
• Evaluación del tratamiento adecuado para la muestra.	33
• Evaluación del correcto funcionamiento de la E-2D.	35
• Evaluación del protocolo a utilizar en el isoelectroenfoco y el método de teñido del gel resultante.....	36
• Electroforesis bidimensional con SPE e <i>immunoblotting</i>	39
• Electroforesis bidimensional con fracción E4+ e <i>immunoblotting</i>	40
• Análisis de secuencia por mapeo peptídico.....	41
RESULTADOS.....	42
• Características de la fracción E4+.	42
• El AcMo del epítipo E492/G1 reconoce el motivo Gala(1,4)Galb (1,4)GlcNAc con mayor intensidad en la fracción E4+ que en SPE..	46
• Ensayos de unión a lectinas.	47
• Puesta a punto del ensayo de unión de un set de lectinas a componentes del SPE.	47
• WGA, Con A y LCH tienen la capacidad de unirse a componentes de la fracción E4+ y del SPE.....	48
• Sacáridos específicos inhiben la unión de las lectinas WGA y Con A a componentes de E4+ y del SPE.	49
• Con A interacciona con varios componentes de la fracción E4+. 51	
• Electroforesis bidimensional e <i>immunoblottings</i>	52
• Purificación del AcMo E492/G1 utilizando una nueva estrategia y obtención de un nuevo lote de la fracción E4+ (AcMo E492/G1 ₂₀₁₅).52	

• Estandarización de la electroforesis bidimensional.	55
• Evaluación del tratamiento adecuado para la muestra.	56
• Evaluación del correcto funcionamiento de la E-2D y la cantidad de muestra a utilizar.	57
• Evaluación del protocolo a utilizar en la primer corrida electroforética y el método de tñido del gel resultante.	59
• Resolución de los componentes de la fracción E4+ por electroforesis bidimensional (PM y PI) e <i>Immunoblotting</i> utilizando el AcMo E492/G1.	61
• Resolución de los componentes del SPE por electroforesis bidimensional (PM y PI) e <i>Immunoblotting</i> utilizando el AcMo E492/G1.	64
DISCUSIÓN	67
REFERENCIAS	75

INTRODUCCIÓN

Introducción general.

Los Helmintos son gusanos planos parásitos que se desarrollan, por lo general, en los aparatos digestivo, circulatorio, reproductor y en el sistema nervioso. Hay dos filos principales de Helmintos: los nematodos y los platelmintos. Los nematodos incluyen a los gusanos intestinales y los gusanos que causan la filariasis linfática, mientras que los platelmintos incluyen a los trematodos y cestodos (Hotez, 2008).

La interacción entre estos parásitos y los seres humanos comienza desde muy temprano en la historia, se han encontrado huevos de gusanos intestinales en heces momificadas de humanos que datan de miles de años. Por otra parte, estos agentes han convivido e interactuado con el sistema inmune del hospedador de forma tal de lograr un equilibrio que favorece su establecimiento en el cuerpo del mismo. Esta estrategia de asentamiento mediante evasión de las respuestas inmunes y reducción al mínimo de síntomas y signos en los hospedadores, favorece su supervivencia y posterior diseminación, siendo este su objetivo principal y apuntando a alargar cada vez más este período de convivencia (Vuitton, 2010).

Una característica importante de los parásitos es que inducen infecciones crónicas, por lo tanto, para poder sobrevivir por tiempos prolongados, tienen que haber desarrollado estrategias de evasión, supresión y/o modulación de la respuesta inmune del hospedero (Everts *et al.*, 2010). La identificación de los potenciales mecanismos que posean los helmintos para evadir y/o modular la respuesta inmune del hospedero, continúa siendo un punto de difícil abordaje dado que, estos parásitos son organismos complejos con complejos ciclos de vida.

Las infecciones por helmintos se caracterizan por desencadenar respuestas polarizadas de citoquinas de tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) con escasos o nulos componentes de tipo Th1, así como una prominente expansión de eosinófilos y mastocitos (Hotez *et al.*, 2010; Allen & Maizels, 2011). Se producen abundantes anticuerpos de todos los subtipos, especialmente IgE, IgG1 e IgG4 (McSorley & Loukas, 2010; Caldas *et al.*, 2008; Wright & Bickle, 2005). El papel de estas respuestas en la interacción hospedero- parásito permanece desconocido para muchas de estas infecciones y no se correlacionan con resistencia en todos los casos (Baz *et al.*, 2006). Las citoquinas son componentes importantes en la regulación del sistema inmune, y son secretadas por una variedad de células en respuesta a estímulos propios y foráneos. La comunicación entre células en un mismo sitio anatómico o distantes ocurre vía citoquinas, las cuales determinan la calidad y la intensidad de la respuesta inmune innata y adaptativa (Baz *et al.*, 2006).

La existencia de antígenos parasitarios capaces de sesgar la respuesta del hospedero hacia un perfil tipo-Th2 ha sido ampliamente descrita, y se ha visto que muchos de estos antígenos son glicoconjugados (Appelmelk *et al.*, 2003; Dai *et al.*, 2001; Anbu & Joshi, 2008; Hokke & Deelder, 2001; Sestak *et al.*, 2002; Atochina *et al.*, 2001; Terrazas *et al.*, 2001; Walker *et al.*, 2004; Everts *et al.*, 2009).

Algunos antígenos parasitarios podrían inducir respuestas tipo-Th2, por su capacidad de activar a las células dendríticas (DCs) a través de receptores tipo-Toll (TLRs), así como provocar una activación alternativa de los macrófagos (M ϕ) (figura 1). Por ejemplo, el antígeno de excreción/secreción del nematodo *Acanthocheilomena* (ES-62) (una glicoproteína que contiene fosforilcolina) y el antígeno soluble de huevo de *Schistosoma* (el glicoconjugado LNFPII), son capaces de interactuar con TLR-4 (Goodridge *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2004); lípidos que contienen fosfatidilserina derivados de *Schistosoma*, son capaces de interactuar con TLR-2 (Van Riet *et al.*, 2009). Además de los TLRs, las DCs poseen otro conjunto de receptores capaces de interactuar con glicoconjugados de parásitos helmintos. Como por ejemplo: “C-type lectins” (CLR), receptores de manosa, etc. (Allen & Maizels, 2011; Everts *et al.*, 2010; Harn, 2009; Van Die & Cummings, 2010; Perrigoue *et al.*, 2008). Se ha visto que el balance entre las señales mediadas por CLR y TLR, parecen ser cruciales para determinar el balance entre tolerancia e inmunidad (Geijtenbeek T.B.H. *et al.*, 2004; van Vliet S.J. *et al.*, 2008; van

Liempt E. *et al.*, 2007). Estudios recientes, realizados en DCs, revelan la capacidad de algunos CLRs de inducir cascadas de señalización intracelulares al unirse a glicanos patógenos, y muestran que dichas señales se intersectan con las vías de señalización de varios TLRs, incluyendo TLR2, TLR4, y TLR8 (figura 1). La señalización vía CLR puede anular la respuesta a una variedad de ligandos de TLR proinflamatorios como LPS, que en su lugar induce la secreción de citoquinas que polarizan la respuesta hacia un perfil Th2, de forma TLR- específica (Geijtenbeek & Gringhuis, 2009; Meevissen *et al.*, 2012; van Die & Cummings, 2006; Kuijk & van Die, 2010).

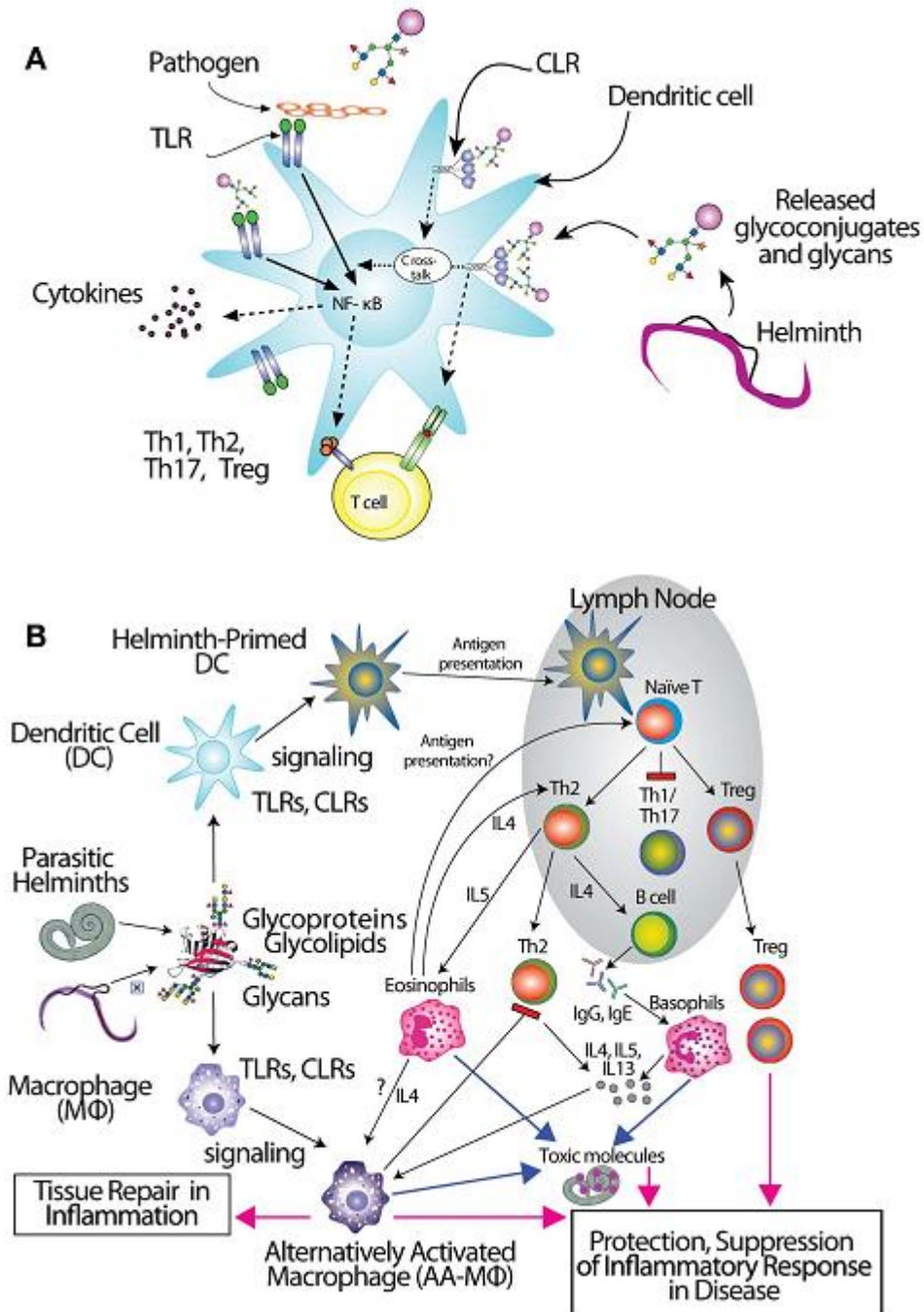


Figura 1. Interacción de glicanos parásitos con células del sistema inmune, y vías de regulación. (A) CLR (DC-SIGN) en cooperación con TLRs como TLR4, regulan la respuesta de las DCs ante los glicanos parásitos. **(B)** Esquema del posible rol que cumplen las DC y los Mφ en inducir respuesta inmune anti-inflamatoria al contacto con glicanos parásitos. (Imagen extraída de Salinger *et al.*, 2013)

Los linfocitos B, también son importantes células presentadoras de antígeno (APC) que requieren, al igual que las DCs, de señales de maduración para alcanzar su máxima función presentadora. Se ha demostrado *in vivo*, que los linfocitos B pueden contribuir en forma importante en la diferenciación de las células Th y que además pueden actuar como células reguladoras. Estas dos importantes funciones biológicas, recaen en la capacidad de los linfocitos B de secretar diferentes citoquinas, y en particular IL-10 (Barr *et al.*, 2007; Constant *et al.*, 1995; Linton *et al.*, 2003).

Actualmente, resulta claro que las células dendríticas a través de la secreción de IL-12 son capaces de sesgar la respuesta hacia un perfil tipo-Th1. Sin embargo, aún es algo controversial el hecho que las DCs sean capaces de disparar respuestas tipo-Th2, por lo menos de manera directa.

En este sentido, varios reportes han sugerido que los linfocitos B, podrían ser capaces de sesgar la respuesta hacia un perfil tipo-Th2 (Barr *et al.*, 2007; Macaulay *et al.*, 1997). Al igual que las células dendríticas, los linfocitos B expresan TLRs, y se ha reportado que las distintas subpoblaciones de linfocitos B (B1, B2, B-MZ) si bien no tendrían una expresión de TLRs cualitativamente diferente entre sí, parecen diferir en los niveles de expresión de éstos receptores (Genestier *et al.*, 2007; Gururajan *et al.*, 2007). Más aún, Barr *et al.*, (2007) reportaron que las

DCs y células B estimuladas vía el mismo TLR responden de manera distinta, secretando diferentes citoquinas.

A modo de ejemplo: estos autores han mostrado que las células B producen IL-10 e IL-6, en respuesta a agonistas de TLR-4 y TLR- 9, en contraste con las DCs que, frente a los mismos estímulos producen IL-12, IL-6 e IL-10. Los mismos autores reportaron además, que los linfocitos B1 y los linfocitos B de zona marginal (B-MZ) (ambos purificados a partir de células de bazo), muestran similitudes en la expresión de TLRs, pero las dos sub-poblaciones expresan niveles aumentados de TLR-2, TLR-6 y TLR-7, con respecto a las CDs. Estas dos sub-poblaciones de linfocitos B producen IL-10 cuando son estimuladas por ciertos agonistas de TLR-2 (Barr *et al.*, 2007).

De manera interesante, se ha mostrado que la IL-10 producida por células B-CD5+ en respuesta a CpG (un agonista de TLR-9), regula negativamente la respuesta pro-inflamatoria de las células dendríticas (Sun *et al.*, 2005). Más recientemente, se ha reportado que el desarrollo y función de células B productoras de IL-10 requieren de señales vía TLRs, aunque parecen requerir además de señales vía el receptor para el antígeno (Yanaba *et al.*, 2009).

Por lo tanto, los linfocitos B a través de la secreción de IL-10, podrían regular negativamente las respuestas de tipo-Th1, no solo favoreciendo indirectamente el desarrollo de respuestas tipo Th-2, sino también

reduciendo respuestas inflamatorias muy fuertes que eventualmente dañen tanto al parásito como al hospedero.

Por otra parte, se ha mostrado que algunos agonistas de TLRs tienen la capacidad de inducir directamente la activación y diferenciación de los linfocitos B en células productoras de anticuerpos, particularmente de las sub-poblaciones de B1 y B-ZM (Genestier *et al.*, 2007; Krieg *et al.*, 1995; Crampton *et al.*, 2009). Sin embargo, otros autores han sugerido que las células B podrían requerir de otras señales que actúen en forma sinérgica con los TLRs para inducir la proliferación y diferenciación de las células B (Boeglin *et al.*, 2011).

Hasta el momento la información disponible sobre receptores de las células B que tengan la capacidad de unir glicoconjugados, y que actúen en forma sinérgica con los TLRs es escasa, comparada con la información disponible para el caso de las DCs (Graham *et al.*, 2009; Cerutti *et al.*, 2011).

En el caso particular de las infecciones por helmintos, se ha mostrado por ejemplo, que la infección por *S. mansoni* promueve la expansión de células B1 peritoneales y células B de bazo, y que además oligosacáridos derivados de antígenos de huevo (SEA) promueven la proliferación B y secreción de IL-10 (Velupillai & Harn, 1994; Velupillai *et al.*, 1997). Esto sugiere que antígenos de este parásito podrían ser moduladores de la inflamación crónica, a través de la inducción de células B productoras de

IL-10 (Harris & Gause, 2011). Sin embargo, la asociación entre los linfocitos B, las respuestas tipo-Th2, y la susceptibilidad/resistencia a la infección por parásitos helmintos, continúa siendo un punto poco claro ya que depende mucho del tipo de helminto, del estadio del parásito y del hospedero que se analice (Harris & Gause, 2011).

Echinococcus granulosus.

- **Ciclo de vida.**

En el grupo de helmintos platelmintos se encuentran los cestodos, los cuales requieren estrictamente de dos hospederos mamíferos para completar su ciclo de vida. *Echinococcus granulosus* es un cestodo cuyo hospedero definitivo (donde se desarrolla el gusano adulto) es generalmente un cánido, y su hospedero intermediario (donde se desarrolla la larva o metacestodo) pueden ser varios ungulados (y accidentalmente humanos) (Figura 2). El hospedero definitivo (carnívoro) se infecta por ingesta de protoscoleces contenidos en quistes o metacestodos fértiles, los cuales se desarrollan principalmente en las vísceras del hospedero intermediario. Los protoscoleces se desarrollan a gusanos adultos (de 3 mm de longitud) en el intestino del hospedero definitivo, donde producen huevos. El hospedero intermediario (herbívoro u omnívoro) se infecta por la ingesta accidental de huevos dispersados por las heces del hospedero definitivo. Los huevos de este parásito son capaces de sobrevivir durante largos períodos (Thompson R.C.A., 1995).

