



UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS
CATEDRA DE INMUNOLOGIA



“Estudio de la capacidad protectora de anticuerpos anti-glutación transferasas de *Echinococcus granulosus* frente a la infección secundaria en modelo murino y como inhibidores de la actividad GST”

Rosina Giorgi Camarot

**Trabajo presentado para acceder al título de
Licenciada en Bioquímica**

2015

Tutora Dra. Verónica Fernández Mancebo.

Co-tutora MSc. Paula Arbildi.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está dedicado a mi familia y amigos que siempre me apoyaron y motivaron a seguir adelante. Agradezco enormemente a la Doctora Verónica Fernández, quien aceptó el desafío de ser mi tutora de tesis, y a la Magister Paula Aribildi, cotutora del trabajo, ambas me guiaron durante el desarrollo práctico enseñándome técnicas e instruyéndome en el verdadero trabajo de laboratorio.

Quiero destacar también la paciencia y el compañerismo de todos y cada uno de los integrantes del laboratorio de la cátedra de Inmunología en los cuales siempre encontré una respuesta, idea o sugerencia en el tiempo compartido.

Además quiero agradecer la ANII por otorgarme una beca de iniciación durante el año en que estuve realizando el trabajo de mesada y la escritura de la tesis.

RESUMEN

Las glutatión transferasas (GSTs) son una superfamilia de enzimas ampliamente estudiadas por su participación en la eliminación de compuestos citotóxicos. Los parásitos presentan un requerimiento adicional para estas enzimas, ya que, además de su propio metabolismo, están expuestos al ataque inmunológico de sus hospederos y en ocasiones, a agentes antiparasitarios. Dichas enzimas conjugan glutatión, por ejemplo, a compuestos oxidantes neutralizándolos y aumentando su solubilidad lo que facilita su eliminación, así como, algunas muestran propiedades inmunomoduladoras, por ejemplo, mediante la síntesis de prostaglandinas. A las GSTs parasitarias se las ha relacionado con la sobrevivencia de los helmintos dentro de su hospedero, y en algunos casos se ha reportado que la actividad GST es inhibida por parte de anticuerpos específicos. Nuestro grupo estudia las EgGSTs, GSTs del cestodo parásito *Echinococcus granulosus*, agente etiológico de la enfermedad hidática, donde el ser humano ingresa al ciclo de vida como hospedero intermediario accidental. Para el presente trabajo se consideraron las EgGSTs identificadas hasta el momento, planteándose que la inmunización de ratones con dichas GSTs permitiría la generación de anticuerpos que inhiben la actividad de las mismas brindando protección contra la infección secundaria. Se utilizaron las tres proteínas recombinantes como antígenos (EgGST1r, EgGST2r y EgGST3r) para inmunizar ratones. Se evaluó la inhibición de la actividad GST, por parte de los antisueros generados, utilizando dos enzimas recombinantes solubles y activas: la enzima homodimérica EgGST1r, y el heterodímero compuesto por una subunidad de EgGST2r y una de EgGST3r (EgGST2-3r). Los resultados mostraron que la actividad GST de EgGST2-3r fue inhibida en gran medida por los sueros anti-EgGST2r, posiblemente debido al bloqueo de la subunidad EgGST2r del heterodímero. Por otro lado, se observó que únicamente el grupo de animales inmunizados con la proteína EgGST1r desarrolló una protección significativa frente al desafío con el parásito. Tomando en conjunto ambos datos, se podría concluir que no existe una relación entre la protección y la inhibición de la actividad GST de estas enzimas EgGSTs.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
RESUMEN.....	ii
ÍNDICE	iii
- Capítulo 1 -	1
Introducción.....	1
1.1. Generalidades de <i>Echinococcus granulosus</i> y de la hidatidosis quística	1
1.2. Enzimas Glutación transferasas.	5
1.3. Glutación transferasas en <i>Echinococcus granulosus</i>	7
1.4. Hipótesis y objetivos.....	7
- Capítulo 2 -.....	16
Materiales y Métodos.....	16
2.1. Material Parasitario.....	16
2.2. Bacterias y Medios de cultivos	16
2.3. Producción y cuantificación de proteínas recombinantes	16
2.3.1. Preparación de las células competentes y transformación por Shock térmico.....	16
2.3.2. Producción y purificación de las GSTs.....	17
2.3.2.1. Producción de proteínas recombinantes	17
2.3.2.2. Purificación de EgGST1r soluble.....	17
2.3.2.3. Purificación de EgGST2r en cuerpos de inclusión.....	18
2.3.2.4. Purificación de EgGST2-3r.....	18
2.3.3. Obtención del lisado bacteriano de <i>E. coli</i> BL21.....	19
2.3.4. Cuantificación de proteínas, método de Bradford.	19
2.4. Obtención de sueros anti-GST	19
2.4.1. Animales de experimentación	19
2.4.2. Inmunización de ratones con las EgGSTs recombinantes.....	19
2.4.2.1. Protocolo para obtención de antisueros contra EgGSTs.	20
2.4.2.2. Protocolo para evaluación de la capacidad protectora de las EgGSTs frente a la infección por <i>E. granulosus</i>	20
2.4.3. Titulación de los sueros.....	21
2.5. Electrotransferencia de proteínas e inmunodetección	21
2.6. Ensayos de inhibición de la Actividad GST	22
2.7. Análisis estadístico.	22
- Capítulo 3 -.....	23

Evaluación de la capacidad neutralizante de sueros policlonales anti-EgGST sobre la actividad GST <i>in vitro</i>.	23
3.1. Antecedentes	23
3.2. Resultados	24
3.2.1. Expresión y purificación de los EgGSTs recombinantes.	24
3.2.2. Obtención y caracterización de antisueros específicos contra las GSTs parasitarias recombinantes.	27
3.2.3. Evaluación de la capacidad neutralizante de la actividad GST mediada por los sueros anti-EgGStr.	28
3.3. Conclusiones	30
- Capítulo 4 -	31
Evaluación <i>in vivo</i> de la capacidad protectora de las GSTs parasitarias frente a la infección por <i>Echinococcus granulosus</i>.	31
4.1. Antecedentes	31
4.2. Resultados.	32
4.2.1. Inmunización de ratones y desafío contra <i>E. granulosus</i>.	32
4.2.2. Análisis de la capacidad protectora de las EgGSTs recombinantes contra la infección secundaria de <i>E. granulosus</i>.	33
4.3. Conclusiones	35
- Capítulo 5 -	37
Discusión	37
BIBLIOGRAFÍA	41

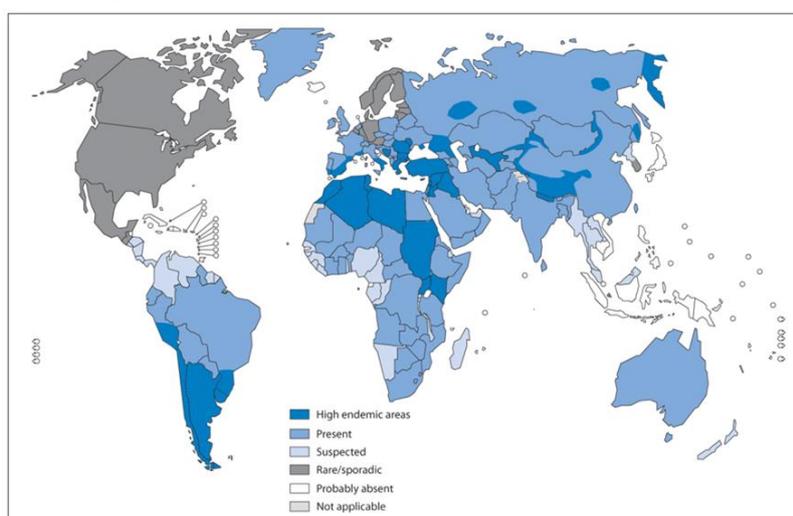
– Capitulo 1 – Introducción

1.1. Generalidades de *Echinococcus granulosus* y de la hidatidosis quística

La hidatidosis es una enfermedad causada por el estado larval de *E. granulosus*, parásito perteneciente a la clase cestoda (Moro, P. y Schantz, P.M., 2009). Representa una importante infección zoonótica ampliamente distribuida en el mundo.

La hidatidosis es la equinococosis que más afecta a la salud humana. Representa el 95% de los casos reportados, lo que significa entre 2 a 3 millones de personas diagnosticadas anualmente. Está ampliamente distribuida, repartida en regiones hiperendémicas, endémicas y de baja prevalencia (Figura 1.1). Asimismo, existen otras tres especies pertenecientes a este género, capaces de desarrollar enfermedades en el ser humano. Por un lado, *E. multilocularis*, causante de la equinococosis alveolar, detectado únicamente en el hemisferio norte, que afecta entre 0,3 a 0,5 millones de personas al año. Por otro lado, dos agentes, *E. vogeli* y *E. oligarthrus*, que producen la equinococosis poliquistica reportada principalmente en América del Sur, con un total de 150 casos anuales (Craig, P.S. et al., 2007). Más recientemente, se han identificado dos nuevas especies, *E. shiquicus* y *E. felidis*, de las cuales se desconoce su implicancia zoonótica (Moro, P. y Schantz, P.M., 2009).

Distribution of *Echinococcus granulosus* and cystic echinococcosis (hydatidosis), worldwide, 2009



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2010. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected
Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Figura 1.1: Distribución de la equinococosis quística en el mundo. Imagen modificada de <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>

Como todos los miembros del género *Echinococcus*, *E. granulosus* posee dos hospederos en su ciclo de vida (figura 2) (Barnes, T.S. et al., 2012; Craig, P.S. et al., 2007). Un hospedero definitivo, carnívoro (generalmente cánidos), donde el parásito se desarrolla en el intestino delgado a su forma adulta. Esta posee reproducción sexuada con generación de huevos, los cuales son expulsados al ambiente por las heces del animal. El hospedero intermediario, omnívoro o herbívoro, ingiere los huevos, los cuales eclosionan dentro de su intestino, liberándose la oncósfera, la cual atraviesa la pared intestinal y es transportada de modo pasivo por la sangre hacia diferentes tejidos y órganos siendo los más afectados hígado y pulmón (Zhang, W. y D.P. McManus, 2008). La larva es así capaz de llegar y enquistar en las vísceras del animal, dando lugar a lo que se conoce como quiste hidático (metacestodo). El ser humano se convierte en hospedero intermediario accidental al ingerir alimentos contaminados con huevos del parásito (Craig, P.S. et al., 2007). En el interior de los quistes por reproducción asexual se generan los protoescólices. El ciclo se completa cuando el hospedero definitivo ingiere las vísceras infectadas con quistes viables, es decir, conteniendo protoescólices. Los protoescólices ingeridos son capaces de adherirse a la pared del intestino para desarrollarse en gusanos adultos.