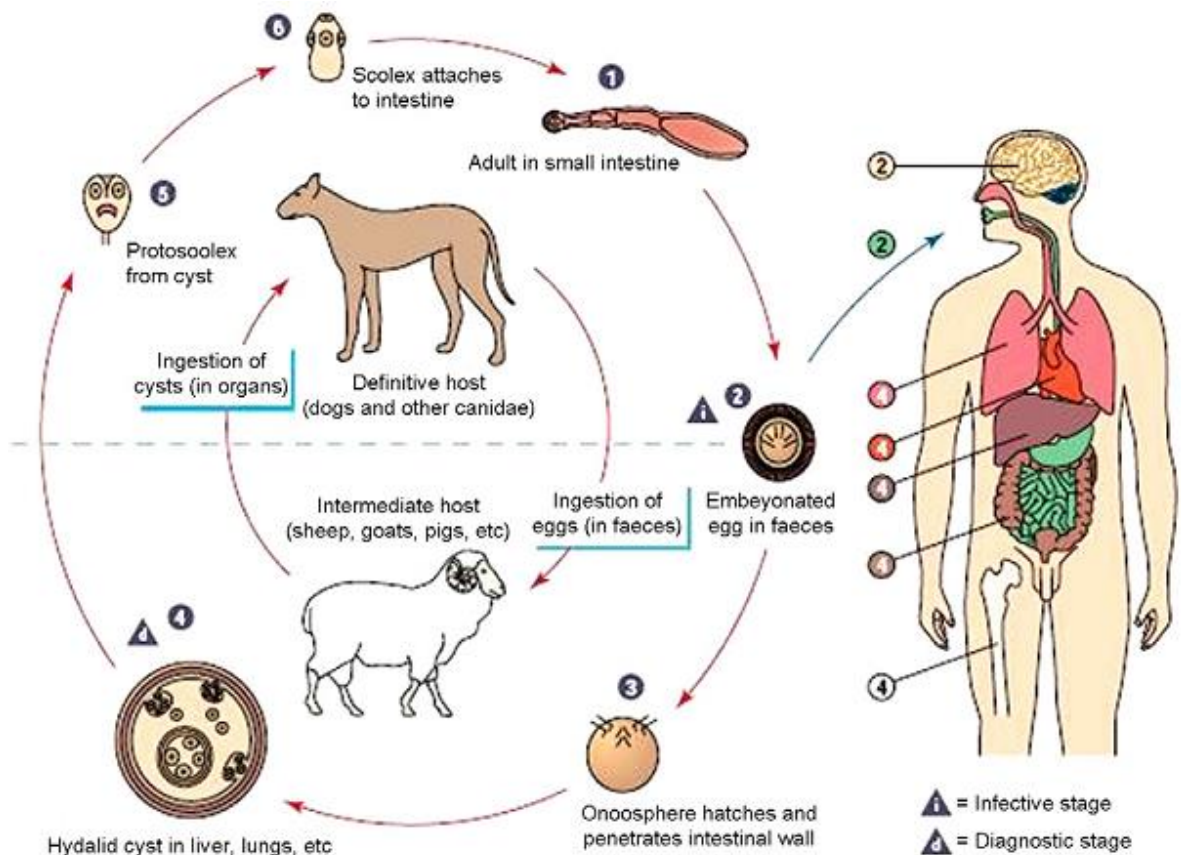


Figura 2. Ciclo de vida del parásito *Echinococcus granulosus* (imagen extraída de Moro & Schantz, 2008).

- **Equinococosis quística.**

La infección por *E. granulosus* se denomina equinocosis quística (conocida como hidatidosis). Presenta una distribución cosmopolita y la transmisión entre animales y humanos la hace pertenecer al grupo de enfermedades conocidas como zoonosis (Thomson R.C.A., 1995). La equinocosis quística humana presenta una prevalencia mundial estimada en 6 millones de individuos infectados (Siracusano *et al.*, 2009).

Como se mencionó previamente, el hospedero intermediario se infecta al ingerir huevos producidos por el gusano adulto. Una vez ingeridos, los huevos liberan los embriones (oncósferas) que penetran la pared intestinal, viajan a través de la sangre o la linfa, y quedan atrapados en los órganos internos, donde se desarrollan en metacestodos. El estadio de metacestodo o quiste hidático se desarrolla en órganos internos del hospedero intermediario (principalmente hígado y pulmones), y está compuesto por dos láminas: una interna (capa germinal) y otra externa (capa laminar) (figura 3).

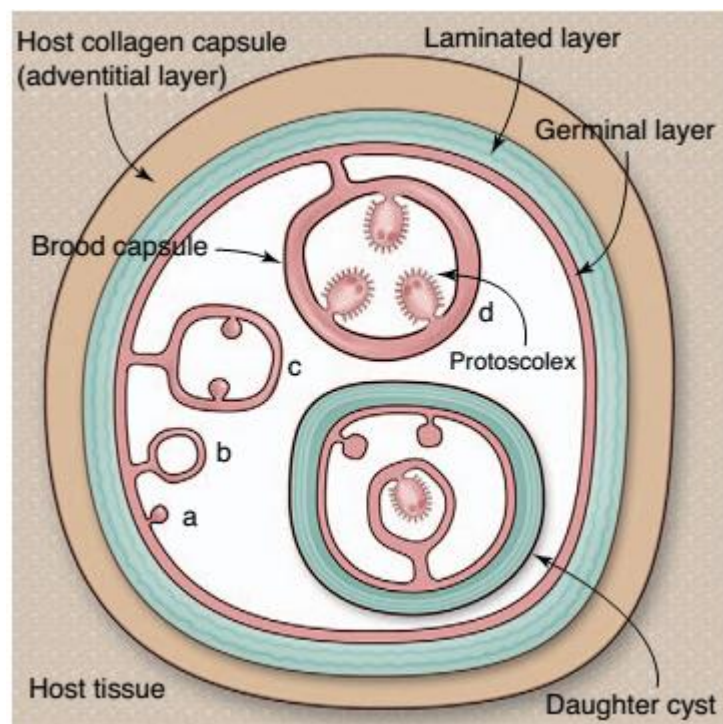


Figura 3. Representación del metacestodo de *E. granulosus* (imagen extraída de Díaz *et al.*, 2011).

La capa germinal está formada por una fina estructura celular que limita una cavidad llena de líquido (líquido hidático). El metacestodo se desarrolla como un quiste unilocular esférico y turgente, y crece incrementando su diámetro (Díaz *et al.*, 2011). La capa germinal forma vesículas prolíferas que por gemación interna generan protoscóleces (Thompson R.C.A., 1995). Separando la capa germinal de la matriz extracelular y de las células del hospedero se encuentra la capa laminar, una envoltura acelular rica en carbohidratos. La capa laminar alcanza aproximadamente hasta 3 mm de espesor y se describe como una matriz extracelular especializada, diseñada evolutivamente para mantener la integridad física del metacestodo y para proteger las células de la capa germinal de la respuesta inmune del hospedero. La síntesis de la capa laminar ocurre justo al comienzo del desarrollo del quiste. En este sentido, se reportó que oncósferas de *E. granulosus* desarrolladas *in vitro* secretan material fibrilar 3 días después de su activación, aunque el primer material que se asemeja a la malla madura de la capa laminar aparece en el día 6. Es probable que cuando el metacestodo se desarrolla a partir del protoscólex, que necesita ser reprogramado para el desarrollo reverso, la formación de la capa laminar se retrasa, apareciendo *in vitro* aproximadamente a los 28 días o *in vivo* después de 20-40 días (Díaz *et al.*, 2011).

En humanos (hospedero intermediario accidental), los quistes crecen lentamente (de 1 a 5 cm de diámetro por año), pudiendo alcanzar en el hígado unos 20 cm de diámetro. Con el tiempo se pueden formar septos internos y quistes hijos que perturban el patrón unilocular típico de los quistes hidáticos jóvenes. En su desarrollo pueden comprimir estructuras adyacentes, fisurarse, romperse o infectarse. Cuando accidentalmente un quiste fértil se rompe, se produce una siembra de protoscoleces que pueden originar nuevos quistes (infección secundaria) dada la capacidad de los protoscoleces de evolucionar a quistes en el hospedero intermediario (Figura 4) (Thompson, 1995).

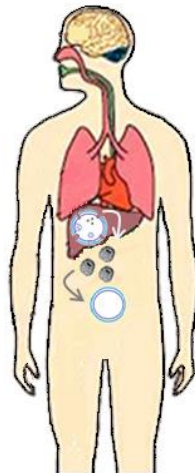


Figura 4. Infección secundaria en humanos.

- **Infección por *Echinococcus granulosus*.**

El modelo experimental de la infección secundaria, consiste en la administración vía intraperitoneal de protoscoleces a ratones de experimentación (Figura 5) (Heath, 1970).

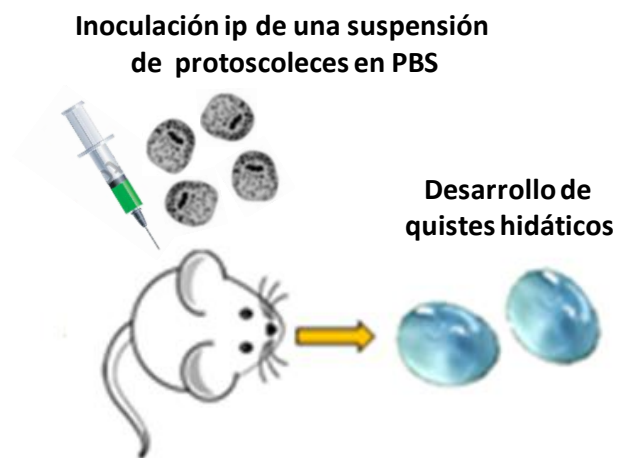


Figura 5. Modelo experimental de la infección secundaria.

En este modelo, la diferenciación del protoscolex a quiste (formación de la capa laminar) es un fenómeno que ocurre con relativa rapidez (aprox. 20 días) (Richards *et al.*, 1983).

Por otra parte, solo un pequeño número de los protoscoleces que se administran logran desarrollarse a quiste (<8%) (Ferragut & Nieto, 1996).

En este contexto, no resulta extraño pensar que los eventos tempranos que Dematteis *et al.*, (2003) documentaron (respuesta de citoquinas depende de la dosis de parásito a la que el hospedero se enfrenta), se producen localmente (es decir, en la cavidad peritoneal, que es el sitio

anatómico donde se establece la infección), y podrían tener una particular importancia en condicionar el resultado de la infección.

Utilizando como modelo experimental de infección secundaria en ratones Balb/c, se ha reportado recientemente que las poblaciones linfocitarias peritoneales tienen un comportamiento cinético diferente (Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011a). Particularmente, se mostró que se produce un descenso significativo muy rápido (5 días pi.) en el número de linfocitos B peritoneales (CD19+), que es acompañado por un activo proceso molecular asociado con la diferenciación de los linfocitos B en células productoras de anticuerpos (ASC) (Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011a).

Además, también se ha mostrado que la expresión temprana y local de citoquinas durante el establecimiento de la infección por *E. granulosus* muestra un comportamiento bifásico. Es decir, primero hay una predominancia de la expresión de citoquinas de tipo-Th1 (IFN- γ , IL-2 e IL-15), la que luego se sesga hacia un claro perfil tipo-Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13) (Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011a).

Cabe destacar que durante el período de la infección analizado por estos autores (hasta el día 9 pi), no se observó un aumento de la expresión de IL-12 y por lo tanto se ha sugerido que este comportamiento bifásico de la expresión de citoquinas a nivel local, junto con el no aumento de la expresión de IL-12, indicaría que *E. granulosus* sería capaz de modular la

respuesta de citoquinas hacia un perfil de tipo-Th2 para favorecer su sobrevivencia (Dematteis *et al.*, 2003; Dematteis *et al.*, 1999; Baz *et al.*, 2006). De esta forma, resulta importante identificar qué antígenos de *E. granulosus* podrían ser responsables de modular la respuesta hacia un perfil de tipo-Th2.

En este sentido, Baz *et al.*, (1999) produjeron un anticuerpo monoclonal (E492/G1), el cual reconoce un epítipo glucídico altamente representado en protoscolex, en la capa laminar del quiste y en el líquido hidático (Baz *et al.*, 2006). Recientemente, el epítipo reconocido por este AcMo ha sido completamente dilucidado y es el trisacárido [Gala(1,4)Gal β (1,4)GlcNAc β] (Lin *et al.*, 2013), presente en el antígeno P1, el cual se ha inmunolocalizado en el tegumento del protoscolex (Makini *et al.*, 1992).

Utilizando este AcMo, Baz *et al.* (1999), purificaron por cromatografía de afinidad, una fracción de antígenos de protoscolex enriquecidos en carbohidratos (que denominaron E4+).

Se ha reportado que los componentes de la fracción E4+ tienen características interesantes. Por ejemplo: a) son capaces de inducir la secreción de IL-10 por células peritoneales de ratones infectados y de ratones normales (Dematteis *et al.*, 2001) y b) células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con hidatidosis o de donantes sanos, secretan niveles importantes de IL-10 en respuesta a E4+ (Cardozo *et al.*, 2002).

Estos resultados llevaron a sugerir que los componentes de la fracción E4+ podrían estar involucrados con el resultado de la infección, basados en su capacidad de inducir una rápida secreción de IL-10 por linfocitos B normales.

Así, se ha mostrado que componentes de la fracción E4+: a) se unen a un alto porcentaje de células B (CD19+) peritoneales normales; b) inducen la secreción de IL-10 por linfocitos B peritoneales normales en forma T-independiente; y c) inducen la diferenciación de linfocitos B peritoneales en ASC, secretoras de anticuerpos totales de los isotipos IgM e IgG2b (Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011b).

Si bien estos resultados derivan de experimentos realizados *in vitro*, parecen ser consistentes con los efectos inducidos *in vivo* por *E. granulosus* (Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011a).

Por todo lo anteriormente descrito, sería razonable pensar que la fracción E4+ contendría antígenos que podrían ser los responsables de los efectos inducidos por el parásito vivo. Si esto fuera así, identificar cuáles son los componentes de la fracción E4+ tiene un sentido biológico relevante.

Por otra parte, Khoo *et al.* (1997), mostraron potenciales estructuras de los carbohidratos presentes en antígenos de protoscoleces de *E. granulosus*. Una de las estructuras en particular, propuesta por estos autores, se muestra en la Figura 6.

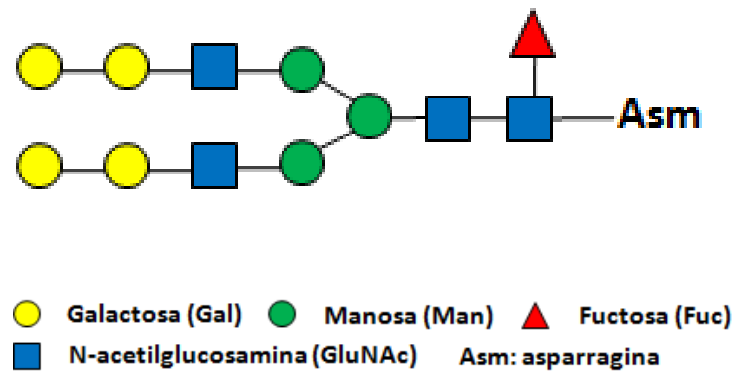


Figura 6. Estructura propuesta por Khoo *et al.*, (1997).

De manera interesante, la estructura propuesta por estos autores, contiene el epítipo reconocido por el AcMo E492/G1 utilizado para obtener la fracción E4+.

En este contexto, resulta relevante demostrar si esta estructura glucídica está presente en la fracción E4+, para posteriormente a través de productos de síntesis analizar su posible rol en la interacción hospedero experimental- parásito. Por las mismas razones, es importante comenzar a identificar los componentes proteicos de dicha fracción.

Objetivo.

Identificar, por lo menos parcialmente, cuales son las estructuras (glucídicas o proteicas) de los componentes de la fracción E4+.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales.

Se utilizaron ratones hembras Balb/c normales de 6-8 semanas de edad. Los mismos se obtuvieron del Bioterio de Cría de la Dirección de Laboratorios Veterinarios “Dr. Miguel Rubino” (DI.LA.VE) del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (M.G.A.P.).

Los animales fueron mantenidos en el Laboratorio Experimental de la Cátedra de Inmunología (Instituto de Higiene) con ciclos luz/oscuridad y temperatura controlada, y se los alimentó con ración y agua *ad libitum*. Los procedimientos realizados siguieron las Normas de Trabajo con Animales de Experimentación establecidas por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (C.H.E.A.) de la Universidad de la República.

Antígenos parasitarios.

- **Antígenos somáticos de protoscolec.**

Se partió de una suspensión de protoscolec obtenida según Baz, *et al* (1995). Muy brevemente, los protoscolec se obtuvieron por punción aséptica de quistes hidáticos bovinos fértiles, y se los lavó varias veces con buffer fosfato salino (PBS) pH 7,2 conteniendo gentamicina (40 µg/mL). Se disgregó 1 mL de protoscolec por ultrasonido en 10 mL de

PBS a 4°C, realizando 15 ciclos de 10 seg. de sonicación/min. a potencia máxima, con un sonicador ultrasónico (*Blackstone*, E.E.U.U). La fracción insoluble, se separó por centrifugación durante 10 min. a 10.000 r.p.m. y temperatura ambiente, y el sobrenadante (sonicado de protoscoleces, SPE) se conservó a -20°C.

- **Preparación de la fracción E4+ a partir de SPE.**

Cultivo estático del hibridoma E492/G1 y preparación de ascitis.

El hibridoma E492/G1 se cultivó en RPMI completo (RPMI; 10% suero fetal bovino (FCS) inactivado por calor; 100 µg/mL estreptomicina; 100 U/mL penicilina, 10 mM L-glutamina) a 37°C en atmósfera controlada con 5% de CO₂ hasta lograr un crecimiento confluyente. Luego, se centrifugaron las células durante 7 min. a 1200 r.p.m. y se determinó la viabilidad celular por tinción con azul de tripán (0,25%).