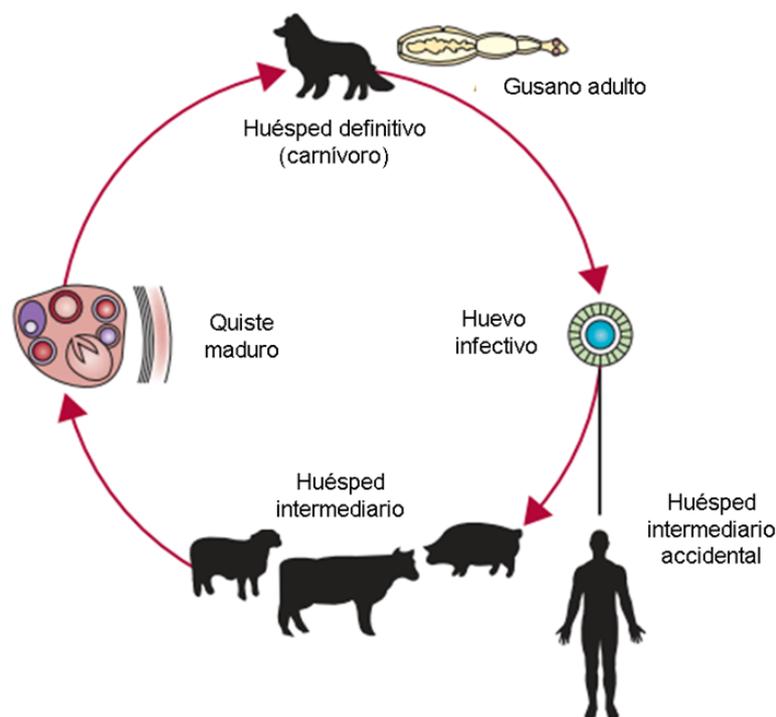


Figura 1.2: Ciclo de vida de *E. granulosus*. Imagen modificada de Craig P.S. et al., 2007

La hidatidosis se caracteriza por un crecimiento lento y bien tolerado del quiste en el organismo, conduciendo en ocasiones a grandes masas parasitarias (Craig, P.S. et al., 2007). Como en general es una patología asintomática en humanos, es poco habitual que se diagnostique tempranamente, exceptuando aquellos casos en que el quiste se desarrolla en órganos como cerebro u ojos, donde se producen síntomas aún cuando el quiste es muy pequeño (Moro, P. y Schantz, P.M., 2009). Hasta la década de los 80s el único tratamiento para los pacientes con hidatidosis era la extracción quirúrgica de los quistes (Moro, P. y Schantz, P.M., 2009). Si bien la cirugía sigue siendo el tratamiento principal se ha complementado o sustituido por tratamientos con fármacos como el albendazol, mebendazol y praziquantel, incrementando la tasa de curación a un 30%.

La equinococosis quística, afecta tanto a personas como animales representando un problema serio en la salud pública, así como también pérdidas económicas. Los animales de granja, como bovinos u ovinos, son los que poseen la mayor prevalencia de infección. En el año 2000 se observó en el ganado de la región, un porcentaje de infección de 9.8% en Uruguay, 9.0% en Argentina, 13.6% en Brasil, 7.2% en Chile y 75% en Perú (Revisado por Cardona, G.A. y Carmena D., 2013). Las zonas más afectadas son aquellas en vías de desarrollo cuya economía se basa en la producción agrícola (Cardona, G.A. y Carmena D., 2013). Esto se debe en gran medida a prácticas que favorecen la diseminación del parásito, como la matanza para consumo en granjas, donde los perros tienen acceso a viseras crudas contaminadas, cerrando el ciclo de vida del parásito (Craig, P.S. et al., 2007). Los factores de riesgo asociados a la hidatidosis son la presencia de perros en contacto con el ganado (perros pastores), la falta de educación en la población tanto sobre la transmisión de la enfermedad, como de la contaminación ambiental (pasturas y aguas) que puede verse incrementada por la falta de hábitos higiénicos. También, existe cierta correlación entre el desarrollo de la parasitosis y los factores fisiológicos de la población así como la edad y el sexo (Craig, S. et al., 2007).

Existen costos asociados a la patología que afectan tanto la producción de animales como la salud de humanos. Si bien estos costos son difíciles de estimar por la cantidad de parámetros, estudios preliminares sugieren que las pérdidas económicas referidas a humanos y animales llegaría en algunas regiones a representar el 0.5% del producto bruto interno (Cardona, G.A. y Carmena, D., 2013). Los costos asociados a la salud humana abarcan los gastos en el diagnóstico y tratamiento y los asociados a la pérdida en la calidad de vida de los individuos (morbilidad) y muerte (Torgerson, P.R., 2003, Carabin, H. et al., 2005). Por otro lado, la existencia de animales de producción

infectados genera pérdidas en la cantidad y calidad de sus productos, como son leche, lana y carne.

En muchas regiones del mundo se han desarrollado programas de control de la hidatidosis que pretenden disminuir al mínimo la incidencia interrumpiendo el ciclo de vida del parásito. En este sentido, ciertas estrategias implementan medidas que destacan la higiene en la relación íntima perro-humano, favoreciendo el lavado de manos y evitando el contacto con las heces. Algunos programas se complementan con medidas que promueven el correcto descarte de las vísceras infectadas de ganado así como el control de las poblaciones caninas con tratamientos regulares con drogas antiparasitarias (McManus D.P., et al., 2003). De esta forma, algunos países han logrado controlar e incluso auto declararse libre de hidatidosis, como es el caso de Islandia, que desde los años 60s es un país libre de hidatidosis. En Uruguay se aplica la Ley N° 13.459 (1965) con las modificaciones introducidas por la Ley N° 16.106 (1990), que enumera obligaciones y responsabilidades tanto públicas como privadas con el fin de erradicar la enfermedad en el territorio nacional. En particular, se especifican los controles que deben realizarse en los lugares destinados a faena animal así como la obligación de los propietarios de mantener los perros libres de la infección por *E. granulosus*, tanto en zonas urbanas como rurales (Artículo 8).

Otra aproximación para el de control de la hidatidosis, se basa en el desarrollo de vacunas para los hospederos tanto intermediarios como definitivos. Dicha estrategia es especialmente útil para aquellas regiones donde se dificulta la interrupción del ciclo parasitario ya sea por aspectos geográficos o por la incapacidad de medicar y controlar regularmente a los perros así como porque no exista una aislación física de las zonas sin control (Lightowlers, M.W., et al., 2003). En este sentido, existen numerosos y variados trabajos que buscan antígenos protectores frente a una infección por *E. granulosus*. El grupo de Woollard (2001) reportó un antígeno recombinante parasitario, EG95r, que brindó una protección de 98.7% frente al desafío con *E. granulosus* en ovejas inmunizadas con dicha proteína. En 2011 Bentony M. y colaboradores, trabajaron en el desarrollo de una vacuna basada en el antígeno EG95r (Bethony, J.M., et al., 2011), la cual actualmente está siendo utilizada en animales de rodeo en Argentina. Originariamente, se pensaba que los cestodos adultos no eran inmunogénicos en su hospedero definitivo, debido a la concepción errónea de que los escólex de la mayoría de las especies hacían solamente un contacto superficial, sin penetración en la mucosa intestinal. Más adelante se comprobó que esta idea no se adapta para los casos de *E.*

granulosus y *E. multilocularis*, ya que los escólex son capaces de penetrar las criptas de Lieberkühn e incluso la lámina propia del intestino, resultando en una ruptura del tejido. Esta interrelación facilita el intercambio de moléculas desde el parásito al hospedero, y de este modo el sistema inmune del hospedero puede responder vía humoral a dichos antígenos (Zhang, W. y McManus, D.P., 2008). En este sentido, cada día surgen más datos que apoyan la factibilidad de generar inmunidad protectora en el hospedero definitivo por inmunización (revisado por Rossi, A., et al., 2012), mostrando que hoy el desarrollo de vacunas antihelmínticas para perros es una realidad en progreso.

En la búsqueda de antígenos con capacidad protectora contra infecciones helmínticas, las enzimas detoxificantes glutatión transferasas (GSTs) surgen como posibles candidatos. Esto se basa en datos ya descritos en otras infecciones por platelmintos donde se ha asignado un rol protector de los anticuerpos anti-GST frente a la infección por helmintos parásitos como *Schistosoma sp.*, *Fasciola sp.*, *Wuchereria bancrofti* y *Seteria cervi* (Morrison, C.A., et al., 1996; Grezel, D., et al., 1993; Sexton, J.L., et al., 1990; Gupta, S., et al., 2005; Veerapathran, A., et al., 2009). En los casos de *W. bancrofti* y de *S. cervi*, se vincula la protección encontrada a la neutralización de la actividad GST parasitaria por parte de anticuerpos específicos (Grzych, J.M., et al., 1993). Hasta el momento, no se tienen datos sobre las GSTs de *E. granulosus* como blancos para el desarrollo de vacunas en hidatidosis, pero en base a los antecedentes en otros helmintos, se esperaría que dichas proteínas brinden cierta protección contra la infección parasitaria.

1.2. Enzimas Glutatión transferasas.

Las enzimas glutatión transferasas (GSTs) son una superfamilia de enzimas multifuncionales involucradas en los mecanismos de detoxificación celular de diversas sustancias tanto fisiológicas como xenobióticas. Catalizan la conjugación del tripéptido glutatión (GSH, γ -glutamil-cisteinil-glicina) a una amplia variedad de compuestos electrofílicos, donde la conjugación al 1-cloro-2,4 dinitrobenzenu (CDNB), se define como reacción canónica (Wilce, M.C.J. y Parker, M.W, 1994). Se distinguen cuatro familias diferentes, las citosólicas o solubles, las microsomales, también conocidas como MAPEG (proteínas asociadas a membranas relacionadas en el metabolismo de eicosanoides y glutatión), las mitocondriales y las bacterianas (Torres-Rivera, A. y Landa, A., 2007; Board, P.G. y Menon, D., 2013).

Las GSTs citosólicas se encuentran de modo ubicuo en todos los organismos aerobios. Esta familia está dividida en 7 clases, originalmente establecidas en base al estudio de las enzimas de mamíferos: Alfa, Pi, Mu, Sigma, Tita, Zeta y Omega (Frova, C., 2006), aunque actualmente, la clasificación se basa en la conservación de aminoácidos y las inferencias filogenéticas (Board, P.G. y Menon, D., 2013). Suelen presentar un peso molecular de entre 45-55 kDa, y son activas solamente cuando se encuentran formando dímeros, ya sea con subunidades iguales o diferentes siempre y cuando pertenezcan a la misma clase (Frova, C., 2006). Cada una de las subunidades posee dos dominios que conforman el centro catalítico. El dominio N-terminal, conteniendo el lugar de unión al GSH (conocido como sitio G), se encuentra muy conservado mostrando una organización tridimensional similar al de las tioredoxinas. Por otro lado, la estructura del dominio C-terminal de la proteína está compuesta únicamente por hélices alfa, en número variable (entre 4 a 7) y contiene el sitio H, lugar de unión al ligando hidrofóbico (Frova, C., 2006).

Es de suma importancia la reacción del grupo tiol del GSH, a un centro electrofílico, ya que dicho centro está presente en una amplia variedad de moléculas, tanto endógenas como exógenas (Frova, C., 2006; Torres-Rivera, A. y Landa, A., 2007; Harispe, L. et al., 2010). Los conjugados de glutatión así formados se vuelven más solubles en agua, lo que facilita su eliminación. En este contexto, dicha reacción es uno de los primeros pasos a lo largo de la ruta del ácido mercaptúrico en el que xenobióticos hidrófobos se inactivan y se elimina del organismo por la orina (Wilce, M.C.J. y Parker, M.W, 1994). Sin embargo, la visión original de las GSTs únicamente como enzimas detoxificantes ha venido cambiando con el tiempo. Hoy en día, se conoce que estas proteínas pueden presentar otras actividades como peroxidasa, isomerasa y tiol-transferasa, o incluso pueden actuar como ligandina independiente de la acción catalítica. En este contexto, por ejemplo, las GSTs de clase Sigma de vertebrados y de parásitos pluricelulares, pueden realizar biosíntesis de eicosanoides (prostaglandinas). Como conclusión se puede resumir que, en forma general, las GSTs citosólicas presentan funciones versátiles que incluye la detoxificación tanto por conjugación a GSH como por transporte no catalítico, la modulación de señales, el catabolismo de aminoácidos aromáticos y la regulación de canales iónicos (Frova, C., 2006; Torres-Rivera, A. y Landa, A., 2007).