Preparación de ascitis.

Para la obtención de ascitis, se inocularon ratones normales con 200 µL de *Pristane* (*Sigma*®) por vía intraperitoneal y 10 días más tarde, fueron nuevamente inoculados por vía i.p. con 5x10⁶ células viables del hibridoma E492/G1. Una semana después de la inoculación del

hibridoma, se sacrificaron los animales y se extrajo el líquido ascítico, se centrifugó a 1200 r.p.m. durante 7 min. Finalmente, el sobrenadante se conservó a -20°C.

Purificación del anticuerpo monoclonal E492/G1.

El líquido ascítico se deslipidificó utilizando sulfato de dextrano y CaCl_2 de acuerdo a Aceti, *et al* (1989). Brevemente, a un volumen de ascitis se le añadió $0,05 \times V$ de una solución acuosa de CaCl_2 1 M y se agitó suavemente durante 10 min. a temperatura ambiente. La mezcla obtenida se centrifugó a 1200 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C.

Posteriormente, las inmunoglobulinas del líquido ascítico fueron purificadas utilizando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50% (Harlow E. & Lane D., 1988). Brevemente, se agregó lentamente un volumen V de una solución saturada de sulfato de amonio a un volumen V de líquido ascítico deslipidificado, incubando la mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de centrifugar la mezcla a 10.000 r.p.m. durante 20 min. a 4°C, la fracción insoluble se lavó dos veces con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50% y posteriormente se resuspendió en el mínimo volumen de PBS. Finalmente, se dializó toda la noche contra PBS con agitación constante. Se determinó la concentración proteica del anticuerpo monoclonal (AcMo) purificado por medida de absorbancia a 280 nm, conservándose a -20°C.

Preparación de la columna de cromatografía de afinidad.

La fracción γ -globulina (20 mg de proteínas totales) obtenida del líquido ascítico por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50% y se inmovilizó a una matriz de *Sepharose 4B* activada con BrCN (*Sigma*®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, la matriz junto con la fracción γ -globulina fue agitada durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego de eluir el excedente proteico, se bloquearon los grupos activos remanentes con buffer glicina 0,2 M pH 8,0 durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Los anticuerpos que pudieran no haber quedado unidos covalentemente a la matriz se removieron por lavados con buffer glicina 0,1 M pH 2,8 hasta alcanzar una absorbancia a 280 nm < 0,05. Por último, se lavó la columna con PBS hasta neutralidad y se almacenó a 4°C en PBS- NaN_3 (0,02%).

Purificación de la fracción E4+.

Luego de lavar la columna de E492/G1 acoplado a *Sepharose-CNBr* dos veces con PBS, se sembró 1 mL de SPE y se incubó durante 20 min. a temperatura ambiente. Antes de eluir la fracción retenida, la columna fue lavada con PBS hasta alcanzar un valor de absorbancia a 280 nm < 0,1. Como eluyente se utilizó 3 mL de buffer glicina 0,1 M pH 2,8, incubando durante 20 minutos, y posteriormente se recolectó un volumen V del eluato sobre un volumen V/500 de Buffer Tris 2 M pH 11. El procedimiento

se repitió dos veces más. El eluato (denominado fracción E4+) se dializó contra agua destilada por 24 horas, cambiando el agua cada 12 hs.

Las muestras se mantuvieron a -20°C, hasta juntar un volumen de 400 mL de eluato. Finalmente, luego de liofilizar (en equipo *Christ*, modelo *Alpha 1-4 LD Plus*) durante 48 hs los 400 mL de muestra, el producto obtenido se resuspendió en un mínimo volumen de PBS, y éste fue esterilizado por filtración con una membrana 0,22 µm y conservado a -20°C.

Determinación del contenido proteico del SPE y E4+.

La concentración proteica se determinó empleando el método del ácido bicinconínico (*Kit QuantiPro BCA Assay, Sigma®*), siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando una curva de calibración que partió de una concentración de 60 µg/mL de BSA (sero albumina bovina).

Determinación del contenido de glúcidos del SPE y E4+.

El contenido en carbohidratos se determinó de acuerdo a White & Kennedy (1986), con algunas modificaciones. Brevemente, se prepararon 8 diluciones seriadas al medio (100 µL de volumen final de cada dilución) del estándar (Dextrano T-2000), entre 800 y 25 µg/mL en PBS. A su vez, se prepararon 8 diluciones de la muestra (50 µL volumen final de cada dilución) seriadas al medio a partir de una dilución al cuarto en PBS. Se preparó una dilución de Resorcinol (2 µg/mL) en ácido sulfúrico

concentrado (reactivo), tomando las precauciones correspondientes. Se sembraron 40 μ L por pocillo de cada dilución de la muestra (E4+ o SPE resuspendido en un mínimo volumen de PBS) y del estándar, en una microplaca de 96 pocillos (*Greiner*). Se agregaron 160 μ L por pocillo de reactivo, mezclando suavemente. Se colocó la placa en una cámara húmeda con tapa de buen cierre en un baño de agua a 80°C durante 40 minutos. Luego, la placa se enfrió rápidamente en hielo. Se agitó suavemente en caso de precipitado y se determinó la absorbancia a 560 nm en un espectrofotómetro para placas (*Titertek Multiscan Plus, Low Laboratories*, Helsinki, Finlandia).

Ensayo de evaluación de la calidad de los lotes de AcMo E492/G1 biotinilados.

Previamente, se determinó la calidad de diferentes preparaciones del AcMo biotinilado. De esta manera, la calidad de 6 lotes del AcMo biotinilado, se realizó según el siguiente esquema: se sensibilizó una placa de microtitulación de 96 pocillos (*Greiner*) con 10 μ g/mL por pocillo de SPE, y se incubó toda la noche a temperatura ambiente en cámara húmeda. Luego, los sitios activos libres en la placa se bloquearon por incubación durante una hora a temperatura ambiente, con 200 μ L por pocillo de PBS-BSA 1%. Los lavados de la placa se realizaron con 200 μ L por pocillo de PBS-Tween (0,05%). Se dispensaron diluciones seriadas al medio de los diferentes lotes del anticuerpo monoclonal E492/G1,

comenzado a una concentración inicial de 100 µg/mL, en la placa (100 µL/pocillo), incubando una hora y media a 37°C en cámara húmeda. Luego, se dispensaron 100 µL por pocillo de una dilución apropiada de extravidina conjugada a peroxidada (*ExtrAvidin-Peroxidase*, Sigma®) diluida en PBS-BSA-Tween, y se incubó durante una hora y media a 37°C en cámara húmeda. Después de realizar tres lavados con 200 µL/pocillo de PBS-Tween (0,05%) y uno con PBS, se agregaron 100 µL por pocillo de solución de H₂O₂ como sustrato y ortofenilendiamina (OPD) como cromógeno, incubando en oscuridad durante 15 minutos. La reacción se detuvo con 50 µL por pocillo de H₂SO₄ 1N, y la absorbancia a 492 nm se midió en un lector colorimétrico de microplacas (*Titertek Multiscan Plus*, Low Laboratories, Helsinki, Finlandia).

- **Ensayo del enriquecimiento en el epítipo reconocido por el E492/G1 en fracción E4+.**

Uno de los 6 lotes de AcMo E492/G1-biotinilado analizados, se seleccionó para realizar el análisis del enriquecimiento en la fracción E4+ (comparado con SPE), del epítipo reconocido por el AcMo E492/G1. Para esto, se sensibilizó una placa de microtitulación 96 pocillos (*Greiner*), con 10 µg/mL en proteínas/pocillo tanto de la fracción E4+ como del SPE, incubando toda la noche a 4°C en cámara húmeda. La placa se bloqueó con PBS-BSA 1% (200 µL por pocillo), incubando durante una hora a temperatura ambiente. Se agregaron 100 µL por pocillo de anticuerpo

monoclonal E492/G1 conjugado a biotina, incubando una hora y media a 37°C en cámara húmeda. Se utilizaron diluciones seriadas al medio de E492G1-Biotina, partiendo de una concentración de 6,25 µg/mL. Luego de lavar con 200 µL por pocillo de PBS-T 0,05%, se agregaron 100 µL por pocillo de extravidina conjugada a peroxidada (*ExtrAvidin-Peroxidase*, *Sigma*®) diluida en PBS-BSA-Tween, y se incubó durante una hora y media a 37°C en cámara húmeda. Después de lavar 3 veces con 200 µL por pocillo de PBS-T, y una vez con 200 µL por pocillo de PBS, se dispensaron 100 µL por pocillo de solución de H₂O₂ como sustrato y ortofenilendiamina (OPD) como cromógeno, incubando durante 15 minutos en oscuridad. La reacción fue detenida con 50 µL por pocillo de H₂SO₄ 1N. Por último, se midió la absorbancia a 492 nm en un lector de microplacas (*Titertek Multiscan Plus*, *Low Laboratories*, Helsinki, Finlandia).

- **Puesta a punto del ensayo de unión de lectinas a SPE.**

Para el análisis de reactividad de lectinas con motivos de reconocimiento conocido, se utilizaron las siguientes lectinas biotiniladas: WGA (aglutinina de *Wheat germ* o *Triticum vulgaris*), Con A (Concanavalin A, proteína que une carbohidratos de *Canavalia ensiformis*), GNA (Snowdrop lectin, proteína que une motivos de manosa de *Galanthus nivalis*), LCH (Lentil lectin, aglutinina de *Lens culinaris*) y ECL (aglutinina de *Erythrina*

cristagalli); todas son productos de *GALAB Technologies GmbH, Max-Planck-Strasse 1, Alemania*.

Primero, se sensibilizó una placa de microtitulación de 96 pocillos (Nunc) con 10 µg/ml de SPE, incubando durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Después de lavar, la placa fue bloqueada con PBS-Tween (0,5%) (200 µL/pocillo), incubando 2 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente. Luego de realizar 3 lavados con PBS-T (0.05%), se dispensaron 100 µL por pocillo de diluciones seriadas al medio de cada lectina diluidas en PBS a partir de una concentración de 10 µg/mL, incubando durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Después, de lavar 4 veces con PBS-Tween (0,05%) se dispensaron 100 µL por pocillo de una dilución apropiada de extravidina conjugada a peroxidasa (*ExtrAvidin-Peroxidase, Sigma®*) diluida en PBS- Tween (0,05%), incubando durante una hora y media a 37°C en cámara húmeda. Luego, se lavó 7 veces con 200 µL por pocillo de PBS-Tween y una vez con 200 µL por pocillo de PBS. Se dispensaron 100 µL por pocillo de solución de H₂O₂ como sustrato y ortofenilendiamina (OPD) como cromógeno, y se incubó durante 15 minutos. La reacción se detuvo con 50 µL por pocillo de H₂SO₄ 3M. Por último, se midió la absorbancia a 492 nm en un lector para microplacas (*Titertek Multiscan Plus, Low Laboratories, Helsinki, Finlandia*).

Teniendo en cuenta los altos valores de absorbancia a 492 nm obtenidos, se repitió el ensayo descrito anteriormente, pero utilizando diluciones

seriadas al décimo de cada lectina biotinilada, comenzando por una dilución cuya concentración fue de 20 µg/mL.

- **Ensayo de unión de lectinas a SPE y E4+.**

Una vez puesto a punto el ensayo de unión a lectinas utilizando SPE, se procedió a analizar el ensayo de unión de las lectinas a componentes de E4+, utilizando SPE como control. Así, se sensibilizaron placas de microtitulación de 96 pocillos (*Nunc*), con 10 µg/mL de SPE y de E4+ en PBS. El procedimiento fue el mismo que el anteriormente descrito, pero partiendo de una concentración de lectinas biotiniladas de 200 ng/mL.

- **Puesta a punto del ensayo de inhibición por sacáridos específicos de la unión de lectinas a antígenos de protoscoleces.**

Para evaluar la interacción específica de las lectinas a los antígenos del parásito, se estandarizó la inhibición de unión utilizando sacáridos específicamente reconocidos por cada lectina. Los sacáridos empleados fueron: α- methylmannoside (MM) para inhibir la unión de las lectinas Con A y LCH, y N- Acetylglucosamine (GlcNAc) en el caso de la lectina WGA; ambos de Vector Laboratorios Inc. (Burlingame CA 94010). En todos los casos se utilizó una concentración de sacáridos de 200 mM en PBS. La concentración utilizada para cada lectina fue de 100 ng/mL en PBS para WGA, y de 50 ng/ml en PBS para ConA y LCH.

Se sensibilizó una placa *Nunc* de microtitulación de 96 pocillos, con 10 µg/mL de proteínas de SPE en PBS, incubando toda la noche a 4°C en cámara húmeda. A su vez, 100 ng/mL de WGA o 50 ng/mL de las lectinas Con A y LCH se incubaron con los sacáridos específicos durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Luego de lavar con 200 µL/pocillo de PBS-Tween (0,05%), se bloqueó con 200 µL/pocillo de PBS-Tween (0,5%) y se incubó por 2 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente. Después de lavar 4 veces con PBS-Tween (0,05%), se agregaron 100 µL/pocillo de las mezclas de cada lectina pre-incubadas con el correspondiente sacárido (WGA con GluNAc; Con A y LCH con α -methylmannoside), y se incubó a 4°C durante toda la noche en cámara húmeda. Luego de lavar 4 veces con PBS-Tween, se agregaron 100 µL/pocillo de una dilución apropiada de extravidina conjugada a peroxidasa (*ExtrAvidin-Peroxidase*, *Sigma*®) diluida en PBS-Tween (0,05%), incubando durante una hora y media a 37°C en cámara húmeda. Después de lavar 7 veces con PBS-Tween y una vez con PBS, se dispensaron 100 µL/pocillo de una solución de H₂O₂ como sustrato y ortofenilendiamina (OPD) como cromógeno, y se incubó durante 15 minutos en oscuridad. La reacción se detuvo con 50 µL por pocillo de H₂SO₄ 3M. Por último, se midió la absorbancia a 492 nm en un lector para microplacas (*Titertek Multiscan Plus*, *Low Laboratories*, Helsinki, Finlandia).

- **Ensayo de inhibición por sacáridos específicos de la unión de lectinas a antígenos de la fracción E4+.**

Una vez estandarizado este ensayo, se procedió a realizar el mismo ensayo con la fracción E4+. Las placas de microtitulación fueron sensibilizadas con 30 µg/mL de proteínas de la fracción E4+, utilizando SPE como control.

- **Análisis por Western Blot de la inhibición específica de la unión de Con A a componentes de la fracción E4+.**

Se realizó un gel de poliacrilamida al 12% y se sembraron 4 carriles con 71 µg de proteínas/carril. La corrida electroforética (SDS-PAGE) se estableció a 25 mA durante aproximadamente 40 min.

La transferencia de las proteínas se realizó a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF), y duró aprox. 1 hora a un valor de mA estimado ($0,8\text{mA}/\text{cm}^2$ de membrana). Una vez finalizada la transferencia, la membrana se bloqueó con PBS-Tween 0,5% durante toda la noche a 4°C.

La membrana se dividió en 3 tiras de tamaño similar, y cada una se incubó con reactivos diferentes diluídos en PBS-Tween 0,05%, durante toda la noche a 4°C.

- 1) 5 mL de una solución de ConA (5 µg/mL).
- 2) 5 mL de una solución de ConA (5 µg/mL) incubada previamente con el inhibidor (α -methylmannoside) (0,2 M).

3) 5 mL de PBS-Tween 0,05%.

Luego se realizó la incubación con el conjugado de extravidina conjugada a peroxidasa (*ExtrAvidin-Peroxidase*, Sigma®), durante 2 hs a 37°C con agitación. Por último, se reveló mediante quimioluminiscencia con el kit *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate*, de Thermo®, siguiendo las instrucciones del fabricante.

- **Segundo método de purificación del anticuerpo monoclonal E492/G1.**

Luego de realizar el protocolo descrito en el ítem “Purificación del anticuerpo monoclonal E492/G1”, se obtuvieron exclusivamente los anticuerpos IgG presentes en la ascitis original mediante cromatografía de afinidad utilizando Proteína G.

Luego de lavar la columna de proteína G dos veces con PBS, se sembraron 10 mL de ascitis deslipidificada y se incubó durante 20 min. a temperatura ambiente. Antes de eluir la fracción retenida, la columna fue lavada con PBS hasta alcanzar una absorbancia a 280 nm < 0,1. Como eluyente se utilizaron 10 mL de ácido cítrico pH 2,8, incubando durante 20 minutos, y posteriormente se recolectó 1 mL del eluato sobre 20 µL de Buffer Tris 2 M pH 11. El procedimiento se repitió una vez más. El eluato (anticuerpos IgG de ratón) se dializó contra buffer carbonato (NaHCO₃ 0,1M + NaCl 0,5M) por 24 horas, con cambios cada 3 horas.

Las muestras se mantuvieron a 4°C. La concentración proteica se obtuvo por determinación de Abs a 280 nm utilizando el equipo *NanoDrop* (*Thermo Scientific®*), dando un resultado de 560 µg/mL.

Control del reconocimiento específico de antígenos somáticos de protoscoleces por Ac IgG purificados por proteína G.