Las GSTs protegen a las células del daño oxidativo (Hayes J.D. y Pulford D.J., 1995). En los parásitos, las GSTs son importantes para la supervivencia del mismo dentro de su hospedero, ya que su papel detoxificante estaría relacionado con su capacidad tanto de metabolizar productos de la peroxidación de lípidos (incluidos los generados por los

oxidantes derivados de los mecanismos efectores del sistema inmune del hospedero); como de metabolizar otros productos tóxicos, incluyendo, en teoría agentes quimioterapéuticos (Torres-Rivera A. y Landa A., 2007).

1.3. Glutación transferasas en *Echinococcus granulosus*.

Nuestro grupo de trabajo se ha centrado en la identificación y tipificación de las GSTs de *E. granulosus*. Al momento hemos identificado tres GST citosólicas parasitarias (EgGST1, EgGST2 y EgGST3) las cuales hemos secuenciado y confirmado su expresión en protoescólex así como en sus productos de excreción-secreción (Fernandez, V., et al., 2000; Iriarte, A., et al., 2012, La Rocca, S., 2014, Arbildi, P., 2013). La EgGST1, catalogada como de clase Mu, se expresa tanto en el tegumento como en el parénquima y es la única encontrada en el líquido hidático de quistes bovinos hasta el momento (La-Rocca S., 2014). La EgGST2, clasificada como Sigma, se detecta en el tegumento del parásito (Arbildi, P., 2013). Finalmente, la EgGST3, que muestra aminoácidos característicos de clase Omega en su dominio N-terminal y de clase Sigma en su dominio C-terminal (Iriarte, A., et al., 2012), se distribuye en todo el organismo el parásito, tanto en el parénquima como en el tegumento y con una alta expresión en las ventosas del mismo (La-Rocca S., 2014).

La proteína EgGST1 recombinante (EgGST1r) enzimáticamente activa mostró que podría estar relacionada a las función de detoxificación fisiológica de lípidos peroxidados entre otros compuestos (Harispe, L., et al., 2010). Si bien las proteínas EgGST2 y EgGST3 recombinantes (EgGST2r y EgGST3r) no se obtuvieron en forma soluble, se las expresó en cuerpos de inclusión enzimáticamente inactivas (Arbildi, P., 2013, La-Rocca S., 2014). Paralelamente, se produjo en forma recombinante y soluble una enzima heterodimérica activa, compuesta de EgGST2 y EgGST3 (EgGST2-3r). Vale la pena mencionar que dicha forma heterodimérica (EgGST2-3 nativo) se detectó en extractos de protoescólex mediante inmunoprecipitación (La-Rocca, S., 2014).

1.4. Hipótesis y objetivos.

Los helmintos parásitos suele contener niveles relativamente altos de GSTs. Las diferentes actividades que pueden exhibir en conjunto dichas GSTs, en particular las relacionadas con detoxificación e inmunomodulación, pueden ser de relevancia para los helmintos en el contexto de una infección. Por lo tanto, se plantea que el desarrollo de

estrategias que anulen o afecten su actividad podría desfavorecer la supervivencia del parásito en su hospedero. En este contexto, la generación de anticuerpos específicos contra las GSTs parasitarias podría brindar protección frente a la infección, particularmente a través de la neutralización de la actividad GST.

Este trabajo tiene como objetivo general contribuir a la comprensión de la relación hospedero-parásito en la infección por *E. granulosus* a través de la evaluación de la capacidad protectora de las EgGSTs frente a la infección secundaria murina y del estudio del posible rol de los anticuerpos anti-EgGST como inhibidores de su actividad.

En este contexto, nos planteamos dos objetivos específicos:

1. Evaluar *in vitro*, la capacidad neutralizante de sueros policlonales anti-EgGST sobre la actividad GST canónica.
2. Evaluar *in vivo* la capacidad protectora de las EgGSTs frente a la infección por *E. granulosus* en el modelo de infección secundaria murina.

- Capítulo 2 -
Materiales y Métodos.

2.1. Material Parasitario

Los quistes hidáticos de pulmón fueron obtenidos de bovinos infectados naturalmente (planta de faena Urexpport; Montevideo, Uruguay). Cada quiste se procesó individualmente de acuerdo a Baz A. *et al.* (1998) con mínimas modificaciones. Se perforaron los quistes por punción con material estéril, colectándose el líquido hidático (LHB) en condiciones asépticas. Los protoescólex se separaron del LHB por decantación de los quistes fértiles y se lavaron con PBS (NaCl 150 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 4.3 mM, KH₂PO₄ 1.4 mM, pH 7.2) conteniendo Gentamicina 40 µg/mL. La viabilidad de los protoescólex se evaluó por la capacidad de excluir Eosina mediante la observación al microscopio óptico (Robinson y Arme, 1985).

2.2. Bacterias y Medios de cultivos

Para la producción de las proteínas recombinantes se utilizó la cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3) (genotipo F⁻ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5⁻ T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]).

Los medios de cultivos empleados en los protocolos fueron LB (triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 1%); LB-agar (agar 1,5% en LB); LB-glucosa (glucosa 20 mM en LB), esterilizados como indica Sambrook y Russel (2001). En caso de ser necesario se especifica el agregado de antibiótico, Kanamicina y/o Ampicilina a concentración final 50 µg/ml y 200 µg/ml respectivamente.

2.3. Producción y cuantificación de proteínas recombinantes

2.3.1. Preparación de las células competentes y transformación por Shock térmico

Las células de *E. coli* BL21(DE3) competentes para ser transformadas por shock térmico, se prepararon por el método descrito por Sambrook y Russel (2001) con mínimas modificaciones. Se sembraron 500 µl de un cultivo bacteriano nocturno (O/N) en 10 mL de LB y se dejaron crecer hasta una DO_{600nm}= 0,6 (37°C con agitación 220 rpm).

Se decantaron las células por centrifugación a 4000xg y 4°C por 10 minutos, se resuspendió el *pellet* en 5 mL de CaCl₂ 100 mM a 4°C, se cosecharon nuevamente las células. Nuevamente, el *pellet* celular se resuspendió en 1 mL de CaCl₂ 100 mM a 4°C y se incubaron en hielo durante una hora. A una alícuota de 100 µL de células competentes se le agregó 2 µg de ADN de la construcción de interés (ver tabla 2.1). Se incubó por 3 minutos en hielo, luego por 5 minutos a 37-42°C, seguido por 2 minutos en hielo. Se recuperaron las células en 0,5 mL de LB-glucosa a 37 °C 1 hora con agitación (220 rpm). Finalmente, se plaquearon 200 µL de la suspensión celular en LB-agar conteniendo el o los antibióticos correspondientes y se dejó crecer a 37°C por 16 horas. Es oportuno mencionar que para producir la forma heterodimérica recombinante, las células competentes fueron transformadas con 2 construcciones simultáneamente (pET28-EgGST2 y pET5-EgGST3) y la suspensión celular resultante se plaqueó en LB agar conteniendo ambos antibióticos (Kanamicina y Ampicilina).

Tabla 2.1: Construcciones de expresión para las proteínas de interés.

Vector	Resistencia a	Proteína expresada	Desarrollado
pET28a	Kanamicina	EgGST1r	Arbildi P. 2013
pET5a	Ampicilina	EgGST2r	Arbildi P. 2013
pET28a	Kanamicina	EgGST3r	La Rocca S. 2014

2.3.2. Producción y purificación de las GSTs

2.3.2.1. Producción de proteínas recombinantes

A partir de una colonia aislada, obtenida como se indicó en 2.3.1, se realizó un cultivo nocturno en 10 mL de LB con el correspondiente antibiótico, a 37°C con agitación (220 rpm). Dicho cultivo se inoculó en 200 mL de LB conteniendo el correspondiente antibiótico y se dejó crecer a 37°C con agitación hasta una DO_{600nm}= 0.6. Se indujo la expresión de la proteína con IPTG 1 mM durante 3 horas a 37°C con agitación. Las células se cosecharon (a 5000 rpm 10 minutos 4°C) y se resuspendieron en 20 mL de PBS conteniendo TritónX-100 1% (v/v).

2.3.2.2. Purificación de EgGST1r soluble.

Se realizó la disrupción celular por ultrasonido (30% pulso y 70% descanso) en baño de hielo durante 10 minutos a 40% de la potencia, en Omni-Ruptor 4000. Se

centrifugó durante 10 minutos 5000xg a 4°C. La proteína recombinante se purificó a partir de la fracción soluble por columna Ni-NTA (Invitrogen) siguiendo las especificaciones del fabricante. Brevemente, se equilibró la columna con amortiguador nativo (NaCl 500 mM, NaHPO₄ 50 mM, pH 8) y posteriormente se pasó el sobrenadante por decantación. Se lavó la columna con 10 volúmenes de amortiguador de lavado (imidazol 20 mM en amortiguador nativo) y se eluyó adicionando de a 1 mL de amortiguador de elución (imidazol 500 mM en amortiguador nativo). El proceso de purificación se siguió evaluando los eluidos con el reactivo de Bradford, de forma cualitativa (ver 2.3.4). Se mezclaron las fracciones que contenían la proteína y se intercambió el amortiguador de elución por KH₂PO₄ 10 mM, pH 6.5, en columna PD-10 (Invitrogen). La proteína recombinante purificada se dosificó mediante el método de Bradford (ver 2.3.4), se almacenó a una concentración de 2 µg/µL a -20°C hasta su uso. Se confirmó la pureza de la misma por SDS-PAGE al 15% visualizando con Azul de Coomassie (Sambrook y Russel, 2001).

2.3.2.3. Purificación de EgGST2r en cuerpos de inclusión.

Las fracciones de cuerpos de inclusión enriquecidas en la proteína recombinante se llevó a cabo según Schmidt A.E. et al. (2005), con modificaciones menores. Las células bacterianas inducidas cosechadas, se resuspendieron en 40 mL de Nonidet-40 3% (v/v) en Tris-HCl 10 mM (pH 7.5) y EDTA 1 mM y se sonicó al 50% del poder hasta obtener una solución traslúcida. Se colectaron los cuerpos de inclusión por centrifugación a 20000xg durante 15 minutos. Se lavaron los cuerpos de inclusión dos veces con agua seguido de un sonicado breve y centrifugación a 20000xg. Se estimó la cantidad de proteína recombinante insoluble purificada por SDS-PAGE al 15% tiñendo con Azul de Coomassie (Sambrook y Russel, 2001), empleando una curva estándar con BSA (1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01 µg/mL). Previamente, el grupo de trabajo utilizó la misma metodología para la producción y cuantificación de EgGST3r.

2.3.2.4. Purificación de EgGST2-3r.

La proteína recombinante se purificó a partir de la fracción soluble del extracto bacteriano soluble, por columna Ni-NTA (Invitrogen) como se describió para EgGST1r (2.3.2.2). Luego, por gel filtración en columna de Superdex 75, se cambió de *buffer* a Tris 20 mM (pH 8) conteniendo NaCl 150 mM, en el equipo AKTA (GE Healthcare, UK). La proteína recombinante purificada se dosificó mediante el método de Bradford (ver 2.3.4), se almacenó a una concentración de 1 µg/µL a -20°C hasta su uso. Se confirmó la pureza

de la misma por SDS-PAGE al 15% visualizando con Azul de Coomassie (Sambrook y Russel, 2001).

2.3.3. Obtención del lisado bacteriano de *E. coli* BL21.

El cultivo de *E. coli* BL21 (sin transformar) se realizó de igual manera que el descrito para la producción de proteínas recombinantes (2.3.2.1) pero en LB sin antibiótico. Para obtener el lisado, las células se rompieron por ultrasonido en las condiciones mencionadas en 2.3.2.2.

2.3.4. Cuantificación de proteínas, método de Bradford.

Se empleó el método de Bradford (Bradford, M., 1976) para la cuantificación de proteínas en solución. Se empleó una curva estándar de BSA (0, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 mg/mL). Se incubó por 5 min 10 µL de las muestras a cuantificar (a dilución adecuada) o de los estándares con 100 µL del reactivo de Bradford (Coomassie G250 10% (m/v), ácido fosfórico 8.5% (v/v), etanol 4.75% (v/v)). Se midió la absorbancia a 600 nm y se determinó la concentración de las muestras por interpolación a la curva estándar. En el caso de la purificación de proteínas por columnas de afinidad, el seguimiento del perfil de elución se realizó por esta técnica en forma cualitativa, tomando la observación del desarrollo de color azul como indicativo de la presencia de proteínas en la fracción.

2.4. Obtención de sueros anti-GST

2.4.1. Animales de experimentación

Se utilizó ratones hembras Balb/c vírgenes de 6-8 semanas de edad, obtenidos del Bioterio de Cría de la Dirección de Laboratorios Veterinarios “Dr. Miguel Rubino” (DiLaVe) del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP). Los animales se mantuvieron en el Bioterio de Experimentación de la Cátedra de Inmunología (Instituto de Higiene) en condiciones asépticas con ciclos de luz/oscuridad y temperatura controlada, y se los alimentó con ración y agua *ad libitum*.

2.4.2. Inmunización de ratones con las EgGSTs recombinantes.

Los procedimientos realizados en las inmunizaciones siguieron las normas de trabajo con animales de experimentación establecidas por la Comisión Honoraria de

Experimentación Animal (CHEA) de la Universidad de la República (protocolo N° 101900-000077-13).

2.4.2.1. Protocolo para obtención de antisueros contra EgGSTs.

Se trabajó con 5 grupos de animales (Tabla 2.2), empleando un esquema de 3 inoculaciones por vía subcutánea (en el lomo), espaciadas por 15 días. A los 15 días de la tercera inoculación se sangró a cero y se sacrificó los animales de los cinco grupos. Se separó el suero de la sangre obtenida de cada animal, dejando coagular a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego de centrifugar, los sueros se guardaron a -20°C hasta su uso.

Tabla 2.2: Grupos de animales para la obtención de anti-sueros. Se inoculo un volumen total de 100ul vía sub cutánea.

Grupo	Nº ratones	Inmunización
1	7	50 ug EgGST1r en alúmina
2	7	50 ug EgGST2r en alúmina
3	7	50 ug EgGST3r en alúmina
4	8	1:1 alúmina en PBS estéril
5	8	PBS estéril

2.4.2.2. Protocolo para evaluación de la capacidad protectora de las EgGSTs frente a la infección por *E. granulosus*.

Se trabajó con 7 grupos de animales (Tabla 2.3), empleando un esquema de 3 inoculaciones para cada grupo experimental, espaciadas por 15 días. Los animales se infectaron con 2000 protoescólex en la cavidad peritoneal de los ratones (Mourglia-Ettlin, G., et al., 2011) a los 4 meses de la última inoculación. Luego de 8 meses de la infección, se sacrificó los animales de los 7 grupos y se evaluó individualmente el resultado de la infección, contando el número de quistes desarrollados y determinando la carga parasitaria.

Tabla 2.3: Grupos de animales para la obtención de anti-sueros. Se inoculo un volumen total de 100ul vía sub cutánea.

Grupo	Nº ratones	Inmunización
1	7	50 ug EgGST1r en alúmina
2	7	50 ug EgGST2r en alúmina
3	7	50 ug EgGST3r en alúmina
4	7	50 ug EgGST1+2+3 (1:1:1) en alúmina
5	7	50 ug lisado bacteriano en alúmina
6	8	1:1 alúmina en PBS estéril
7	8	PBS estéril

2.4.3. Titulación de los sueros.

Para valorar el título de anticuerpos IgG específicos contra rEgGST1, rEgGST2, y rEgGST3, se adecuó el método de ELISA descrito previamente (Mourglia-Ettlin G., et al., 2011). Brevemente, se sensibilizaron placas de titulación (Greiner) con 10 µg/pocillo de EgGST1r o EgGST2-3r durante toda la noche a 4°C. Luego, se bloquearon con PBS conteniendo leche descremada al 1% a temperatura ambiente por 1 hora y se lavaron con PBS-Tween-20 0.05%. Se incubaron las muestras en estudio diluidas 1/1000 en PBS-Tween-20 0.05%-Leche descremada 0.5%, durante toda la noche a 4°C. Luego de lavar con PBS-Tween-20, se incubó con el anticuerpo secundario (anti-IgG murina conjugado a peroxidasa, 1/5000 en PBS-Tween(0.05%)-Leche(1%), Dako), durante 1 hora a 37°C y se lavó nuevamente. El revelado se realizó en *buffer* acetato 0.1 M, pH 5.5 conteniendo el sustrato peróxido de hidrógeno 0.004% y 3,3',5,5'-tetrametil-bencidina 0.1 mg/mL. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 2 N y se midió la absorbancia a 450 nm (MCC/340, MultiSkan). Se definió como título al valor de la Absorbancia medida a 450 nm de la dilución del suero 1/1000 restándole la absorbancia de la misma dilución de los correspondientes sueros del día cero (SD0). Se definió el umbral del título, *cutoff*, aquel valor por el cual el 95% de los títulos obtenidos para los sueros de los grupos control quedarán por debajo del mismo. Este valor de umbral se calculó para cada experimento.

2.5. Electrotransferencia de proteínas e inmunodetección

Las EgGSTs recombinantes se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida 15% y se traspasaron a membrana PVDF (polifluoruro de vinilideno) por transferencia semi-húmeda (Sambrook J. y Russel D., 2001). La transferencia se realizó utilizando electrodos de carbono grafito durante 45 minutos, a 0.8 mA por cm², en solución de transferencia (Tris 50 mM, glicina 40 mM y metanol 20%). Las membranas se bloquearon por 16 h a 4°C en PBS conteniendo Tween-20 0.05% (v/v) y leche descremada en polvo 1% (w/v) y se lavaron con PBS-Tween-20 0.05%, previo a incubarlas con los anti-sueros diluidos por 1h a 37°C en agitación. Nuevamente, se lavaron las membranas con PBS-Tween-20 0.05% y se incubaron con anticuerpos de cabra anti-IgG murina conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma, 1/5000 en PBS-Tween(0.05%)-Leche(1%)), durante 1 hora a 37°C en agitación. Luego de lavar con PBS-Tween 20, se reveló utilizando amortiguador carbonato (NaHCO₃ 0.1M, MgCl₂ 1mM, pH9.8) conteniendo fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indoilo (1.5 mg/mL) y azul de nitro tetrazolio (3 mg/mL).

2.6. Ensayos de inhibición de la Actividad GST

La actividad GST canónica se realiza utilizando el sustrato universal 1-cloro-2,4-dinitrobenzono (CDNB), siguiendo la formación de su producto de conjugación a glutatión (GSH) a 340 nm en *buffer* fosfato (Habig, W. *et al.*, 1974), adaptado por Harispe L. y colaboradores 2010. Los ensayos de inhibición de dicha actividad se realizaron en placas de microtitulación a temperatura ambiente durante 20 min, utilizando el lector de microplacas FLUOstar OPTIMA. Primeramente, cada suero a analizar se incubó con la enzima recombinante durante 2 horas a 37°C. Luego se determinó la actividad enzimática residual. Las condiciones finales para cada reacción, fueron: *buffer* fosfato de potasio 100 mM, pH 6.5; suero (dilución final 1/1000); enzima 0.28 µM; GSH 4 mM; y CDNB 1 mM, en un volumen de 200 µL. En todos los casos se sustrajo el valor de la reacción espontánea.

Para el cálculo de la actividad residual se consideró como el 100% de actividad al promedio de los datos obtenidos en presencia de los sueros del grupo control inoculado con PBS. Como control de inhibición se utilizó azul de cibacrón (Harispe, L. *et al.*, 2010)

2.7. Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos se realizaron usando el software GraphPad Prism versión 6.00 para Windows, (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com) La significancia estadística entre grupos comparables fue estimada usando el test no paramétrico de Mann-Whitney, con nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

- Capítulo 3 -

Evaluación de la capacidad neutralizante de sueros policlonales anti-EgGST sobre la actividad GST *in vitro*.

3.1. Antecedentes

Como ya se ha mencionado, las GSTs son un grupo de enzimas presentes en una amplia variedad de organismos, entre ellos los helmintos. Poseen funciones de detoxificación celular así como de excreción de sustancias fisiológicas y xenobióticas. Han sido catalogadas como responsables de la resistencia a antibióticos, drogas, pesticidas y herbicidas (Cardona, G.A. y Carmena, D., 2013). Las GSTs son particularmente importantes en helmintos parásitos, donde hasta ahora, se han reportado pocas enzimas detoxificantes. Más aún, a ellas se les atribuye parte de la capacidad de estos organismos para hacer frente a los mecanismos del sistema inmune del hospedero y poder sobrevivir dentro del mismo. Por lo que, se cree que la inhibición de la actividad GST parasitaria podría ser potencialmente efectiva para limitar la supervivencia del parásito (Callahan *et al.*, 1988) y por tanto eliminar la infección.

En varias parasitosis, la protección se la ha relacionado con la participación de anticuerpos neutralizantes de algunas actividades enzimáticas. Por ejemplo, Hewitson y su equipo (2014) utilizando el modelo de infección experimental de *Brugia malayi*, mostraron que la administración de anticuerpos específicos contra una enzima parasitaria, la triosa fosfato isomerasa, brinda un grado de protección frente al desafío. Asimismo, el grupo de Veerapathran A. (2009) analizando sueros de habitantes de zonas endémicas para la filiarisis linfática vinculó la resistencia a dicha infección con la presencia de inmunoglobulinas específicas. En particular, detectaron anticuerpos contra la GST de *Wuchereria bancrofti* (WbGST) en individuos sanos y la ausencia de ellos en pacientes infectados; y además, dichos antisueros inhiben la actividad de la GST parasitaria (Veerapathran A. *et al.*, 2009). Una inhibición similar se describió para una GST del platelminto *Schistosoma bovis* (Grzych J.M. *et al.*, 1998). En estos reportes se sugiere una posible relación entre el bloqueo específico de la actividad de una enzima parasitaria por anticuerpos y la protección adquirida a la infección.

En el presente capítulo se describe la producción y purificación de las enzimas recombinantes activas, EgGST1r y EgGST2-3r, así como la generación y titulación de los

anti-sueros específicos contra las GSTs parasitarias recombinantes (EgGST1r, EgGST2r y EgGST3r). Finalmente se analiza la capacidad de los antisueros obtenidos de neutralizar la actividad glutatión transferasa (GST) convencional de las EgGSTs recombinantes.