Primero, se sensibilizó una placa de microtitulación de 96 pocillos (*Greiner*) con 10 µg/mL de SPE, incubando durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Después de lavar, la placa fue bloqueada con PBS-BSA 1% (200 µL/pocillo), incubando 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente. Luego de realizar 3 lavados con PBS-Tween (0.05%)-BSA (1%), se dispensaron 100 µL por pocillo de la muestra de anticuerpos purificados por la columna de proteína G (previamente dializado contra buffer carbonato), incubando durante 1 hora en cámara húmeda a 37°C. Después de lavar 4 veces con PBS-Tween (0,05%)-BSA (1%), se dispensaron 100 µL por pocillo de una dilución 1/4000 de anti-IgG de ratón unido a peroxidasa diluida en PBS-BSA (1%), incubando durante una hora y media a 37°C en cámara húmeda. Luego, se lavó 3 veces con 200 µL por pocillo de PBS-Tween y una vez con 200 µL por pocillo de PBS. Se dispensaron 100 µL por pocillo de solución de H₂O₂ como sustrato y ortofenilendiamina (OPD) como cromógeno, y se incubó durante 15 minutos. La reacción se detuvo con 50 µL por pocillo de H₂SO₄

3M. Por último, se midió la absorbancia a 492 nm en un lector para microplacas (*Titertek Multiscan Plus, Low Laboratories, Helsinki, Finlandia*).

Preparación de la segunda columna de cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos del isotipo IgG (aproximadamente 80 mg de proteínas totales), obtenidos como eluato de la cromatografía de afinidad utilizando Proteína G, se acoplaron covalentemente a una matriz de *Sepharose 4B* activada con BrCN (*Sigma®*), siguiendo las instrucciones del fabricante. El protocolo utilizado fue el mismo que se describió en el ítem “Preparación de la columna de cromatografía de afinidad.”

Purificación de un segundo lote de fracción E4+.

El procedimiento utilizado fue el mismo que el descrito en el ítem “Purificación de la fracción E4+.”

Puesta a punto del ensayo de electroforesis bidimensional.

- **Evaluación del tratamiento adecuado para la muestra.**

En un primer acercamiento con la técnica, se buscó una forma de obtener la muestra precipitada, de forma de luego resuspenderla con los buffers

necesarios para su posterior incubación con el gel de isoelectroenfoco (tira IPG). Esto es debido al método de siembra mediante rehidratación (*rehydration loading, Handbook 2D*), seleccionado por ser el más adecuado en principio, para corridas preparativas con los tipos de tiras a utilizar. Para ello, se testeó el set de *2-D Clean-Up Kit* de *General Electric*®. Éste es un método de tratamiento previo para la muestra, cuyo fin es precipitar las proteínas y a su vez, eliminar contaminación e interferentes para luego realizar el ensayo.

Como método alternativo de precipitación de la muestra, se optó por dializarla contra agua destilada (para eliminar sales) durante 24 horas, cambiando el agua cada 12 horas, y luego liofilizarla en equipo *Christ*, modelo *Alpha 1-4 LD Plus* durante 24 horas.

Tratamiento de la muestra con el set *2-D Clean-Up Kit*, de *General Electric*®.

El *2-D Clean-Up kit* tiene como objetivo preparar muestras para electroforesis bidimensional (E-2D), precipitando las proteínas y dejando otros compuestos como detergentes, sales, ácidos nucleicos, lípidos y fenoles en solución. De esta forma, los spots pueden apreciarse en mejor resolución una vez finalizado el ensayo.

Para este ensayo, se utilizaron dos muestras de SPE de 15 µg en proteínas, una se analizó sin tratar, y la otra se trató con el *2-D Clean-Up Kit* siguiendo las instrucciones del fabricante.

Seguido a esto, ambas muestras se resolvieron por electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras, para la cual se preparó un gel de poliacrilamida al 12%, de 8x8 cm² de tamaño. Se corrió durante aproximadamente 40 min. a 25 mA. Al finalizar la corrida, el gel se tiñó con azul de Coomassie.

- **Evaluación del correcto funcionamiento de la E-2D.**

Estandarización usando como muestra BSA.

En este ensayo se utilizaron dos tiras IPG de pH 3-11 No Lineales (NL), de 7 cm. Como muestra para cada tira, se emplearon 200 µg (Matías Machado, tesina de licenciatura, 2007) de BSA, la cual se resuspendió en un volumen V de buffer de rehidratación y un 0,5%V de buffer IPG específico para geles pH 3-11 NL, más 4%V de DTT (70 mg/mL). La tira IPG se rehidrató con la muestra, cubriéndola con aceite mineral para evitar su desecación, y se incubó toda la noche a temperatura ambiente. Una vez rehidratado el gel con la muestra, se colocó en el equipo *Ettan IPGphor 3 IEF System (General Electric®)*, utilizando el protocolo estándar para geles de 7 centímetros, de 5.750 Vh totales. Consta de 4 etapas: 300 V (40 min), gradiente hasta 1000 V (30 min), gradiente hasta 5000 V (1 h 20 min), 5000 V (15 min); su duración total es de 2 horas 45 min aprox.

Al finalizar, una de las tiras IPG se tiñó con azul de Coomassie, mientras que con la otra se realizó la segunda dimensión siguiendo el protocolo descrito a continuación.

La segunda dimensión se resolvió mediante electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras, sin gel de staking (tamaño del gel de 8x8 cm²).

La tira IPG se equilibró incubando primero con 5 mL de buffer de equilibrio [Tris (75mM) pH 8,8; urea (6M); glicerol (30% v/v); SDS (2% w/v); azul de bromofenol (0,002% v/v)], más 50 mg de DTT, durante 15 minutos. Luego, se incubó 15 minutos más con 5 mL de buffer de equilibrio más 125 mg de iodoacetamida. Se colocó la tira IPG sobre un gel de poliacrilamida al 12% sellando la unión de ambos con agarosa, y se siguió el mismo procedimiento que el marcado en el ítem “Evaluación del set *2-D Clean-Up Kit*, de *General Electric*®”. Una vez finalizada la segunda dimensión, el gel fue teñido con azul de Coomasie.

- **Evaluación del protocolo a utilizar en el isoelectroenfoque y el método de teñido del gel resultante.**

Estandarización usando como muestra un mix de proteínas.

En este ensayo, se utilizó el kit de proteínas *Isoelectric Focusing Calibration Kit*, ya que es una muestra exclusivamente compuesta por proteínas y sería posible lograr una buena separación por puntos

isoeléctricos, dando spots definidos. Este kit está compuesto por las siguientes proteínas: amiloglucosidasa (pH 3,50), rojo de metilo (pH 3,75), inhibidor de tripsina de haba de soja (pH 4,55), β -lactoglobulina A (pH 5,20), anhidrasa carbónica B bovina (pH 5,85), anhidrasa carbónica B humana (pH 6,55), mioglobina ácida de caballo (pH 6,85), mioglobina básica de caballo (pH 7,35), lentil lectina ácida (pH 8,15), lentil lectina media (pH 8,45), lentil lectina básica (pH 8,65) y tripsinógeno (pH 9,30). Se debe tener en cuenta que los pH mencionados como puntos isoeléctricos de cada proteína, se cumplen si la misma está en estado nativo. Por lo tanto, puede que no sean exactamente los mismos valores de pH en las condiciones reductoras de este ensayo.

Se utilizaron dos tiras IPG, una de rango de pH de 6-11, y la otra de rango de pH 4-7, ambos No Lineales de 7 centímetros. La cantidad de proteínas a utilizar fue de 325 μ g (dado que es una muestra con más variedad de proteínas) en cada gel, la cual se resuspendió en un volumen V de buffer de rehidratación y un 0,5%V de buffer IPG específico para geles 4-7 NL ó 6-11 NL (según corresponda), más 4%V de DTT (70 mg/mL).

El protocolo de corrida utilizado para la primer dimensión (isoelectroenfoque, IEF) fue uno diferente, testeado en un trabajo anterior utilizando SPE como muestra (Matías Machado, tesina de licenciatura, 2007), con una duración de 9 hs 30 min, y un total de 37.500 Vh, al cual se llegó en 4 etapas: 500 V (30 min), gradiente hasta 1000 V (1 hora), gradiente hasta 2000 V (1 hora) y 5000 V (7 horas).

La segunda dimensión se realizó siguiendo el mismo procedimiento que el descrito en el ítem anterior (“Estandarización usando como muestra BSA”).

Una vez finalizada la segunda dimensión, cada gel fue teñido con el método de nitrato de plata recomendado por Madelón Portela, asistente técnico de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Instituto Pasteur de Montevideo (comunicación personal), siguiendo el protocolo detallado a continuación.

Se mantuvo el gel durante 1 hora en solución de fijación (ácido acético 12%, etanol 50%, formalina 0,05% en agua mQ), con agitación a temperatura ambiente. Se lavó el gel con solución de lavado (etanol 50%, agua mQ 50%) durante 5 min., dos veces y con agitación a temperatura ambiente. Luego, se realizaron dos lavados más durante 1 min. únicamente con agua mQ, en las mismas condiciones. Se incubó con solución de sensibilización (tiosulfato de sodio 0,02% en agua mQ) por no más de 30 segundos. Se repitió el lavado con agua mQ durante 1 min dos veces, y se incubó con la solución de teñido (nitrato de plata 0,2%, formalina 0,075% en agua mQ), durante 20 min en oscuridad y agitación a temperatura ambiente. Se lavó nuevamente con agua mQ durante 1 min., dos veces, y luego se incorporó la solución de revelado (carbonato de sodio 3%, tiosulfato de sodio 0,02%, formalina 0,05% en agua mQ) y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente hasta visualizar los spots. Finalmente, la reacción de revelado se detuvo con solución de

terminación (ácido acético 5% en agua mQ), y los geles fueron conservados en solución de conservación (ácido acético 1% en agua mQ).

Electroforesis bidimensional con SPE e immunoblotting.

En este ensayo, se utilizaron dos geles de pH 3-10 Lineales de 7 cm. Para cada gel se utilizó como muestra, 200 µg de proteínas de SPE previamente dializado contra agua y liofilizado, como se indica en el ítem “Evaluación del tratamiento adecuado para la muestra”. Luego, el SPE se resuspendió en un volumen adecuado de buffer de rehidratación, como se indica en el ítem “Estandarización usando como muestra un mix de proteínas” y siguiendo el protocolo de E-2D que allí se detalla, con la salvedad que el buffer IPG utilizado fue el específico para las tiras de 7 cm pH 3-10 Lineales. Además, para la segunda dimensión, se utilizó un marcador de peso molecular compuesto por: fosforilasa b murina (97 kDa), albúmina bovina (66 kDa), ovoalbúmina de clara de huevo de pollo (45 kDa), anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (30 kDa), inhibidor de tripsina de haba de soja (20,1 kDa) y α -lactalbúmina de leche bovina (14,4 kDa).

Al finalizar la segunda dimensión, uno de los geles se tiñó siguiendo el protocolo detallado en el ítem “Estandarización usando como muestra un mix de proteínas”, mientras que el otro fue electrotransferido de forma semiseca a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF), durante

aprox. 1 hora a 53 mA ($0,8\text{mA}/\text{cm}^2$ de membrana). Una vez finalizada la transferencia, la membrana se bloqueó con PBS-BSA 1% durante toda la noche a 4°C.

Luego de lavar la membrana una vez con PBS-Tween 0,05% durante 5 min con agitación y a temperatura ambiente, se incubó con 4 mL de AcMo E492/G1 a una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, diluído en PBS-BSA 1%-Tween 0,05%, con agitación, durante 1 hora y media a 37°C. Posteriormente, se descartó el sobrenadante para lavar con PBS-Tween 0,05% durante 3 min., 10 veces, con agitación y a temperatura ambiente. Luego, se incubó con agitación durante 1 hora y media a 37°C, con 4 mL de anticuerpo anti-IgG3 de ratón unido a peroxidasa (dilución 1/3000). Se volvió a lavar 10 veces con PBS-Tween 0,05% durante 3 min, el último lavado se realizó con PBS, todos con agitación y a temperatura ambiente. El Western Blot fue revelado mediante quimioluminiscencia con el kit *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo®), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Electroforesis bidimensional con fracción E4+ e immunoblotting.

En este ensayo se prosiguió de igual manera que en el ítem anterior (“Electroforesis bidimensional con SPE e *immunoblotting*”), con la salvedad que se utilizó 200 μg de proteínas de fracción E4+.

Análisis de secuencia por mapeo peptídico.

Los spots del gel de electroforesis bidimensional realizado con fracción E4+, que coincidieron con los presentes en el *immunoblotting* realizado con la misma muestra, se cortaron para luego ser enviados a la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas, Instituto Pasteur, Montevideo, para su identificación por espectrometría de masa (MS y MS/MS) por el asistente técnico Madelón Portela. El análisis fue realizado en un MALDI-TOF-TOF, y la plataforma utilizada fue *Mascot*, sirviéndose de la base de datos NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Además, se utilizó una segunda base de datos exclusiva de *E. granulosus* y *E. multilocularis*, proveniente de Gene DB (proporcionada por Ana Ferreira, comunicación personal).

RESULTADOS

La primer parte de este trabajo se centró en la purificación y caracterización de la fracción E4+ obtenida a partir de sonificado de protoscoleces (SPE). Esta purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad, utilizando el anticuerpo monoclonal E492/G1 acoplado a *Sepharose* 4B CNBr. El eluato fue dializado, liofilizado y resuspendido en un mínimo volumen de PBS. Posteriormente, se realizaron varios controles de calidad de la fracción E4+ obtenida. Estos ensayos se describen a continuación.

Características de la fracción E4+.

La fracción E4+ tiene una relación carbohidratos/proteínas mayor que el SPE.

Se determinó el contenido proteico de la fracción E4+ y del SPE, con el kit QuantiPro BCA Assay (Sigma), utilizando BSA como estándar. Los resultados obtenidos de la curva estándar se muestran en la Figura 7.

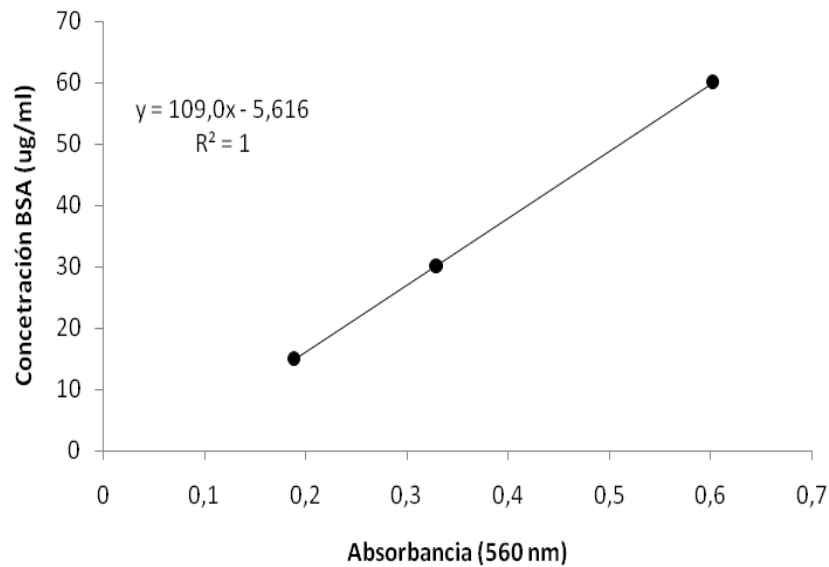


Figura 7. Curva de calibración utilizando BSA como estándar. Los círculos llenos representan los valores experimentales de absorbancia a 560 nm, para los valores de concentración del estándar.

Para determinar el contenido en proteínas, los datos (Absorbancia 560nm) correspondientes a cada muestra, fueron convertidos a unidades de concentración (µg/ml) equivalentes al estándar. El contenido proteico de la fracción E4+ fue de 190 µg/mL, mientras que el correspondiente a SPE fue de 820 µg/mL.

El contenido glucídico de la fracción E4+ y del SPE, se determinó por medio del método del resorcinol-sulfúrico de acuerdo a White & Kennedy (1986), utilizando como estándar Dextrano T-2000. En la Figura 8 se muestran los resultados obtenidos en la curva de calibración.

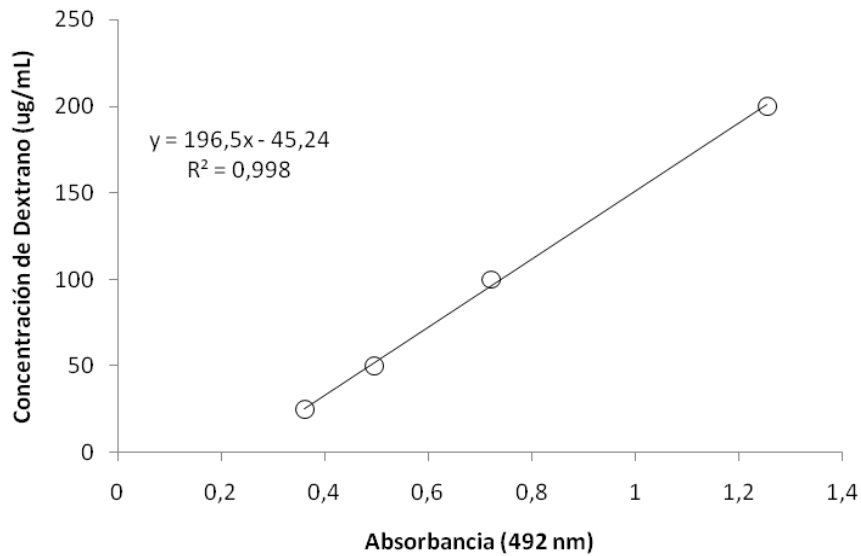


Figura 8. Curva de calibración utilizando Dextrano T-2000 como estándar. Los círculos vacíos representan los valores experimentales de absorbancia a 492 nm, para los valores de concentración del estándar.

El contenido glucídico de la fracción E4+ fue de 469 µg/mL y el correspondiente para el SPE fue de 1100 µg/mL.