3.2. Resultados

3.2.1. Expresión y purificación de los EgGSTs recombinantes.

Las tres proteínas parasitarias recombinantes (EgGST1r, EgGST2r y EgGST3r) se obtuvieron con un alto grado de pureza para la producción de los antisueros correspondientes. Se utilizaron varios pasos de purificación para disminuir los contaminantes con el fin de reducir las interferencias en el momento de generar la respuesta humoral, es decir, aquellas que puedan enmascarar o entorpecer la generación de anticuerpos específicos contra cada EgGST.

EgGST1r se obtuvo soluble y activa ($1.93 \pm 0.03 \text{ umol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$). La Figura 3.1 muestra una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes en el cual se exhiben algunos pasos del proceso de purificación de la misma. Luego de inducir

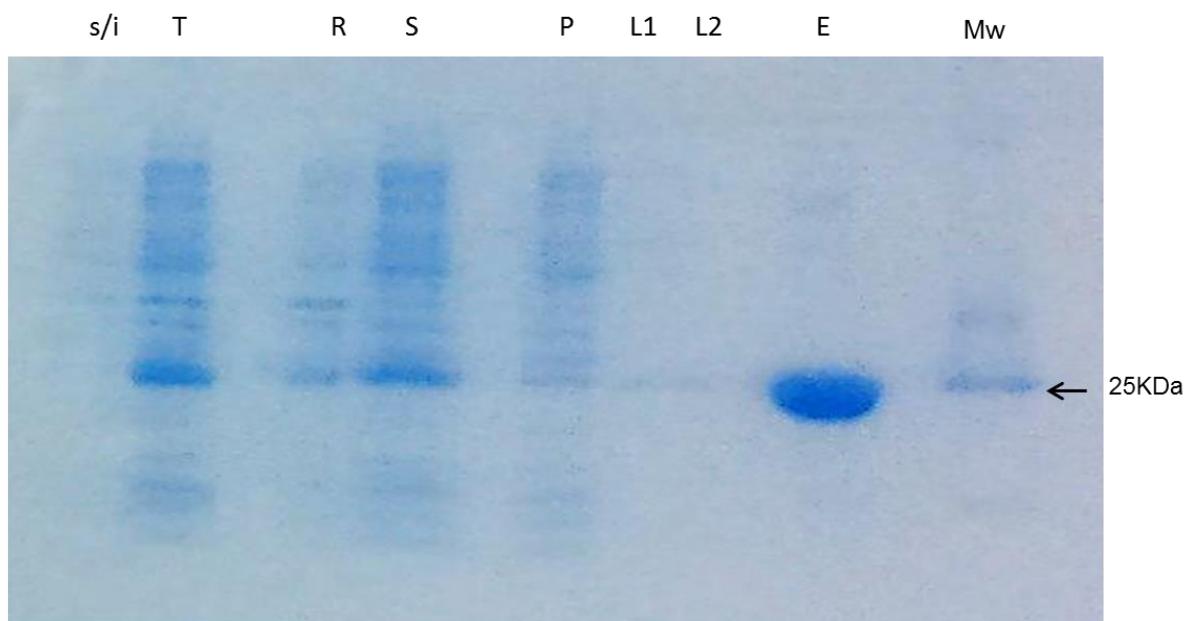


Figura 3.1: Seguimiento de la purificación de EgGST1r. PAGE-SDS 15% y tinción con Azul de Coomassie. Cada carril corresponde a un paso en la purificación de la enzima EgGST1r.: fracción de las bacterias sin inducir la expresión de la proteína (s/i), fracción total obtenida posterior a la inducción y al sonificado (T), muestra de la fracción insoluble resuspendida (R) y fracción soluble (S), alícuota del percolado (P), los dos últimos lavados (L1 y L2), elución de la columna con proteína de interés (E) (ver 2.3.2.2). Marcador de peso molecular de 25 KDa (Mw)

la expresión de la proteína recombinante, el extracto bacteriano crudo (T) exhibe una banda de aproximadamente 25 kDa, la cual coincide con la masa molecular reportada para la EgGST1 (Harispe L. *et al.*, 2010), junto con las proteínas bacterianas. La fracción soluble del extracto (S) fue cargada en una columna de afinidad de Ni-agarosa, la cual retuvo dicha proteína. La proteína eluída (EgGST1r) (E) se obtuvo con elevada pureza, fue almacenada en *buffer* fosfato 10mM (pH 6.5). El rendimiento fue de 11 mg partiendo de un cultivo de 200 mL de medio LB.

La proteína EgGST2r, fue producida y purificada en forma insoluble, en cuerpos de inclusión. La concentración de la EgGST2r se estimó por electroforesis en gel de poliacrilamida comparando con soluciones estándar de BSA de concentración conocida (Figura. 3.2). La concentración de la EgGST2r se estimó en 7.5 mg/ml. Para este trabajo,

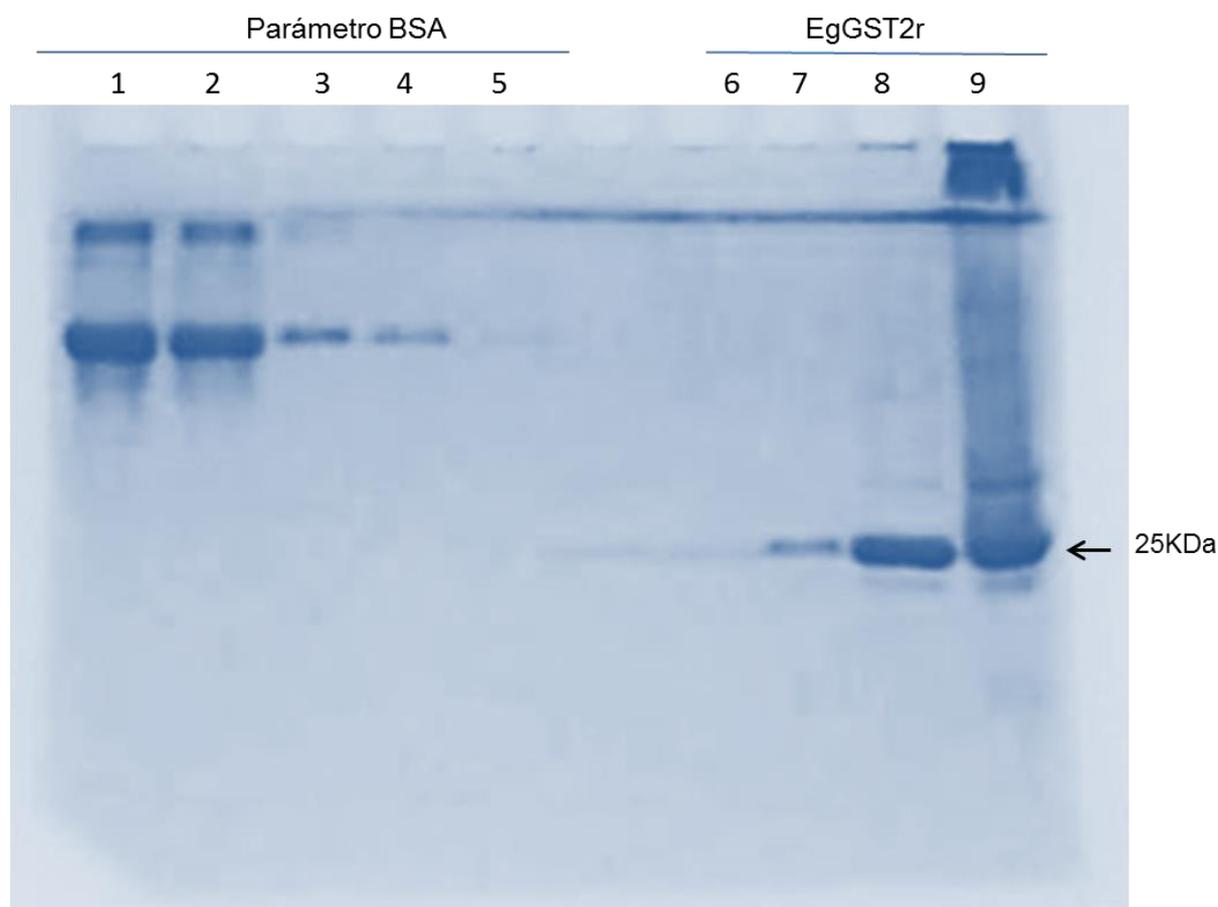


Figura 3.2: Cuantificación de EgGST2r. PAGE-SDS 15% y tinción con azul de Coomassie. Carriles 1 al 5 concentraciones del estándar BSA: 1.0, 0.5, 0.1, 0.05 y 0.01 mg/ml. Los carriles del 6 al 9 corresponden a diluciones de la proteína de interés en diluciones 1:1000, 1:100, 1:10 y 1:1 respectivamente. La flecha indica peso molecular de 25 KDa (Mw)

se disponía de un lote de EgGST3r previamente preparado con la misma metodología donde la concentración se estimó (por la misma metodología) en 6 mg/mL.

La EgGST2-3r se obtuvo soluble y activa ($0.91 \pm 0.02 \text{ umol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$). La Figura 3.3 muestra una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes en la cual se ilustra cada paso del proceso de purificación de la enzima recombinante. Luego de inducir la expresión de la proteína recombinante, el extracto bacteriano crudo (T) muestra una prominente banda de aproximadamente 25 kDa (que está de acuerdo a su masa molecular esperada para ambos monómeros), junto con proteínas bacterianas. La fracción soluble del extracto (S) fue cargada en una columna de afinidad de Ni-agarosa, la cual removió la banda de 25 KDa del extracto soluble, que después eluyó (E) con una alta pureza. Luego de completar el proceso con gel filtración, se obtuvo un rendimiento de 4,5 mg de EgGST2-3r a partir de un cultivo de 600 mL. Posteriormente se verificó utilizando antiseros específicos que la proteína eluída se compone de EgGST2r y EgGST3r (Figura 3.4 C).

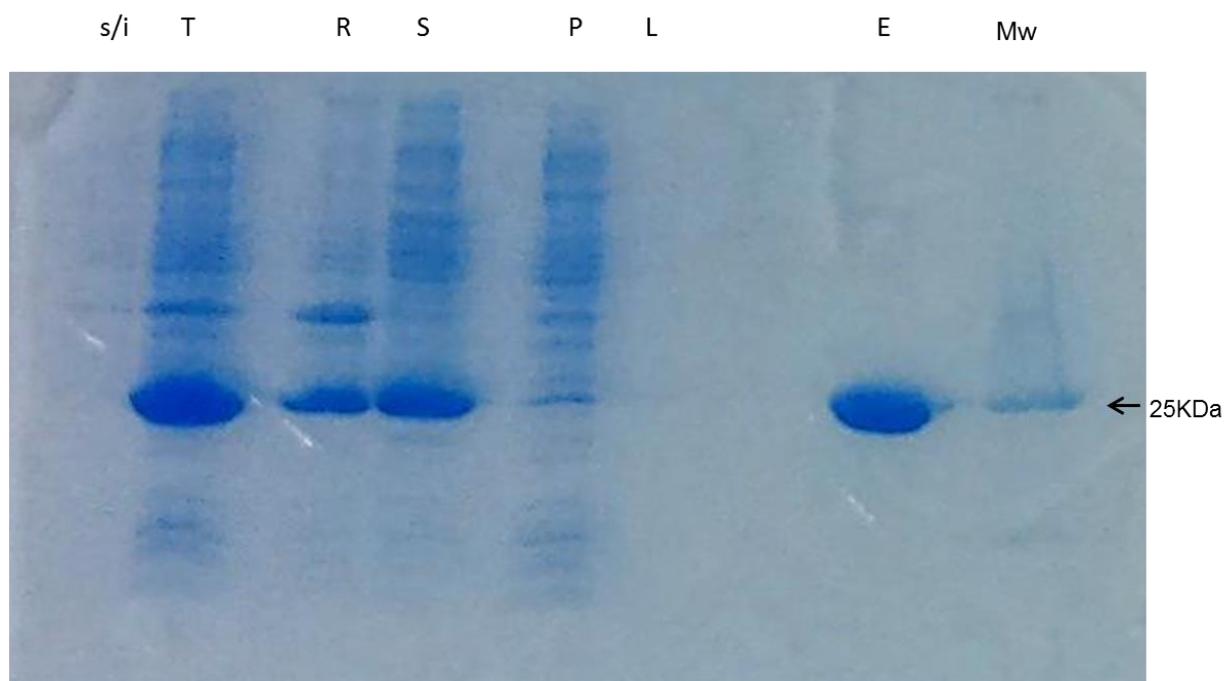


Figura 3.3: Seguimiento de la purificación del heterodímero EgGST2-3r. Carriles: bacterias sin inducir la expresión de las proteínas (s/i), fracción total obtenida posterior a la inducción y al sonicado (T), fracción insoluble resuspendida (R) y fracción soluble (S), percolado (P) del pasaje por columna de afinidad y el último lavado (L) de la misma, muestra de la elución de la columna (E), proteína de interés. Mw corresponde al peso molecular de 25KDa.

3.2.2. Obtención y caracterización de antisueros específicos contra las GSTs parasitarias recombinantes.

Como ya se mencionó, uno de los objetivos de este trabajo es evaluar la capacidad neutralizante de la actividad GST por parte de antisueros específicos contra las EgGSTs. Para la obtención de dichos antisueros, se inmunizaron ratones con la enzima EgGST1r o las fracciones enriquecidas en cuerpos de inclusión con EgGST2r o EgGST3r, utilizando alúmina como adyuvante. Se evaluó la calidad y especificidad de los antisueros, enfrentando un *pool* de cada grupo (diluído 1/1000) a las proteínas recombinantes por *Western-blot*. Así, se verificó que los sueros de los grupos inoculados solo con PBS o PBS/alúmina, no reaccionaron con ninguna de las EgGSTs (Figura 3.4, A). Por otro lado, cada antisuero reconoce la EgGSTr para la cual fue generado y no presenta reactividad cruzada, a la dilución de trabajo, con las otras GSTs recombinantes de *E. granulosus*. La

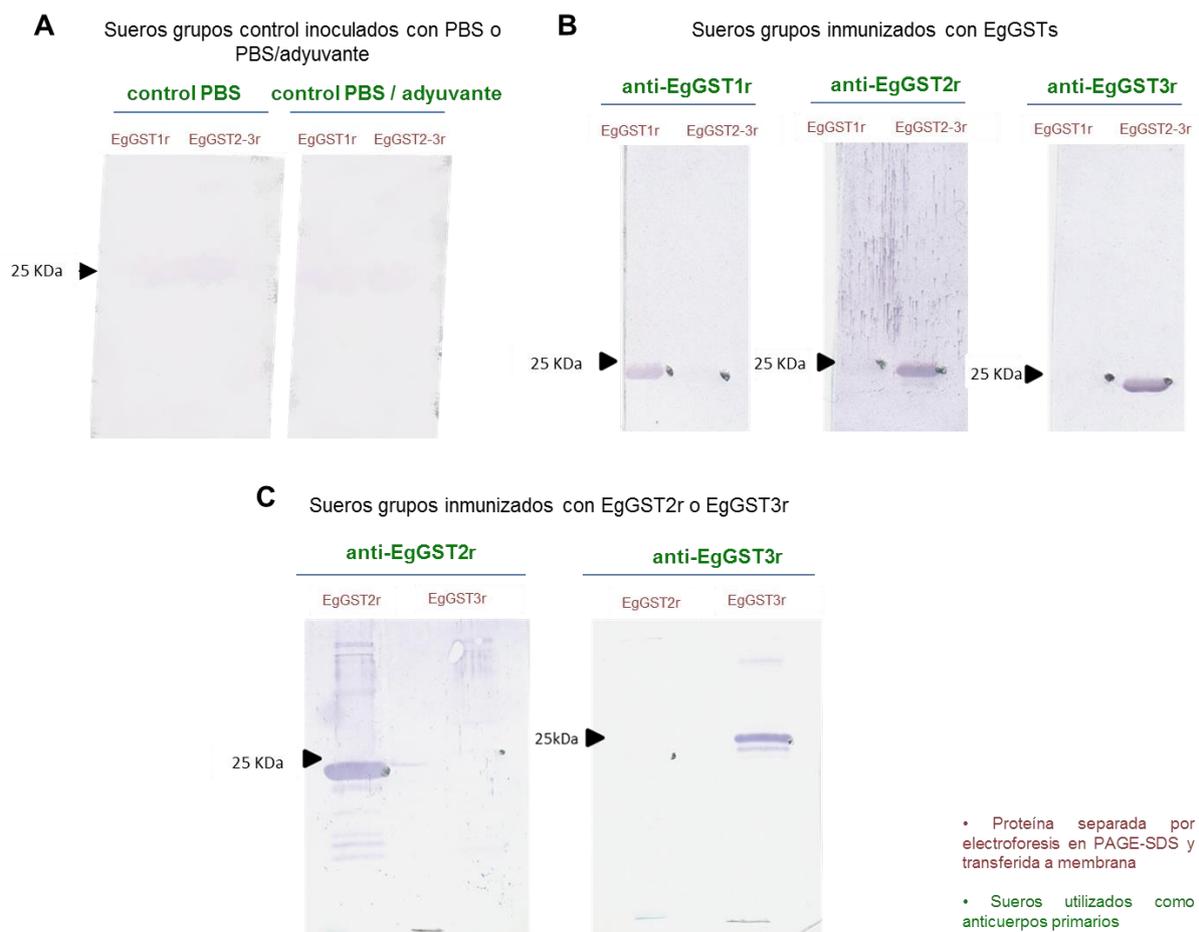


Figura 3.4: Reactividad de los anti sueros obtenidos por *Western-blot*. Se analizaron los sueros de los animales inoculados (A) con PBS (Control PBS) o con PBS alúmina (control PBS/adyuvante) y (B y C) con cada EgGST recombinante en alúmina (anti-EgGST1r, anti-EgGST2r o anti-EgGST3r). Los sueros se enfrentaron a EgGST1r y a EgGST2-3r (A y B), o a EgGST2r y a EgGST3r (C).

Figura 3.4, B muestra que el *pool* de sueros de los ratones inoculados con la EgGST1r reconocen de exclusivamente a EgGST1r y de igual modo, los sueros de los grupos inmunizados a con EgGST2r y EgGST3r reconocen diferencialmente al heterodímero EgGST2-3r. Por último, los sueros anti-EgGST2r detectan exclusivamente a la proteína EgGST2r así como los sueros anti-EgGST3r reaccionan únicamente con la proteína EgGST3r (Figura 3.4, C). En este último caso, se observa reactividad contra algunas bandas secundarias, las cuales podrían corresponder a proteínas bacterianas presentes en la fracción de cuerpos de inclusión con la que los animales fueron inmunizados y/o productos de degradación de las proteínas recombinantes. Esta hipótesis se basa en que dichas bandas están ausentes cuando los antisueros se enfrentan a EgGST2-3r, que presenta un mayor grado de pureza (Figura 3.4, B).

Una vez confirmada la especificidad de los antisueros, se evaluaron por ELISA, los niveles de anticuerpos específicos para cada una de las EgGSTs, en las muestras individuales de los animales inmunizados. Los resultados obtenidos indican que el grupo inmunizado con EgGST1r desarrolló un alto título de anticuerpos, mientras que la respuesta fue moderada y pobre, para EgGST3 y a EgGST2 respectivamente (Tabla 3.1). No se detectaron anticuerpos específicos contra las EgGSTs en los grupos control.

Tabla 3.1: Título de anticuerpos de los sueros extraídos a día 43.

Grupo inoculado	Título: Mediana y rango (min/máx)	
	anti-GST1r ^a	anti-GST2-3r ^b
EgGST1r	1,801 (1,53/2,053)	nd
EgGST2r	nd	0,050 (0/0,103)
EgGST3r	nd	0,743 (0,242/1,933)

^a. valor de corte 0,012

^b. valor de corte 0,019

nd. No determinado

3.2.3. Evaluación de la capacidad neutralizante de la actividad GST mediada por los sueros anti-EgGSTr.

Para evaluar si los anticuerpos específicos generados contra las diferentes GSTs parasitarias de *E. granulosus* afectan la actividad GST, se ensayó la actividad GST en presencia de los antisueros.

En primer lugar se determinó el efecto de la concentración del suero sobre la actividad de las enzimas. Para esto se determinó la actividad GST (ver 2.6) en presencia de mezclas (*pool*) de los sueros de los grupos control a tres diluciones: 1/10, 1/100 y 1/1000 en PBS. Tomando como 100% la actividad obtenida en ausencia de sueros, los resultados obtenidos mostraron que la actividad GST no se ve modificada en presencia de los sueros a una dilución 1/1000 (figura 3.6).

Seguidamente, se evaluó la capacidad neutralizante de los antisueros individualmente, sobre la actividad GST las enzimas recombinantes. Se tomó como 100% de la actividad a los datos obtenidos utilizando los sueros del grupo de animales control inoculado con PBS estéril sin adyuvante. Los resultados mostraron que ninguno de los antisueros logró abolir la actividad GST de las enzimas recombinantes (figura 3.7). Sin embargo, si se compara con los ensayos donde se utilizaron sueros de animales inoculados con Alúmina en PBS, se observó una tendencia a la disminución en la actividad GST remanente para los sueros anti-EgGST1 enfrentados a EgGST1r, y una disminución significativa ($p < 0.005$) por parte de los sueros anti-EgGST2 enfrentados a EgGST2-3r. Los sueros anti-EgGST3 no mostraron diferencias respecto a los sueros control sobre la actividad GST de EgGST2-3r (figura 3.7).