En su conjunto, los resultados obtenidos, resumidos en la Tabla 1, indican que la fracción E4+ contiene una relación de carbohidratos/proteínas dos veces mayor que el SPE de partida.

	Concentración Proteica (µg/ml)	Concentración Glucídica (µg/ml)	Relación CH:P
SPE	820	1100	1.3
E4+	190	470	2.5

Tabla 1. Resultados de concentración proteica y glucídica obtenidos para fracción E4+ y SPE. Comparación de la relación concentración de carbohidratos/proteínas en la fracción E4+ y SPE.

Intensidad del reconocimiento de antígenos de SPE por diferentes lotes del AcMo E492/G1.

Teniendo en cuenta que en posteriores ensayos sería necesario utilizar el AcMo E492/G1 acoplado a biotina, y que se contaba con diferentes lotes del mismo preparado años atrás en la Cátedra, se decidió primero controlar la intensidad de reconocimiento de antígenos de SPE en diferentes lotes (n=6) de este reactivo.

Cada uno de los lotes fue identificado con los siguientes números: 111996; 121996; 131996; 112002; 122002; 132002.

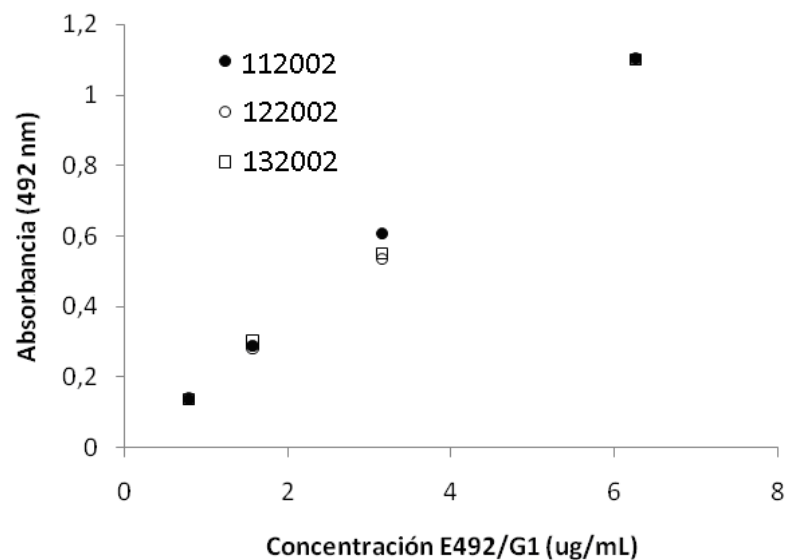


Figura 9. Intensidad de reconocimiento de antígenos de SPE obtenido para los lotes de E492/G1 acoplado a biotina: 112002, 122002 y 132002. Círculos llenos representan valores experimentales para el lote 112002, círculos vacíos para el lote 122002, y cuadrados vacíos para el lote 132002.

Los lotes 111996, 121996 y 131996 en el mismo rango de concentración, presentaron valores de absorbancia > 2 (datos no mostrados).

Los resultados mostrados en la Figura 9, indican que la intensidad de reconocimiento entre los lotes 112002, 122002 y 132002 es similar. Por lo tanto, se decidió seleccionar arbitrariamente el lote 112002, para los ensayos posteriores.

- **El AcMo del epítotope E492/G1 reconoce el motivo Gala(1,4)Galb (1,4)GlcNAc con mayor intensidad en la fracción E4+ que en SPE.**

Este control es el utilizado corrientemente en el laboratorio, como una aproximación para confirmar si la fracción E4+ está enriquecida en el epítotope reconocido por el AcMo E492/G1.

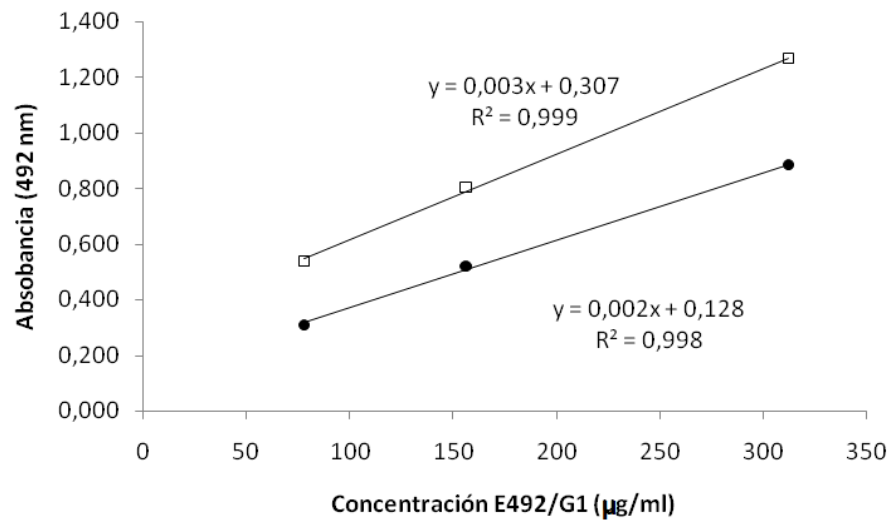


Figura 10. Reconocimiento del anticuerpo monoclonal E492/G1 a componentes de la fracción E4+ (cuadrados vacíos) y del SPE (círculos llenos).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 10 e indican que a igual concentración proteica utilizada para sensibilizar la placa de ELISA, el reconocimiento por el AcMo es de mayor intensidad contra antígenos de la fracción E4+, comparado con aquel observado para el SPE.

Ensayos de unión a lectinas.

- **Puesta a punto del ensayo de unión de un set de lectinas a componentes del SPE.**

Las lectinas son proteínas que se unen a carbohidratos con una alta especificidad y resultados preliminares obtenidos por el Mag. Gustavo Mourglia (comunicación personal), han mostrado que algunas lectinas tienen la capacidad de unirse a antígenos de protoscolec de *E.*

granulosus. Teniendo en cuenta que esta metodología no estaba puesta a punto, se comenzó con la estandarización de la misma utilizando SPE. Para ello, se ensayaron diferentes concentraciones de lectinas acopladas a biotina (diluciones seriadas al medio partiendo de una concentración de 10 µg/mL), y una concentración de 10 µg/mL para sensibilizar las placas de ELISA, hasta ajustar las condiciones tales de tener un valor absorbancia cercano a 1. Los valores de concentración de SPE y de cada lectina, se utilizaron luego para realizar los ensayos de inhibición de la unión de cada lectina con los monosacáridos correspondientes.

- **WGA, Con A y LCH tienen la capacidad de unirse a componentes de la fracción E4+ y del SPE.**

Una vez estandarizado el ensayo, se determinó la capacidad de un set de lectinas (WGA, Con A, LCH, ELC y GNA) de unirse a componentes tanto de la fracción E4+, como del SPE.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 11, e indican que solo las lectinas WGA, Con A y LCH tienen mayor capacidad de unirse a componentes del SPE y/o E4+. Por el contrario, las otras dos lectinas no parecen presentar una fuerte capacidad de unión por ninguno de los antígenos de las dos muestras. Por esta razón, se seleccionaron las lectinas WGA, Con A y LCH, para los ensayos posteriores.

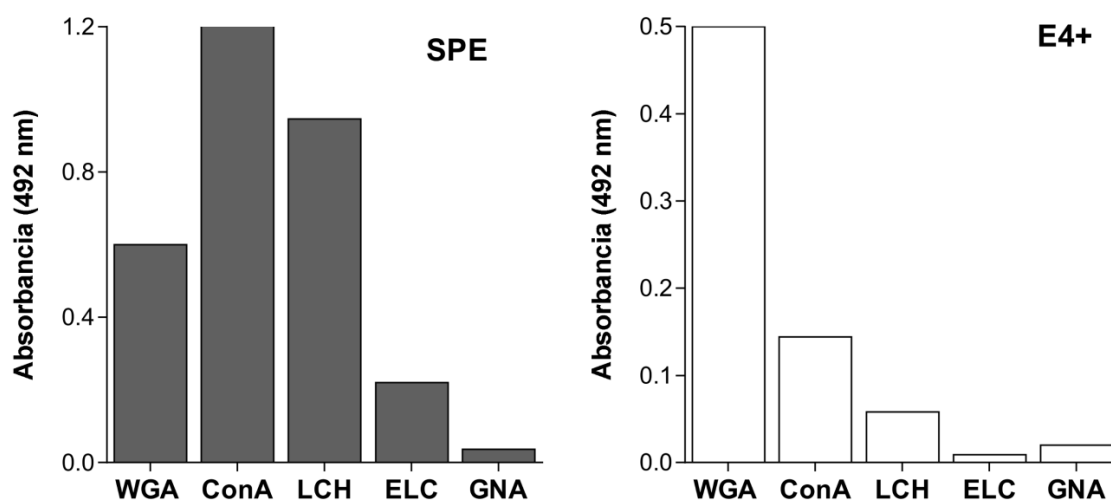


Figura 11. Capacidad de unión de las diferentes lectinas a componentes del SPE (gris oscuro) o de la fracción E4+ (blanco).

- **Sacáridos específicos inhiben la unión de las lectinas WGA y Con A a componentes de E4+ y del SPE.**

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, el segundo paso consistió en analizar si la unión de las lectinas WGA, Con A y LCH a antígenos de *E. granulosus* era inhibida por competencia con los sacáridos capaces de unirse a dichas lectinas. Los sacáridos utilizados fueron, N-Acetylglucosamine para WGA y Methyl- α -D-manopyranoside en el caso de las lectinas LCH y Con A.

Como puede observarse en la Figura 12, el porcentaje de inhibición de la unión de las lectinas WGA y Con A fue entre un 60-80 % tanto para E4+ como para el SPE. Por el contrario, la inhibición de la unión de la lectina

LCH si bien porcentualmente fue alta (aprox. 80%) en el caso de SPE, este no fue el caso para la fracción E4+, el cual dio un porcentaje de 0.

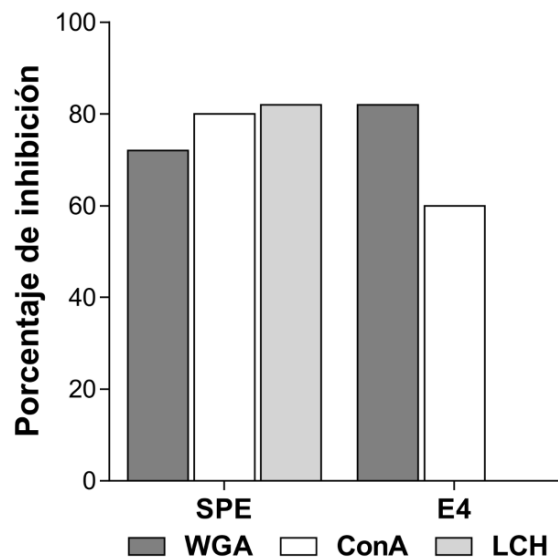


Figura 12. Porcentaje de inhibición por competencia de N-Acetylglucosamine o Methyl- α -D-manopyranoside con componentes de E4+ y SPE capaces de unir las lectinas WGA, Con A y LCH.

Partiendo de estos resultados y el hecho que Con A se une a residuos ricos en manosa, mientras que WGA se une a residuos que tienen GlcNac, y que el resultado de unión a Con A es el más interesante (dado que se ha visto que la conjugación de antígenos a residuos de manosa aumenta significativamente la unión e internalización de los mismos por células B, Al-Barwani *et al.*, 2014), se procedió a tratar de identificar por Western Blot, qué componentes de la fracción E4+ interaccionan con Con A.

- **Con A interacciona con varios componentes de la fracción E4+.**

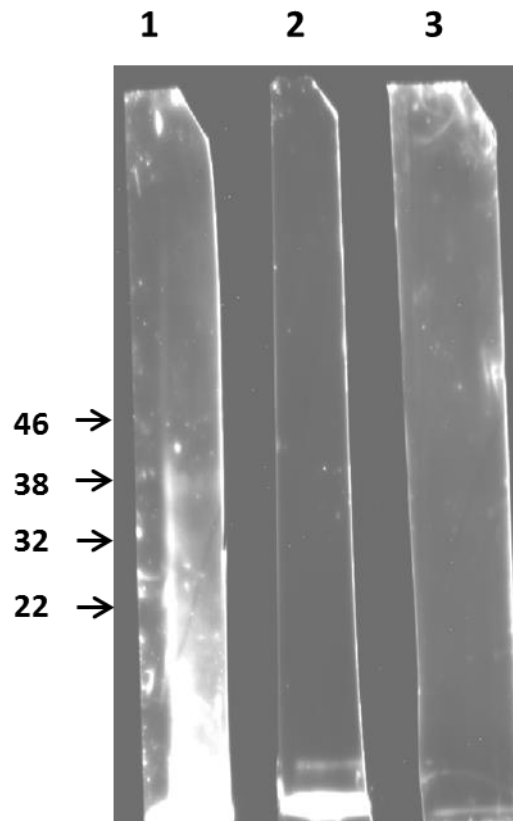


Figura 13. Inhibición por Methyl- α -D-manopyranoside de la unión de Con A a componentes la fracción E4+, analizado por Western Blot.

- (1) E4+ + Con A-Biotina + Extravidina-PO;
(2) E4+ + (Con A-Biotina + Methylmannoside) + Extravidina-PO;
(3) E4+ + Extravidina-PO.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 13, e indican que Con A es capaz de unirse a 4 componentes de la fracción E4+ con PM aparente de 46, 38, 32 y 22 kDa. Esto sugiere que esos componentes podrían eventualmente ser aislados del resto de los componentes de la

fracción E4+, por cromatografía de afinidad utilizando como soporte *Sepharose-CNBr* acoplada a Con A, pero con el inconveniente que la elución debe realizarse con cantidades importantes de Methyl- α -D-manopyranoside. Esto plantea tener una estrategia tal, que permita separar posteriormente el disacárido de los componentes eluidos.

Electroforesis bidimensional e *immunoblottings*.

Esta parte del trabajo, se enfocó en la identificación preliminar de los componentes proteicos de la fracción E4+. Con este fin, se realizaron electroforesis bidimensionales e *immunoblottings* tanto con SPE como con la fracción E4+.

- **Purificación del AcMo E492/G1 utilizando una nueva estrategia y obtención de un nuevo lote de la fracción E4+ (AcMo E492/G1₂₀₁₅).**

Previamente, se han realizado numerosos ensayos con tratamientos diferentes de la muestra de fracción E4+ (Lic. Marco Navatta, comunicación personal), con el objetivo de identificar proteínas del parásito presentes en esta fracción por mapeo peptídico [espectrometría de MS (m/z) y MS/MS (m/z)], y posterior búsqueda de homología utilizando las bases de datos disponibles tanto para *E. granulosus*, como para *E. multilocularis*. Las muestras que se enviaron a la Unidad de

Bioquímica y Proteómica Analíticas, Instituto Pasteur, Montevideo, fueron las derivadas de la resolución de los componentes de la fracción E4+ en función de su peso molecular aparente (SDS-PAGE). Los resultados obtenidos no permitieron obtener ninguna información relevante.

En este contexto, se decidió utilizar una nueva estrategia para la purificación del AcMo E492/G1 a partir de otro lote de ascitis disponible en la Cátedra, y a partir de éste obtener un nuevo lote de la fracción E4+.

Una vez obtenida la muestra de IgG (AcMo E492/G1₂₀₁₅) a partir de una nueva preparación de ascitis, se realizó un control de calidad de la misma por ELISA. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 14, e indican que a una concentración de 90 ng/mL de proteínas totales (ya que la muestra no solo contiene las IgG específicas sino también IgG no específicas), se obtiene un valor de absorbancia (Ab) de 0,75. Esto sugiere que esta subclase de IgG específicas, sería una fracción importante dentro de las IgG totales de la muestra.

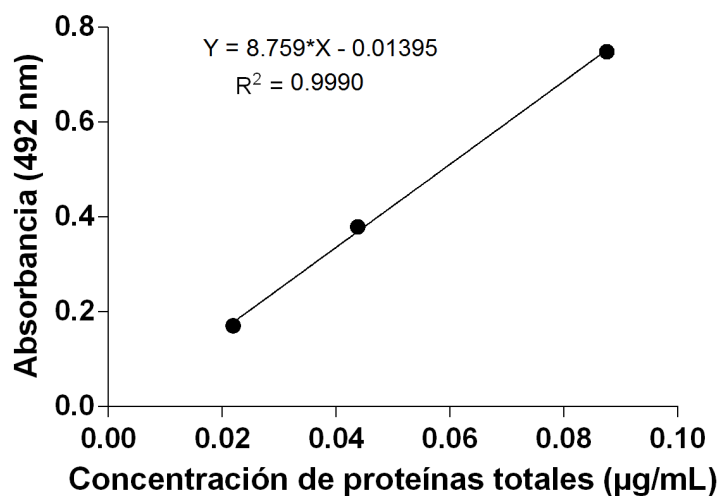


Figura 14. Perfil de unión de anticuerpos E492/G1₂₀₁₅ a componentes del SPE. Los círculos llenos representan los valores experimentales de absorbancia a 492 nm, a diferentes concentraciones de proteínas totales en la muestra.

Se partió de un nuevo lote de SPE (SPE₂₀₁₅) para purificar un nuevo lote de la fracción E4+ por cromatografía de afinidad, utilizando como matriz la nueva preparación del AcMo E492/G1 (AcMo E492/G1₂₀₁₅) acoplado a *Sepharose-BrCN*.

La relación carbohidratos/proteínas es mayor en la fracción E4+ que en el SPE de partida.