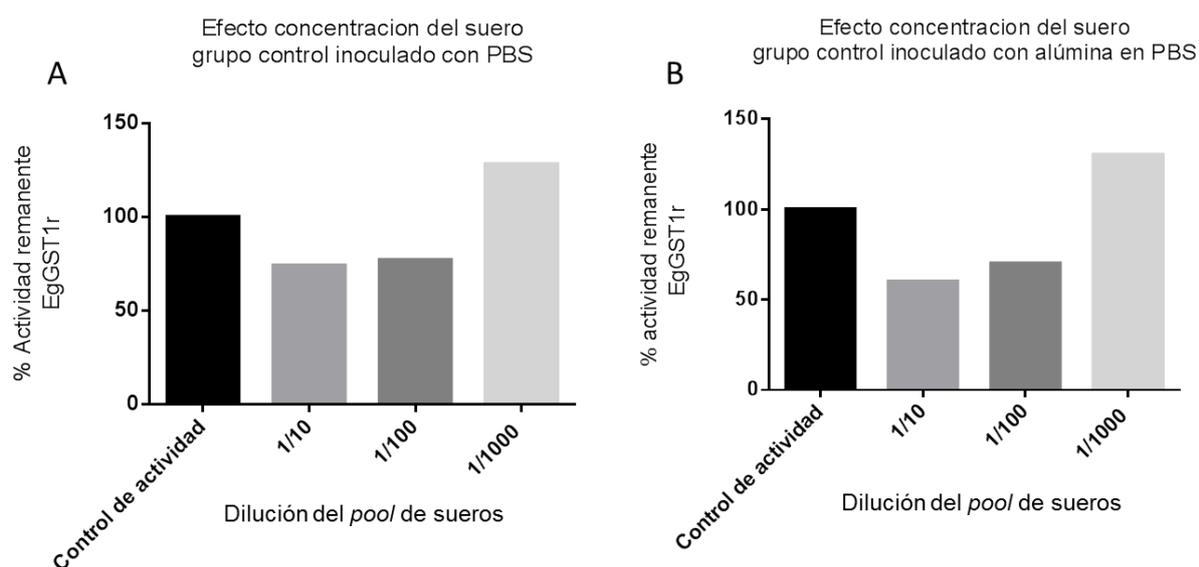


Figura 3.6: Efecto de la concentración del suero en la actividad enzimática EgGST1r. Se utilizaron *poles* de los sueros procedentes de los grupos control, los cuales se diluyeron en PBS y se incubaron junto con la enzima EgGST1r a 37°C por dos horas. El control (actividad al 100%) corresponde a la actividad de la enzima con el mismo tratamiento sin suero.

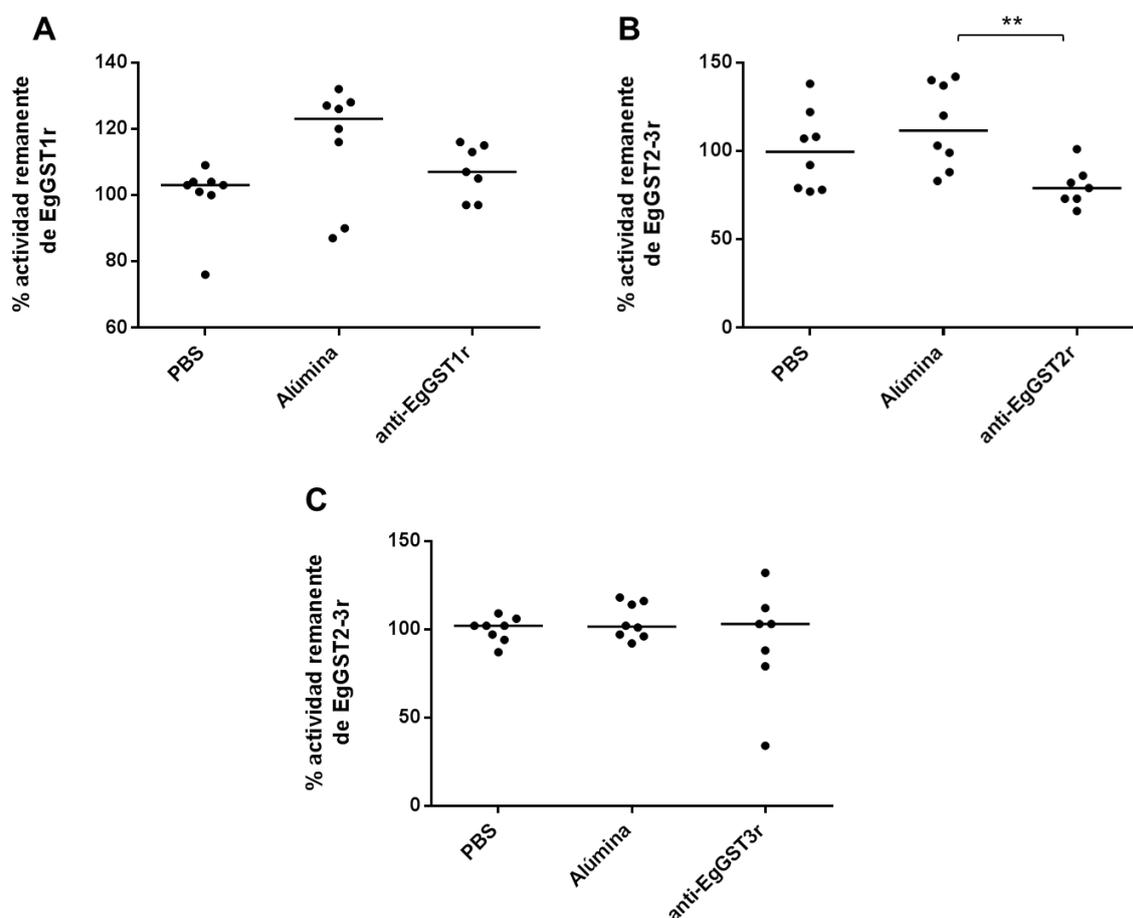


Figura 3.7: Porcentajes de actividades remanentes. Cada punto representa el porcentaje de actividad remanente de la actividad glutatión transferasa, de cada antisuero, para las diferentes GSTs parasitarias, EgGST1r (A), EgGST2-3r (B y C), las cuales fueron previamente incubadas con los sueros específicos generados contra cada subunidad. La barra representa la mediana.

Nota:

PBS, sueros de los animales inoculados con PBS estéril.; Alúmina, sueros de animales inoculados con PBS al medio en alúmina.; Anti-EgGSTx, sueros de animales inmunizados con la proteína especificada en alúmina.

(**) Test Mann-Whitney, p valor < 0,005

3.3. Conclusiones

En este capítulo se mostró una inhibición significativa de la actividad canónica GST de la enzima recombinante EgGST2-3, por los anti-sueros contra EgGST2r, pero no por los sueros anti-EgGST3r, ni de la actividad de EgGST1r por los antisueros para la misma. Esto indica que la actividad canónica GST de la enzima EgGST2-3r únicamente se afecta por los anticuerpos anti-EgGST2r. A su vez, como éstos se encuentran en muy baja concentración, sugiere que los anticuerpos generados por los ratones inmunizados con el antígeno recombinante EgGST2r son altamente eficientes para esta función.

- Capítulo 4 -

Evaluación *in vivo* de la capacidad protectora de las GSTs parasitarias frente a la infección por *Echinococcus granulosus*.

4.1. Antecedentes

En la búsqueda de antígenos con potencial capacidad de protección frente a infecciones helmínticas las enzimas detoxificantes glutatión transferasas (GST) han surgido como posibles candidatos vacunales. La neutralización del efecto de dichas moléculas podría afectar la capacidad del parásito de sobrevivir en el hospedero. Se ha establecido un rol protector de los anticuerpos anti GST frente a la infección por helmintos parásitos como *Schistosoma*, *Fasciola*, *Wuchereria bancrofti* y *Seteria cervi* (Morrison, C.A. *et al.*, 1996; Grezel, D., *et al.*, 1993; Sexton, J.L., *et al.*, 1990; Gupta, S., *et al.*, 2005; Veerapathran, A., *et al.*, 2009).

En el caso de la filariasis linfática, enfermedad causada por el nematodo *Wuchereria bancrofti*, se ha comprobado que meriones inoculados con la enzima parasitaria fosfato isomerasa recombinante (Hewitson, J.P. *et al.*, 2014), así como meriones tratados con WbGSTr (Veerapathran *et al.*, 2009) adquieren cierta protección contra el establecimiento de la infección (60-70% y 61% respectivamente). Más aún, existen estudios relacionados a platelmintos, específicamente en trematodos. Por ejemplo, se ha descrito un grado de protección tanto contra *Fasciola hepatica*, en ganado inmunizado con FhGSTr en QuilA/SM (69%) (Morrison, C.A. *et al.*, 1996) como en ratones contra *F. gigantica* al inocularlos con FgGST26r (77-84%) (Preyavichyapugdee, N. *et al.*, 2008). Asimismo, se ha reportado la reducción del número de gusanos de *Schistosoma mansoni* al tratar roedores con FgGST26r (Preyavichyapugdee, N. *et al.*, 2008) o con SmGSTr (Rao K.V.N. *et al.*, 2003) (55-58% y 30% respectivamente) y en el número de parásitos en infecciones por *S. japonica* cuando se administra el antígeno Sj23LHD-GST de modo oral (Chen G. *et al.*, 2011). Los datos obtenidos por Grzych J.M. y su grupo de investigación (1998), revelan una reducción en la cantidad de huevos excretados en ovinos inmunizados con Sb28GSTr previo al desafío natural con *S. bovis*. Asimismo, se ha descrito una reducción del número de quistes viables de *Taenia multiceps*, en ovejas tratadas con dos diferentes antígenos recombinantes Tm16 y Tm18, los cuales pertenecen a las familias de proteínas llamadas 16k y 18k respectivamente, descritas en oncósferas de varias especies de *Taenias* (Gauci C. *et al.*, 2008). Como antecedentes en la infección por *E.*

granulosus, el equipo de Woollard D.J. (2001), obtuvo una protección contra primaria del 98,7% en ovejas suministrando el antígeno EG95 de modo subcutáneo.

Entender las implicaciones de las enzimas GSTs parasitarias en los helmintos contribuye a ampliar el conocimiento de la biología de la infección. En este capítulo se describe el efecto de la inmunización previa con las diferentes GSTs de *E. granulosus*, en la infección por el parásito, utilizando el modelo hidatidosis secundaria murino.

4.2. Resultados.

4.2.1. Inmunización de ratones y desafío contra *E. granulosus*.

El modelo de infección secundaria ofrece un ambiente complejo, en el cual se puede estudiar la interacción hospedero parásito en la infección. Por ejemplo, se puede inferir el efecto de la inmunización previa al desafío, con las GST parasitarias recombinantes, en el establecimiento o desarrollo del parásito a través del número o masa parasitaria respectivamente.

Para evaluar la capacidad protectora de la inmunización contra las enzimas parasitarias se realizaron ensayos de inmunización/desafío. Se utilizaron siete grupos de ratones Balb/c hembras vírgenes, cuatro de los cuales fueron inmunizadas con los diferentes GSTs parasitarias en alúmina en forma individual: EgGST1r, EgGST2r, EgGST3r, y con las tres combinadas en la misma preparación EgGST(1+2+3)r. Como control se emplearon los grupos inoculados con lisado de *E. coli* BL21 en alúmina, con PBS en alúmina y con PBS (ver materiales y métodos). Luego de las dos inmunizaciones se determinó el título de anticuerpos específicos por ELISA. Como en el caso de los grupos de ratones inmunizados en el capítulo anterior, se observó un alto título contra EgGST1 seguido de un título bastante menor para EgGST3 (Tabla 4.1). Frente a EgGST2 se observó una respuesta de anticuerpos específicos muy pobre, donde el título de anticuerpos específicos, dada la definición de *cutoff* (ver Materiales y métodos, 2.4.3), se considera no detectable. En el grupo inmunizado con las tres EgGSTs, se observó inmuno-dominancia por parte de la EgGST1 y no detectándose anticuerpos específicos contra el heterodímero EgGST2-3 (Tabla 4.1). No se detectó anticuerpos que reaccionaran contra las EgGSTs en los sueros de los grupos control.

Tabla 4.1: Título de anticuerpos específicos de los sueros y porcentajes de animales infectados luego de ser enfrentados a la infección secundaria de *E. granulosus* de modo experimental.