La concentración proteica obtenida por medida de la Ab 280nm en el equipo *NanoDrop*, fue de 11200 µg/mL para lote SPE₂₀₁₅, y de 2200 µg/mL para el lote E4+₂₀₁₅. La concentración de carbohidratos obtenida

fue de 4974 µg/mL para el lote de SPE₂₀₁₅, y de 5144 µg/mL para el lote de E4+₂₀₁₅.

Los resultados se muestran resumidos en la Tabla 2, e indican que la fracción E4+₂₀₁₅ contiene una relación de carbohidratos/proteínas 5 veces mayor que el SPE₂₀₁₅ de partida.

	Concentración Proteica (µg/ml)	Concentración Glucídica (µg/ml)	Relación CH:P
SPE	11200	4974	0,45
E4+	2200	5144	2,34

Tabla 2. Resultados de concentración proteica y glucídica obtenidos para la fracción E4+₂₀₁₅ y el SPE₂₀₁₅. Comparación de la relación concentración de carbohidratos/proteínas en la fracción E4+ y SPE.

Estandarización de la electroforesis bidimensional.

Como primer paso en la estandarización de la técnica, se evaluó la eficacia del set *2-D Clean-Up Kit* en el precipitado de la muestra. Éste método, mediante la precipitación proteica, acondiciona la muestra para el ensayo.

Luego, se puso a punto el funcionamiento general de la técnica, así como la cantidad de muestra a colocar en el gel de isoelectroenfoque (tira IPG). Como siguiente paso, se realizó un ensayo con tiras IPG de diferentes

rangos de pH, para evaluar qué tipo usar. Para finalizar, se testeó el protocolo a seguir en la primera dimensión (isoelectroenfoque) y el método de tñido de los geles resultantes.

- **Evaluación del tratamiento adecuado para la muestra.**

Evaluación del set 2-D Clean-Up Kit, de General Electric®.

Para evaluar la efectividad del set *2-D Clean-Up Kit* en el precipitado de la muestra, se realizó este ensayo con 15 µg en proteínas de SPE₂₀₁₅ como muestra.

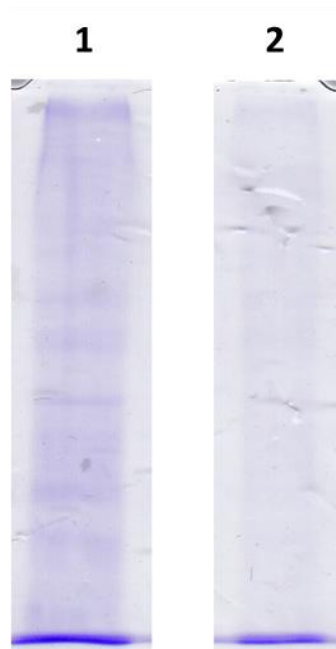


Figura 15. Gel SDS-PAGE con SPE₂₀₁₅, tñido con azul de Coomasie. Muestra sin tratar (1), y tratada con el set “2-D Clean-Up Kit (2).

En la Figura 15, puede verse que la cantidad de muestra en el carril 1 (muestra no tratada) es mayor que en el caso del carril 2. Teniendo en cuenta que se sembró la misma cantidad, y que al teñir con azul de Coomasie la relación intensidad de tinción y cantidad de proteína es directamente proporcional, puede decirse que hay pérdida de muestra con el tratamiento, por lo que se descartó su uso. Como tratamiento previo para las muestras en ensayos futuros, se optó por dializarlas contra agua destilada y liofilizarlas.

- **Evaluación del correcto funcionamiento de la E-2D y la cantidad de muestra a utilizar.**

Estandarización usando como muestra BSA.

Como primer acercamiento con la técnica, se corroboró el correcto funcionamiento del isoelectroenfoque (IEF), y de la segunda dimensión.

Como muestra en este ensayo, se utilizó BSA pues es muy simple, conformada por una sola proteína de características conocidas. Dado que las muestras, tanto de SPE como de fracción E4+, son muy complejas (están conformadas por varias glicoproteínas diferentes), debe utilizarse la cantidad de proteína necesaria para detectar la mayor cantidad posible de las glicoproteínas presentes. En este sentido, se recurrió a la tesina de licenciatura de Matías Machado del 2007, en la cual realiza una E-2D con 200 µg en proteínas de SPE.

Una vez finalizada la primera dimensión, una de las tiras fue teñida con azul de Coomasie, confirmándose el correcto enfoque de la muestra en su punto isoeléctrico (Figura 17). Con respecto a la otra tira, ésta se utilizó para realizar la segunda corrida electroforética. En esta última dimensión, no se logró definir un spot único (según el peso molecular de la proteína), sino que se observa una mancha vertical, la cual puede deberse a un exceso de muestra (Figura 17).

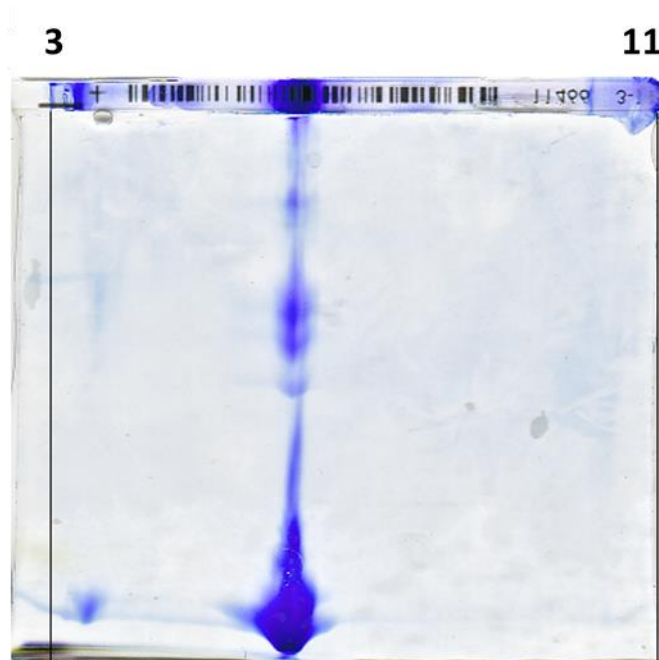


Figura 17. Gel SDS-PAGE de la E-2D con BSA, teñido con azul de Coomasie. Líneas negras marcan puntos isoeléctricos inicial y final.

- **Evaluación del protocolo a utilizar en la primer corrida electroforética y el método de teñido del gel resultante.**

Estandarización usando como muestra un mix de proteínas.

Este ensayo se realizó como forma de evaluar la utilización de tiras IPG con diferentes rangos de pH.

Dado que estos geles presentan rangos de pH menores al utilizado anteriormente (3-11), se debería poder apreciar mejor la separación de las proteínas por punto isoeléctrico.

Otros puntos testeados en este ensayo fueron el protocolo de la primer corrida electroforética a seguir, y el método de tinción a utilizar.

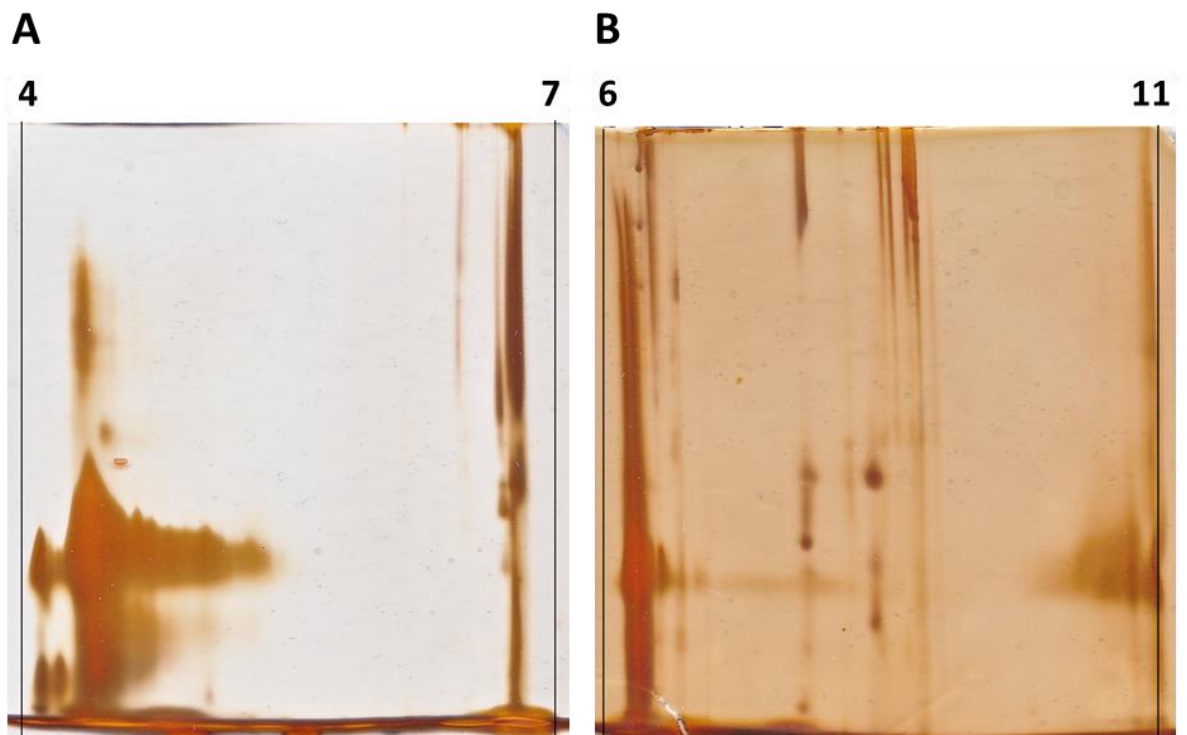


Figura 18. Geles SDS-PAGE de la E-2D con mix de proteínas, teñidos con método de nitrato de plata. Utilizando para la E-2D tira de rango de pH 4-7 (A), o tira de rango de pH 6-11 (B). Líneas negras marcan los puntos isoeléctricos final e inicial.

En la Figura 18 (A y B), puede verse los dos geles SDS-PAGE teñidos mediante nitrato de plata. En ambos pueden distinguirse spots con diferentes grados de resolución.

En el caso del gel B, se puede ver la presencia de algunos spots bastante definidos, así como una mancha del lado derecho, y unas líneas verticales principalmente del lado izquierdo y en el centro. Sin embargo, en el gel A, hay menos spots definidos, así como manchas (lado izquierdo), y líneas verticales (del lado derecho). Los spots mencionados en ambos casos, podrían corresponder a proteínas que se enfocaron de forma correcta en su punto isoeléctrico (buen funcionamiento del protocolo de isoelectroenfoque). Con respecto a las manchas, éstas pueden deberse a un exceso de muestra. Por estos motivos, se decidió volver a utilizar 200 µg de proteínas para las muestras, así como mantener el protocolo de isoelectroenfoque utilizado, factores que ya fueron testeados con SPE por Matías Machado (2007), en su tesina de licenciatura.

Como un factor común en ambos geles, se destaca el poco background presentado por el método de teñido. Dado que este protocolo es, además, apto para luego analizar las muestras por espectrometría de masa (Madelón Portela, Instituto Pasteur, Montevideo), se decidió mantenerlo para próximos ensayos.

- **Resolución de los componentes de la fracción E4+ por electroforesis bidimensional (PM y PI) e *Immunoblotting* utilizando el AcMo E492/G1.**

Una vez puesta a punto la electroforesis en dos dimensiones, los componentes del E4+ fueron separados en función de su punto isoeléctrico (PI) y peso molecular (PM) aparente.

Se decidió cambiar el tipo de tiras IPG a Lineales, dado que el uso de geles No Lineales acarrea consigo la tarea extra de tener que recurrir a una curva de calibración para la determinación de los puntos isoeléctricos de los diferentes spots.

En la Figura 19, se muestra para la fracción E4+ (lote 2015), el perfil de spots obtenido por electroforesis bidimensional (B) y su *immunoblotting* correspondiente (A).

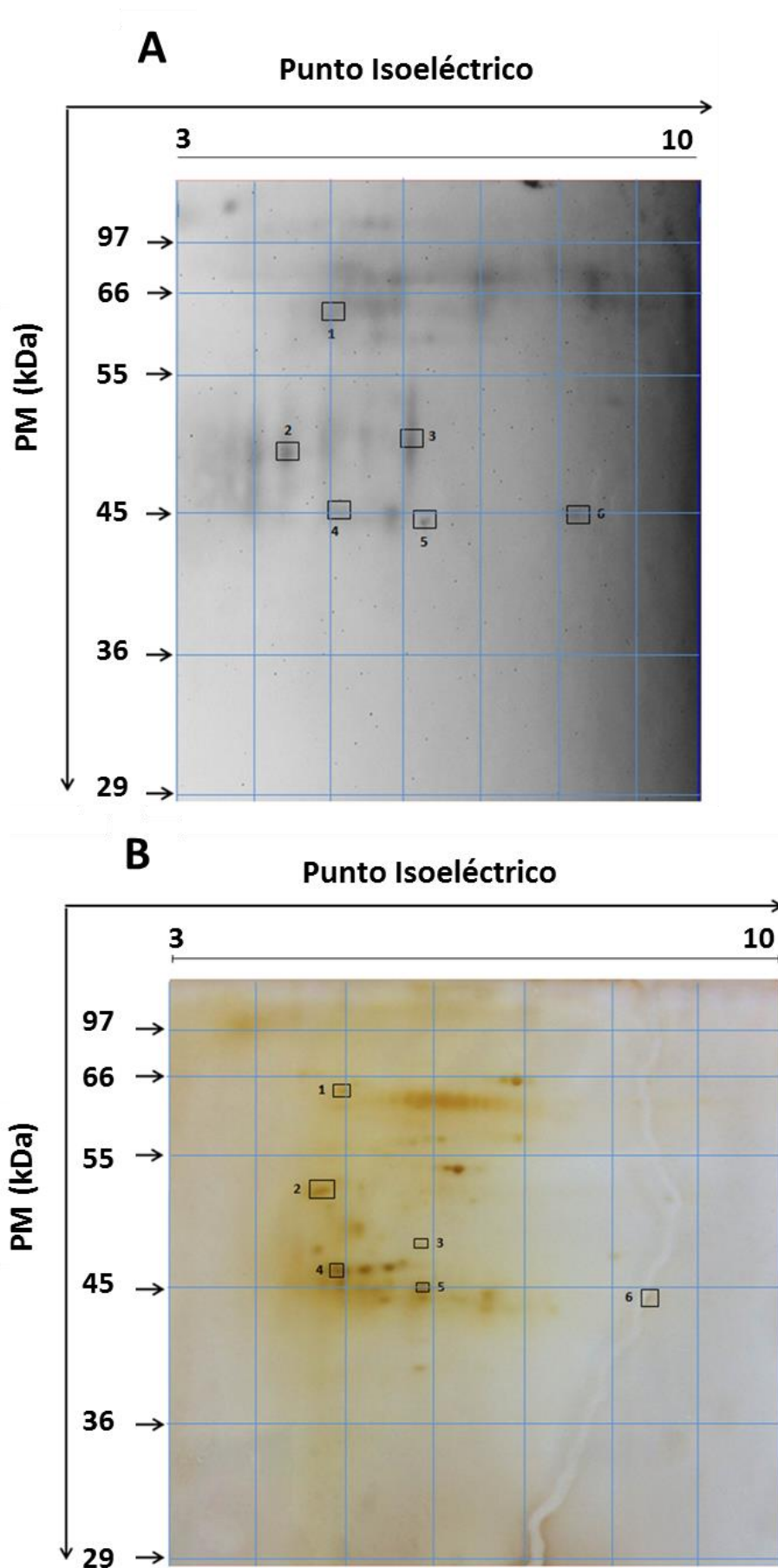


Figura 19. Immunoblotting utilizando el AcMo E492/G1₂₀₁₅ (A), y separación de los componentes de E4₊₂₀₁₅ por electroforesis bidimensional (B). Recuadros negros señalan los spots seleccionados para el análisis por espectrometría de masa (MS y MS/MS), los números junto a cada recuadro se corresponden con los de la Tabla 3.

En la Figura 19 (B), puede verse una buena separación de los componentes de la fracción E4₊, dado que se reconocen varios spots bien definidos. Además, éstos presentan cierta similitud con aquellos presentes en la membrana de PVDF luego de electrotransferir (Figura 19, A). En ese sentido, se seleccionaron seis spot (marcados con recuadro negro) que coinciden aproximadamente en PM y PI en el SDS-PAGE y el *immunoblotting*, para su análisis por MS/MS.

Los resultados se muestran en la Tabla 3, y de manera bien interesante indican la identificación de una proteína de *E. granulosus*, Anexina.

No.	Mapeo peptídico	PM	PI
1	“Queratina”	66	5,1
2	“Egr_000041200.1” “Annexin” <i>Echinococcus granulosus</i>	47	4,9
3	No identificada	41	6,0
4	No identificada	42	4,9
5	“β-casein” de <i>Bos</i>	34	6,0

	<i>taurus</i>		
6	No identificada	32	8,3

Tabla 3. Identificación proteica de los spots de fracción E4+₂₀₁₅ seleccionados.

Resultados obtenidos del análisis mediante espectrometría de masa (MS y MS/MS).

Color gris marca los valores para la proteína anexina.

- **Resolución de los componentes del SPE por electroforesis bidimensional (PM y PI) e *Immunoblotting* utilizando el AcMo E492/G1.**

De la misma forma que se procedió en la sección anterior, los componentes del SPE fueron resueltos en función de su PI y PM aparente.

En la Figura 20, se muestra para el SPE (lote 2015), el perfil de spots obtenido por electroforesis bidimensional (B) y su *immunoblotting* correspondiente (A).

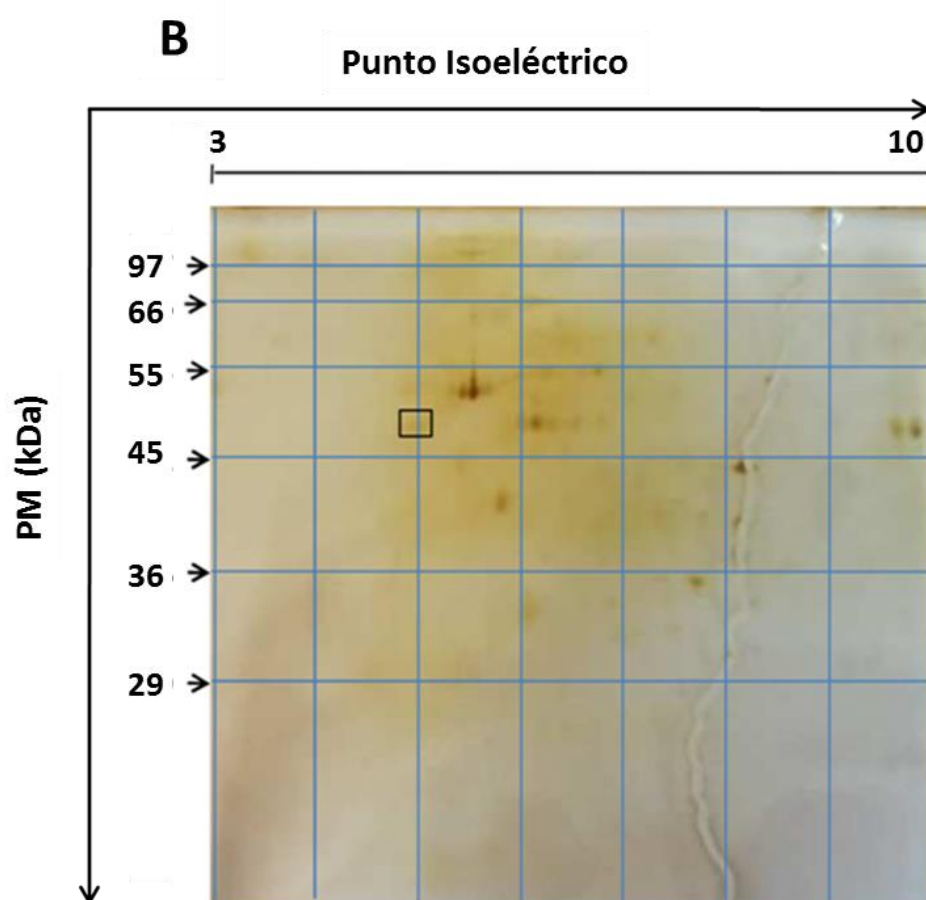
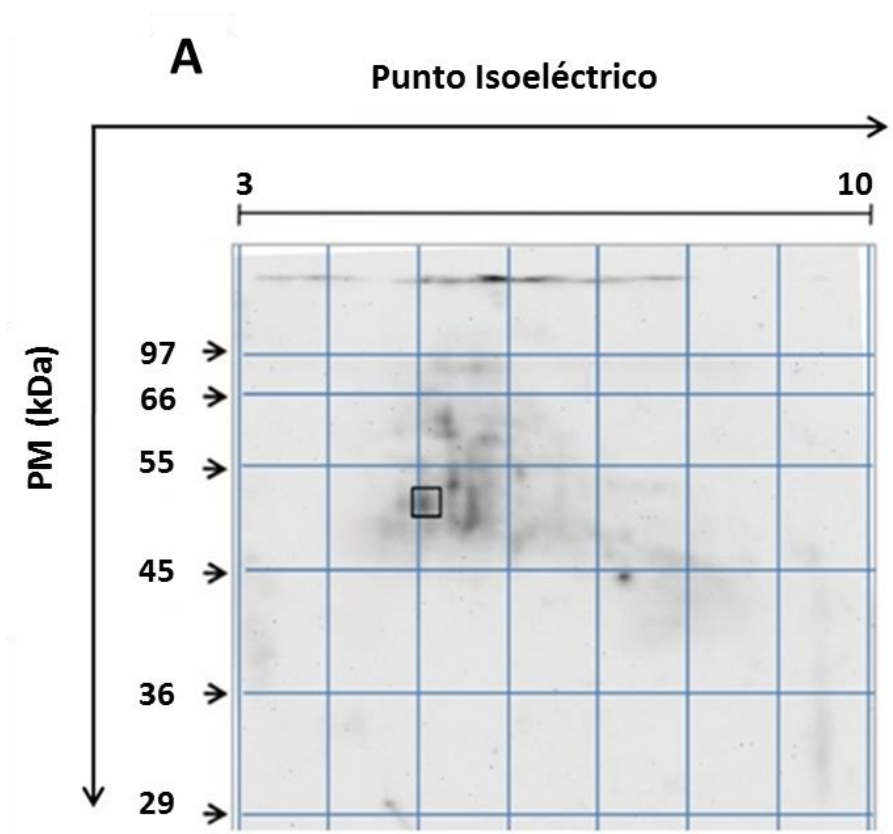


Figura 20. Immunoblotting utilizando el AcMo E492/G1₂₀₁₅ (A), y separación de los componentes del SPE₂₀₁₅ por electroforesis bidimensional (B). El recuadro negro señala un spot con similar PM y PI que la Anexina de *E. granulosus*

En la Figura 20 (B), puede verse (al igual que en el caso de la fracción E4+) una separación correcta de los componentes del SPE₂₀₁₅, dado que se reconocen varios spots bien definidos. Éstos, además, presentan similitud con aquellos presentes en la membrana de PVDF luego de electrotransferir (Figura 20, A).

El spot que coincide de forma más aproximada en PI y PM, con la Anexina encontrada en el gel SDS-PAGE realizado con fracción E4+, se marca con un recuadro negro en el gel SDS-PAGE e *immunoblotting* realizados con SPE (Figura 20, A y B).

DISCUSIÓN

El disponer de estructuras moleculares definidas con conocidos efectos inmunomoduladores, es realmente bien importante, ya que nos permitiría sentar las bases para desarrollar nuevas estrategias racionales de inmunointervención (Baz *et al.*, 2006).

Los glicoconjugados del protoescolex de *E. granulosus* (GPEG) muestran características bien interesantes. Resultados recientes han mostrado que una fracción de antígenos somáticos de protoscoleces de *E. granulosus* enriquecida en carbohidratos (denominada E4+) tendría un papel importante en la interrelación hospedero experimental-parásito (Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011a; Mourglia-Ettlin *et al.*, 2011b; Baz *et al.*, 2006).

Sin embargo, poco es lo que conocemos sobre las estructuras (proteicas o glucídicas) de los componentes de esta fracción. La información más relevante obtenida hasta el momento es la presencia del trisacárido del antígeno P1 en la fracción E4+. Resultados muy preliminares sugieren que E4+ contendría motivos glucídicos capaces de unirse a lectinas y que esto podría estar en consonancia con ciertas estructuras postuladas por Khoo *et al.*, 1997.

De confirmar estos resultados, podríamos disponer datos originales y bien importantes sobre las estructuras glucídicas presentes en antígenos de

protoscoleces de *E. granulosus* que podrían contribuir o podrían estar directamente asociados con el establecimiento de la infección.

En este contexto, el objetivo de este trabajo es identificar, por lo menos parcialmente, motivos glucídicos y estructuras proteicas presentes en los componentes de la fracción E4+.

La primera parte de este trabajo consistió en la estandarización de varios ensayos por ejemplo: determinación de unión de antígenos del parásito a un set de lectinas así como la inhibición de la unión utilizando sacáridos específicos, tanto por ELISA como por *immunoblotting*; resolución de componentes de SPE y E4+ por electroforesis bi-dimensional (PM y PI), y posterior inmuno-transferencia. Además, esta primer parte de trabajo implicó la preparación de los reactivos y preparaciones antigénicas, así como el control de calidad de los mismos, necesarios para la realización de este trabajo.

El primer conjunto de análisis consistió en determinar la potencial unión de un set de lectinas a componentes de la fracción E4+, así como aquellos de SPE.

Los componentes de SPE fueron capaces de interaccionar principalmente con las lectinas Con A, WGA, LCH y ELC (Figura 11). Sin embargo, los componentes de E4+ fueron capaces de interaccionar principalmente con las lectinas WGA y Con A (Figura 11). Estas interacciones mostraron ser específicas de acuerdo a los altos porcentajes de inhibición de dicha

unión utilizando sacáridos específicos para cada lectina (Figura 12). Teniendo en cuenta que la Con A se une principalmente a residuos manosa y que la WGA a motivos como GlcNAc, estos resultados en su conjunto son consistentes con el motivo glucídico propuesto por Khoo et al., (1997), representado en la Figura 21.

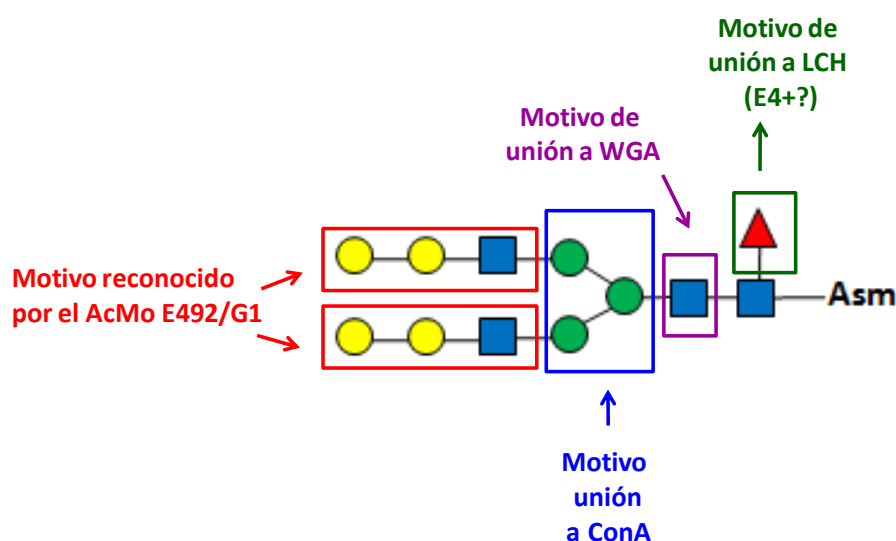


Figura 21. Esquema de una de las estructuras glucídicas presente en componentes de la fracción E4+.

Estos resultados son muy relevantes ya que esta es la primera estructura glucídica identificada como componente de la fracción E4+, lo cual permitirá el diseño de sacáridos como productos de síntesis y en consecuencia estudiar su papel en la interrelación hospedero experimental-*E. granulosus*.

Por otra parte, como se mencionó anteriormente, recientemente se ha sugerido que la conjugación de ciertos antígenos a manosa aumenta significativamente la unión e internalización del mismo a células B (Al-Barwani *et al.*, 2014). Dada la relevancia de este resultado, se decidió ahondar en el estudio del ligando de Con A, determinando por Western Blot la unión de dicha lectina a componentes de E4+ (Figura 13). Se identificaron cuatro bandas de PM aparente 46, 38, 32 y 22 kDa que tienen la capacidad de interaccionar específicamente con Con A. Este resultado por demás interesante, es la base para demostrar si alguno de estos componentes tiene la capacidad potencial de unirse a células B normales de ratón. Si esto es así, sería posible identificar esta(s) glicoproteína(s) por mapeo peptídico y posterior búsqueda de homología utilizando bases de datos disponibles tanto para *E. granulosus* como para *E. multilocularis*.

El segundo conjunto de experimentos tuvo como objetivo la identificación de componentes proteicos presentes en la fracción E4+. Previamente a este trabajo, Lic. Marco Navatta (comunicación personal), utilizando diferentes condiciones de tratamiento de este antígeno, diferentes tinciones, así como diferentes condiciones de corrida; había tratado de identificar por mapeo peptídico los componentes de E4+ resueltos por SDS-PAGE. Los resultados obtenidos fueron no solo inesperados, sino que también contradictorios. La fracción E4+ parecía contener

principalmente albúmina del hospedero experimental. Si esto fuera así, la fracción E4+, no debería ser inmunogénica cuando es administrada a ratones ya que es muy difícil romper el estado de tolerancia a componentes propios en ratones adultos y más aún en las condiciones de administración empleadas, es decir, baja concentración proteica diluida en PBS y sin el uso de adyuvantes.

Por esta razón, se decidió preparar nuevos lotes del AcMo para acoplar a *Sephrose-BrCN*, de forma de obtener posteriormente un nuevo lote de la fracción E4+ a partir de un nuevo lote de SPE.

La modificación más importante fue la de utilizar, para la preparación de la columna de afinidad, anticuerpos del isotipo IgG en lugar de utilizar la fracción gammaglobulina obtenida a partir de líquido ascítico producido en ratón.

El resultado de esta modificación fue obtener un nuevo lote de la fracción E4+ con una relación carbohidratos/proteínas 5 veces mayor que aquella observada en SPE de partida (Tabla 2). Además, de acuerdo a los resultados obtenidos de la resolución de los componentes de E4+ por SDS-PAGE, no se observó la banda con PM aparente similar al de la albumina (datos no mostrados).

Antes de la resolución de los componentes de este nuevo lote de E4+ por electroforesis en dos dimensiones, se demostró por citometría de flujo que la misma tuviera la capacidad de unirse a las células B (CD19+) (Lic. Marco Navatta, comunicación personal).

Una vez puesta a punto la electroforesis en dos dimensiones, los componentes de tanto la fracción E4+ como del SPE fueron resueltos en función de su punto isoeléctrico y PM aparente (Figura 19 y Figura 20). Paralelamente, se prepararon dos geles y ambos antígenos fueron resueltos por electroforesis 2D y posteriormente transferidos a membranas de PVDF, para identificar los spots reconocidos por el AcMo E492/G1. Los spots con similar PM y PI coincidentes en el *immuniblotting* y en la resolución 2D (Figura 20), fueron cortados y enviados a la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas-Instituto Pasteur Montevideo, para la identificación proteica mediante espectrometría de MS (m/z) y MS/MS (m/z).

Los resultados obtenidos de la espectrometría se muestran en la Tabla 3, y de manera bien interesante demuestran la presencia de la Anexina de *E. granulosus*, en la fracción E4+. Un spot con igual PM y PI fue identificado en antígenos somáticos de protoscoleces (Figura 20).

La secuencia de la Anexina de *E. granulosus* que coincide con la proteína del spot No. 2 es la siguiente:

MSIKVTNCGLPCNPTLRPYPNFNANSDEVLLKKAMDGMGTDEAMIIILGTRTS
QQRVEIAEAYKGSYGEDLREKLQGELSGDFGELVDLMFYTIPELKAQLCYDAIN
GAGTDELALIEVICTSTNSEIEELKKEYAKVCQNHGKAANENSLEKDVVGDTSGY
FKRILVALLAAQRHEPTEQQLKDIANRGIDSIIDKKAEEADAQKLYDAGEKRLGTD
EEAFITILCTRSPWQLIAISKAYEKISKRLRLVEAIASETKGDFRRALLTTLLANTNTP

MAFAEHFNDGLSGAGTNDQQLMRLIVWRSEVDMKEIKNCYLTRYNRDLVDDIK
DDTSGDYEKLLVRLLSQ.

Las anexinas son una gran familia de proteínas expresadas en todos los organismos eucariotas; se asocian con funciones que van desde el metabolismo del calcio, la adhesión y crecimiento celular, el transporte subcelular y la reparación de membranas (Gerke & Moss, 2002). Estructuralmente se caracterizan por presentar un dominio C-terminal conformado por 4 repetidos homólogos de aprox. 70 aminoácidos de longitud. Estos dominios homólogos presentan un sitio de unión a calcio y fosfolípidos de alta afinidad (Geisow *et al.*, 1986). El dominio N-terminal es variable y presenta sitios para modificaciones post-traduccionales e interacciones proteína-proteína (Gerke & Moss, 2002).

Recientemente, se ha reportado que las anexinas también están presentes en parásitos (He *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2007; Cantacessi *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2008; Leow *et al.*, 2014). Las anexinas de parásitos parecen estar involucradas en las interacciones hospedador-parásito y en la modulación de la respuesta inmune del hospedador y en algunos casos, se las ha considerado como blancos potenciales para el desarrollo de vacunas (Hofmann *et al.*, 2010) y también con potencial valor para el desarrollo de técnicas de diagnóstico (Yang, *et al.*, 2014).

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo son la base de una nueva línea de investigación, la cual podría derivar en un diseño racional de inmuno-intervención en el hospedero intermediario natural.

REFERENCIAS

Aceti A., Celestino D., Teggi A., Caferro M., Pennica A., Grilli A., Sebastiani A., De Rosa F. **Histamine release test in the diagnosis of human hydatidosis.** Clinical and Experimental Allergy; 19: 355-399 (1989).

Al-Barwani F., Young S.L., Baird M.A., Larsen D.S. & Ward V.K. **Mannosylation of Virus-Like Particles Enhances Internalization by Antigen Presenting Cells.** PLOS One; 9 (8): e104523 (2014).

Allen J.E., Maizels R.M. **Diversity and dialogue in immunity to helminths.** Nature Reviews in Immunology; 11: 375–88 (2011).

Anbu K.A., Joshi P. **Identification of a 55 kDa Haemonchus contortus excretory/secretory glycoprotein as a neutrophil inhibitory factor.** Parasite Immunology; 30 (1): 23-30 (2008).

Appelmelk B.J., Van Die I., Van Vliet S.J., Vandenbroucke-Grauls C.M., Geijtenbeek T.B., van Kooyk Y. **Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells.** Journal of Immunology; 170 (4): 1635-1659 (2003).

Atochina O., Daly-Engel T., Piskorska D., McGuire E., Harn D.A. **A schistosome-expressed immunomodulatory glycoconjugate expands peritoneal Gr1+ macrophages that suppress naive CD4+ T cell proliferation via an IFN-gamma and nitric oxide-dependent mechanism.** Journal of Immunology; 167 (8): 4293-4302 (2001).

Barr T.A., Brown S., Ryan G., Zhao J., Gray D. **TLR-mediated stimulation of APC: Distinct cytokine responses of B cells and dendritic cells.** European Journal of Immunology; 37 (11): 3040-3053 (2007).

Baz A., Hernández A., Dematteis S., Carol C., Nieto A. **Idiotypic modulation of the antibody response of mice to antigens.** Immunology; 84: 350–354 (1995). *Echinococcus granulosus*

Baz A., Richieri A., Puglia A., Nieto A., Dematteis S. **Antibody response in CD4-depleted mice after immunization or during early infection with *Echinococcus granulosus*.** Parasite Immunology; 21: 141–150 (1999).

Baz A., Mourglia-Ettlin G., Dematteis S. **Complexity and function of cytokine responses in experimental infection by *Echinococcus granulosus*.** Immunobiology; 211 (1-2): 3-9 (2006).

Boeglin E., Smulski C.R., Brun S., Milosevic S., Schneider P., Fournel S. **Toll- Like Receptor Agonists Synergize with CD40L to Induce Either Proliferation or Plasma Cell Differentiation of Mouse B Cells.** PLoS ONE; 6 (10): 1-10 (2011).

Breijo, M., Anesetti G., Martínez L., Sim R.B., Ferreira A.M. ***Echinococcus granulosus*: the establishment of the metacestode is associated with control of complement-mediated early inflammation.** Experimental Parasitology; 118 (2): 188–196 (2008).

Caldas I.R., Campi-Azevedo A.C., Oliveira L.F.A., Silveira A.M.S., Oliveira R.C., Gazzinelli G. **Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection.** Acta Tropica; 108: 109–17 (2008).

Cantacessi C., Seddon J.M., Miller T.L., Yee Leow C., Thomas L., Mason L., Willis C., Walker G., Loukas A., Gasser R.B., Jones M.K. & Hofmann A. **A genome-wide analysis of annexins from parasitic organisms and their vectors.** Scientific Reports 3; (2013). Article number: 2893.

Cardozo G., Tucci P., Hernández A. **Characterization of the immune response induced by a carbohydrate enriched fraction from *Echinococcus granulosus* protoscoleces in patients with cystic hydatid disease.** Parasitology; 88 (11): 984-90 (2002).

Cerutti A., Puga I., Cols M. **Innate control of B cell responses.** Trends in Immunology; 32 (5): 202-211 (2011).

Constant S., Schweitzer N., West J., Ranney P., Bottomly K. **B lymphocytes can be competent antigen-presenting cells for priming CD4⁺ T cells to protein antigens in vivo.** Journal of Immunology; 155 (8): 3734-41 (1995).

Crampton S.P., Voynova E., Bolland S. **Innate pathways to B-cell activation and tolerance.** Annals of the New York Academy of Sciences; 1183: 58-68 (2009).

Dai W.J., Hemphill A., Waldvogel A., Ingold K., Deplazes P., Mossmann H., Gottstein B. **Major carbohydrate antigen of *Echinococcus multilocularis* induces an immunoglobulin G response independent of alphabeta⁺ CD4⁺ T cells.** Infection and Immunity; 69 (10): 6074-6083 (2001).

Dematteis S., Baz A., Rottenberg M., Ferdández C., Örn A., and Nieto A. **Antibody and Th1/Th2-type responses in Balb/c mice inoculated with live or dead *Echinococcus granulosus* protoscoleces.** Parasite Immunology; 21 (1): 19-26 (1999).

Dematteis S., Rottenberg M., Baz A. **Cytokine response and outcome of infection depends on the infective dose of parasites in experimental infection by *Echinococcus granulosus*.** Parasite Immunology; 25 (4): 189-97 (2003).

Díaz A., Casaravilla C., Irigoín F., Lin G., Previato J.O., Ferreira F. **Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* I: structure.** Trends in Parasitology; 27 (5): 204- 213 (2011).

Everts B., Perona-Wright G., Smits H.H., Hokke C.H., Van der Ham A.J., Fitzsimmons C.M., Doenhoff M.J., Van der Bosch J., Mohrs K., Haas H., Mohrs M., Yazdanbakhsh M., Schramm G. **Omega-1, a glycoprotein secreted by *Schistosoma mansoni* eggs, drives Th2 responses.** Journal of Experimental Medicine; 206 (8): 1673-1680 (2009).

Everts B., Smits H.H., Hokke C.H., Yazdanbakhsh M. **Helminths and dendritic cells: sensing and regulating via pattern recognition**

receptors, Th2 and Treg responses. European Journal of Immunology; 40 (6): 1525-1537 (2010).

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

Geijtenbeek T.B.H., Gringhuis S.I. **Signalling through Ctype lectin receptors: shaping immune responses.** Nature Reviews in Immunology; 9: 465–79 (2009).

Geijtenbeek T.B.H., van Vliet S.J., Engering A., 't Hart B.A., van Kooyk Y. **Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells.** Annual Review of Immunology; 22: 33–54 (2004).

Geisow M., Fritsche U., Hexham J., Dash B. & Johnson T. **A consensus aminoacid sequence repeat in Torpedo and mammalian calcium-dependent membrane binding proteins.** Nature; 320: 636–638 (1986).

Genestier L., Taillardet M., Mondiere P., Gheit H., Bella C., Defrance T. **TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses.** Journal of Immunology; 178 (12): 7779-86 (2007).

Gerke V. & Moss S. E. **Annexins: from structure to function.** Physiological Reviews; 82: 331–371, (2002).

Goodridge H.S., Marshall F.A., Else K.J., Houston K.M., Egan C., AlRiyami L., Liew F.Y., Harnett W., Harnett M.M. **Immunomodulation via novel use of TLR4 by the filarial nematode phosphorylcholine-containing secreted product, ES-62.** Journal of Immunology; 174: 284-293 (2005).

Graham A.S., Jegouzo S.A.F., Sheng Yan S., Powlesland A.S., Brady J.P., Maureen E. Taylor M.E., Drickamer K. **Prolectin, a Glycan-binding Receptor on Dividing B Cells in Germinal Centers.** The Journal of Biological Chemistry; 284 (27): 18537 (2009).

Gururajan M., Jacob J., Pulendran B. **Toll-Like Receptor Expression and Responsiveness of Distinct Murine Splenic and Mucosal B-Cell Subsets.** PLoS ONE; 2 (9): e863 (2007).

Harlow E., Lane D. **Antibodies: a laboratory manual.** Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; p. 283.

Harn D.A., McDonald J., Atochina O., Da'dara A.A. **Modulation of host immune responses by helminth glycans.** Immunology Review; 230 (1): 247-257 (2009).

Harris N., Gause W.C. **To B or not to B: B cells and the Th2-type immune response to helminths.** Trends in Immunology; 32 (2): 80-88 (2011).

He L., Ren M., Chen X., Wang X., Li S., Lin J., Liang C., Liang P., Hu Y., Lei H., Bian M., Huang Y., Wu Z., Li X., Yu X. **Biochemical and immunological characterization of annexin B30 from *Clonorchis sinensis* excretory/secretory products.** Parasitology Research; 113 (7): 2743-55 (2014).

Heath D.D. **The development of *Echinococcus granulosus* larvae in laboratory animals.** Parasitology; 60 (3): 449-56 (1970).

Hokke C.H., Deelder A.M. **Schistosome glycoconjugates in host-parasite interplay.** Glycoconjugate Journal; 18 (8): 573-587 (2001).

Hotez P.J., Brindley P.J., Bethony J.M., King C.H., Pearce E.J., Jacobson J. **Helminth infections: the great neglected tropical diseases.** The Journal of Clinical Investigation; 118 (4): 1311-1321 (2008).

Hotez P.J., Bethony J.M., Diemert D.J., Pearson M., Loukas A. **Developing vaccines to combat hookworm infection and intestinal schistosomiasis.** *Nature Review in Microbiology*; 8: 814–26 (2010).

Irma Van Die I, Cummings R.D. **Glycan gimmickry by parasitic helminths: A strategy for modulating the host immune response?** *Glycobiology*; 20 (1): 2-12 (2010).

Khoo K.H., Nieto A., Morris H.R., Dell A. **Structural characterization of Nglycans from *Echinococcus granulosus* hydatid cyst membrane and protoscoleces.** *Molecular and Biochemical Parasitology*; 86 (2): 237-248 (1997).

Krieg A.M., Yi A.K., Matson S., Waldschmidt T.J., Bishop G.A., Teasdale R., Koretzky G.A., Klinman D.M. **CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation.** *Nature*; 374: 546-549 (1995).

Kuijk L.M., van Die I. **Worms to the rescue: can worm glycans protect from autoimmune diseases?** *IUBMB Life*; 62: 303–12 (2010).

Leow C.Y., Willis C., Osman A., Mason L., Simon A., Smith B.J., Gasser R.B., Jones M.K., Hofmann A. **Crystal structure and immunological properties of the first annexin from *Schistosoma mansoni*: insights**

into the structural integrity of the schistosomal tegument. The FEBS Journal; 281 (4): 1209-25, (2014).

Lin G., Adriane R Todeschini, Akihiko Koizumi, Jorge L Neves, Humberto González, Sylvia Dematteis, Noriyasu Hada, Jose O Previato, Fernando Ferreira, Lucia Mendonça-Previato, and Alvaro Díaz. **Further structural characterization of the *Echinococcus granulosus* laminated layer carbohydrates: The blood-antigen P1-motif gives rise to branches at different points of the O-glycan chains.** Glycobiology; 23 (4): 438–452 (2013).

Linton P.J., Bautista B., Biederman E., Bradley E.S., Harbertson J., Kondrack R.M., Padrick R.C., Bradley L.M. **Costimulation via OX40L expressed by B cells is sufficient to determine the extent of primary CD4 cell expansion and Th2 cytokine secretion in vivo.** Journal of Experimental Medicine; 197: 875-883 (2003).

Macaulay A.E., DeKruyff R.H., Goodnow C.C., Umetsu D.T. **Antigen-specific B cells preferentially induce CD4⁺ Tcells to produce IL-4.** Journal of Immunology; 158: 4171-4179 (1997).

Makini S., Ayed K.H., Dalix A.M., Oriol R. **Immunological localization of bloos P1 antigen in tissues of *Echinococcus granulosus*.** *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*; 86: 87-88 (1992).

McSorley H.J., Loukas A. **The immunology of human hookworm infections.** *Parasite Immunology*; 32: 549–59 (2010).

Meevissen M.H.J., Yazdanbakhsh M., Hokke C.H. **Schistosoma mansoni egg glycoproteins and C-type lectins of host immune cells: molecular partners that shape immune responses.** *Experimental Parasitology*; 132: 14–21 (2012).

Moro P., Schantz P.M. **Echinococcosis: a review.** *International Journal of Infectious Diseases*; 13: 125—133 (2009).

Mourglia-Ettlin G., Marqués J.M., Chabalgoity J.A., Dematteis S. **Early Peritoneal Immune Response during *Echinococcus granulosus* establishment Displays a Biphasic Behavior.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*; 5 (8): e1293 (2011a).

Mourglia-Ettlin G., Amezcua-Vesely M.C., Fraga R., Baz A., Merino M.C., Gruppi A. And Dematteis S. ***Echinococcus granulosus* glycoconjugates induce peritoneal B cell differentiation into**

antibody-secreting cells and cytokine production. Parasite Immunology; 33 (11): 621-631 (2011b).

Perrigoue J.G., Marshall F., Artis D. **On the hunt for helminths: Innate immune cells in the recognition and response to helminth parasites.** Cellular Microbiology; 10 (9): 1757-1764 (2008).

Richards K.S., Arme C., Bridges J.F. **Echinococcus granulosus equinus: an ultrastructural study of murine tissue response to hydatid cysts.** Parasitology; 86: Pt3 407-417 (1983).

Salinger Prasanphanich N., Mickum M.L., Heimbürg-Molinaro J., Cummings R.D. **Glycoconjugates in host-helminth interactions.** Frontiers in Immunology, Review Article, (2013).

Sestak K., Ward L.A., Sheoran A., Feng X., Akiyoshi D.E., Ward H.D., Tzipori S. **Variability among Cryptosporidium parvum genotype 1 and 2 immunodominant surface glycoproteins.** Parasite Immunology; 24 (4): 213-219 (2002).

Siracusano A., Teggi A., Ortona E. **Human cystic echinococcosis: old problems and new perspectives.** *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases.* (2009).

Sun C.M., Deriaud E., Leclerc C., Loman R. **Upon TLR9 signaling, CD5+ B cells control the IL-12-dependent Th1-priming capacity of neonatal DCs.** Immunity; 22: 467-477 (2005).

Terrazas L.I., Walsh K.L., Piskorska D., McGuire E., Harn D.A. Jr. **The schistosome oligosaccharide lacto-N-neotetraose expands Gr1+ cells that secrete anti-inflammatory cytokines and inhibit proliferation of naive CD4+ cells: a potential mechanism for immune polarization in helminth infections.** Journal of Immunology; 167 (9): 5294-5303 (2001).

Thomas P.G., Harn D.A. Jr. **Immune biasing by helminth glycans.** Cellular Microbiology; 6 (1): 13-22 (2004).

Thompson R.C.A. and Lymbery A.J. **Echinococcus and Hydatid Disease.** CAB International, Wallingford, 1-50 (1995).

Thompson R.C. **Biology and systematics of Echinococcus.** In: Thompson RC, Lymbery AJ, editors. *Echinococcus and hydatid disease.* London: CAB International, 1—37 (1995).

van Die I., Cummings R.D. **Glycans modulate immune responses in helminth infections and allergy.** Chemical Immunology of Allergy; 90: 91–112 (2006).

van Liempt E., van Vliet S.J., Engering A., García Vallejo J.J., Bank C.M.C., Sanchez-Hernandez M., van Kooyk Y., van Die I. **Schistosoma mansoni soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation.** Molecular Immunology; 44: 2605–15 (2007).

van Riet E., Everts B., Retra K., Phylipsen M., Van Hellemond J.J., Tielens A.G., Van der Kleij D., Hartgers F.C., Yazdanbakhsh M. **Combined TLR2 and TLR4 ligation in the context of bacterial or helminth extracts in human monocyte derived dendritic cells: molecular correlates for Th1/Th2 polarization.** BMC Immunology; 10 (9): (2009).

van Vliet S.J., García-Vallejo J.J., van Kooyk Y. **Dendritic cells and C-type lectin receptors: coupling innate to adaptive immune responses.** Immunology & Cell Biology; 86: 580–7 (2008).

Velupillai P., Harn D.A. **Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220+ cells from schistosome-infected mice: a mechanism for regulation of CD4+ T-cell subsets.**

Proceedings of the National Academy of Sciences. USA; 9 (1): 18-22 (1994).

Velupillai P., Secor W.E., Harauf A.M., Harn D.A. **B-1 cell CD5+B220+ outgrowth in murine schistosomiasis is genetically restricted and is largely due to activation by polylactosamine sugars.** Journal of Immunology; 158 (1): 338-344 (1997).

Vuitton D. A. and Gottstein B. ***Echinococcus multilocularis* and Its Intermediate Host: A Model of Parasite-Host Interplay.** Journal of Biomedicine and Biotechnology; Artículo 923193: 14 páginas (2010).

Walker M., Baz A., Dematteis S., Stettler M., Gottstein B., Schaller J., Hemphill A. **Isolation and characterization of a secretory component of *Echinococcus multilocularis* metacestodes potentially involved in modulating the host-parasite interface.** Infection and Immunity; 72 (1): 527–536 (2004).

White C. & Kennedy J. **Oligosaccharides.** In: Chaplin, M., Kennedy, J. (Eds.), **Carbohydrate Analysis. A Practical Approach.** IRL Press, Oxford, UK.; 37 (1986).

Wright V., Bickle Q. **Immune responses following experimental human hookworm infection.** Clinical & Experimental Immunology; 142: 398– 403 (2005).

Yanaba K., Bouaziz J.D., Matsushita T., Tsubata T., Tedder T.F. **The Development and Function of Regulatory B Cells Expressing IL-10 (B10 Cells) Requires Antigen Receptor Diversity and TLR Signals.** Journal of Immunology; 82: 7459-7472 (2009).

Yan H., Xue G., Mei Q., Ding F., Sun S.H. **Secretion of annexin B1 in living cells and its calcium-dependent proapoptotic effect on eosinophils: a novel strategy for preventing host immune response?** International Journal of Biochemistry & Cell Biology; 40: 2151-63 (2008).

Yang D., Chen L., Wu X., Zhou X., Li M., Chen Z., Nong X., Gu X., Peng X., Yang G. **Expression of the *Tpanxb1* Gene from *Taenia pisiformis* and Its Potential Diagnostic Value by Dot-ELISA.** Journal of Parasitology; 100 (2):246-250 (2014).

Zhang Y., Wang K.H., Guo Y.J., Lu Y.M., Yan H.L., Song Y.L., Wang F., Ding F.X., Sun S.H. **Annexin B1 from *Taenia solium* metacestodes is a**

newly characterized member of the annexin family. Biological Chemistry; 388 (6): 601-610 (2007).