Grupo inoculado	Título: Mediana y rango (mín/máx)		% Infectados (ratones infectados/total)
	anti-GST1r ^a	anti-GST23r ^b	
PBS	*	*	88% (7/8)
Adyuvante	*	*	75% (6/8)
Lisado bacteriano	*	*	60% (3/5)
EgGST1r	1,668 (1,53/2,053)	nd	14% (1/7)
EgGST2r	nd	ND	57% (4/7)
EgGST3r	nd	0,371 (0,091/0,910)	67% (4/6)
EgGST(1+2+3)r	1,295 (1,024/1,466)	ND	86% (6/7)

nd. No determinado

ND. No detectado

*. Valores utilizados para hallar el punto de corte para cada sistema

a. punto de corte 0.152

b. punto de corte 0.294

4.2.2. Análisis de la capacidad protectora de las EgGSTs recombinantes contra la infección secundaria de *E. granulosus*.

El desafío con protoescoléx de *E. granulosus* fue realizado a los cuatro meses de la segunda inmunización. Se inocularon 2000 protoescoléx por vía intraperitoneal. Se permitió que la infección se desarrollara por espacio de nueve meses, y luego se sacrificaron los animales y se recuperaron los quistes desarrollados.

Para evaluar el desarrollo y grado de la infección se establecieron los siguientes parámetros a medir: el porcentaje de infección (número de ratones infectados y número de quistes por individuo) así como el desarrollo de la misma (tamaño o masa de los quistes por animal).

Los resultados mostraron que los ratones inoculados con la EgGST1r presentaron un porcentaje infección de 14% (Tabla 4.1), notoriamente inferior al del grupo control inoculado con PBS/alúmina. Los grupos tratados con EgGST2r y EgGST3r si bien

presentan porcentajes de infección menores al del grupo PBS/alúmina, la diferencia es muy pequeña. El porcentaje de infección se recupera en el grupo inmunizado con la combinación de las tres EgGSTs (EgGST(1+2+3)r) resultando una tasa de infección similar al observado en el grupo PBS, diferenciándose ampliamente de las observados con el tratamiento individual con las GSTs parasitarias. Se aprecia una disminución en el número de animales infectados en el grupo tratado con un lisado de bacterias *E. coli*-BL21, similar al observado para las EgGSTs 2 y 3.

En cuanto a la carga parasitaria medida como el volumen total así como el número de quistes desarrollados, se observa una disminución significativa en el grupo inmunizado previamente con EgGST1. Cabe destacar que en este grupo solo se desarrollaron dos quistes en un único individuo. Asimismo, si bien no es significativa, se aprecia una disminución en la carga parasitaria en el grupo tratado con EgGST2, frente al grupo control PBS/alúmina (figura 4.2).

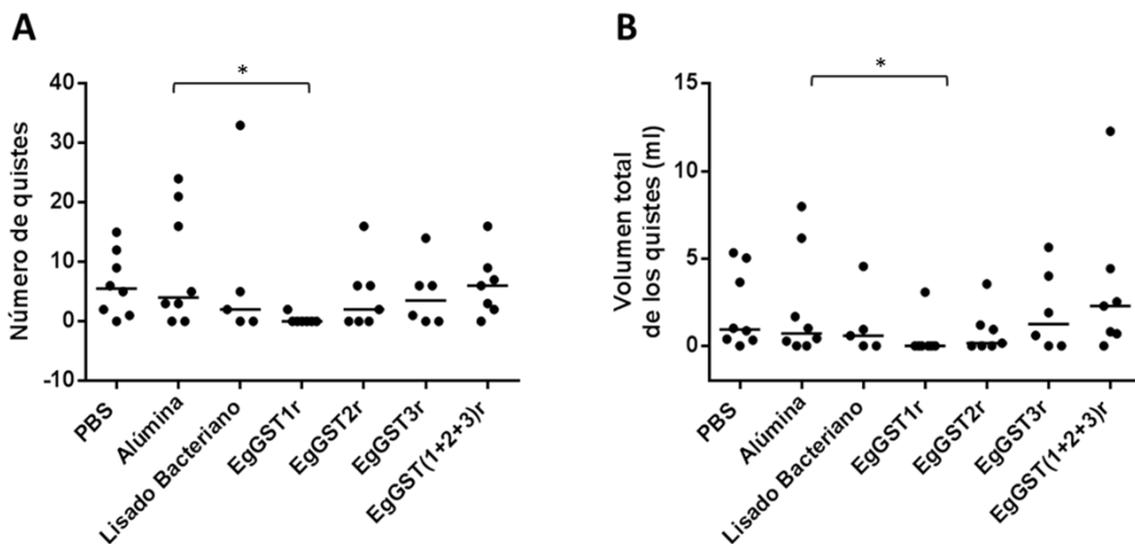


Figura 4.2: Resultados de los parámetros observados para la infección secundaria. Cada punto representa por ratón el número de quistes (A), el volumen (B). La barra representa la mediana de los valores del grupo.

Grupos inoculados: PBS solo (PBS), PBS en alúmina (alúmina), lisado bacteriano en alúmina (lisado bacteriano), antígeno EgGST1r en alúmina (EgGST1r), antígeno EgGST2r en alúmina (EgGST2r), antígeno EgGST3r en alúmina (EgGST3r), conjuntamente con los tres antígenos (EgGST1r, EgGST2r y EgGST3r) en alúmina (EgGST(1+2+3)r)

(*) Test Mann-Whitney, p valor < 0,05

Al analizar los patrones de distribución de tamaños de los quistes, clasificando los mismos según su volumen en tres categorías: pequeños (< 0.5 mL), medianos (0.5–1 mL) y grandes (>1 mL) se observa que si bien el número de quistes analizados para los

ratones tratados con EgGST2 y EgGST3 es similar (Figura 4.2 A), la distribución de tamaños de la misa es diferente. En el caso de los ratones inmunizados con EgGST3 desarrollaron más quistes de tamaño medio, siendo que en los inmunizados con EgGST2 el 100% de los quistes fueron pequeños (Figura 4.3). Los controles desarrollaron

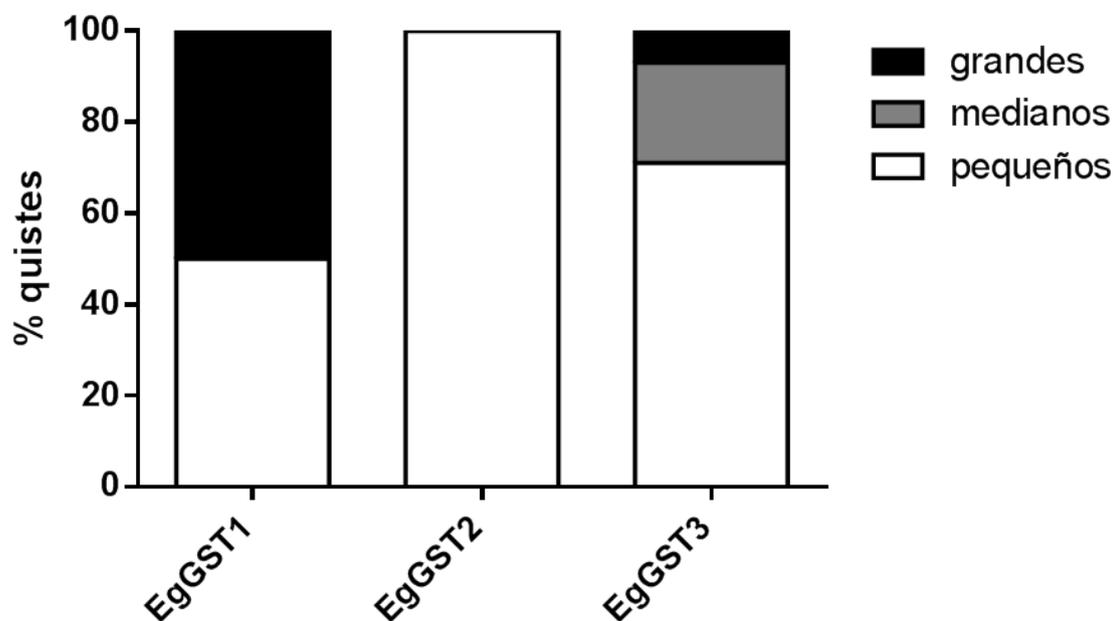


Figura 4.3: Porcentaje total de los quistes obtenidos por grupo en función a su volumen. Quistes pequeños volumen < 0.5 mL, medianos volumen 0.5 – 1.0 mL, grandes volumen > 1.0 mL.

mayoritariamente quistes pequeños pero en mayor número que en los grupos tratados con las GSTs recombinantes. Vale la pena mencionar que, los grupos inoculados con EgGST1r, EgGST2r y EgGST3r desarrollaron menos de 30 quistes cada uno, en cambio los grupos control desarrollaron 40 o más quistes, donde los pequeños representaron un 95% para los inmunizados con lisado bacteriano y un 82% tanto para inmunizados con PBS-Alúmina como con PBS solo.

4.3. Conclusiones

Se determinó el grado de la capacidad protectora contra infecciones secundarias por el parásito *E. granulosus* del antígeno EgGST1r (llegando a un valor del 86%) lo que lo convierte en un blanco potencial en el desarrollo futuro de vacunas contra dicho parásito. A su vez, de los datos generados, no se descarta la utilización de EgGST2 y EgGST3 como posibles antígenos vacunales debido a la tendencia a la disminución en la

tasa de infección de animales tratados con dichos antígenos y en particular, a que se aprecia un sesgo a la disminución en la carga parasitaria y del tamaño de los quistes en el grupo tratado con EgGST2.

– Capítulo 5 –

Discusión

Las glutatión transferasas han sido extensamente estudiadas como candidatos vacunales contra diferentes infecciones parasitarias (Grzych, J.M., et al., 1998; Rao, K.V.N. et al., 2003; Preyavichyapugdee, N. et al., 2008; Zhang, W. y McManus, P., 2008; Veerapathran, A., et al., 2009). En este trabajo se describe un primer estudio de las GSTs de *E. granulosus* como posibles candidatos vacunales en el modelo de infección secundaria murino.

Nuestros resultados muestran que si bien los anticuerpos generados contra EgGST1 no son neutralizantes de la actividad GST, la inmunización con EgGST1 confiere una protección significativa frente a la infección secundaria con *E. granulosus*. Por otro lado, se observó que los anticuerpos generados contra EgGST2, aunque en títulos menores a los desarrollados contra las otras GSTs parasitarias, si fueron capaces de inhibir la actividad GST. Si bien los mismos no confirieron protección significativa frente al establecimiento del parásito, parecen afectar el desarrollo de los quistes en el ratón. En cuanto a los sueros específicos contra EgGST3, no mostraron inhibir la actividad canónica ni parece afectar el establecimiento o desarrollo del parásito en el hospedero, a pesar a que los títulos de anticuerpos obtenidos fueron intermedios, superiores a los de EgGST2 pero menores a los obtenidos para EgGST1.

Las GSTs parasitarias participan en muchos procesos principalmente los relacionados con detoxificación (Torres-Rivera, A. y Landa, A., 2007; Board, P.G. y Menon, D., 2013). Se las identifica con la catálisis de la reacción de unión del glutatión (GSH), presente en las células, con un electrófilo hidrofóbico. Los compuestos conjugados al GSH son más fáciles de excretar ya que aumentan su solubilidad en medio acuoso y adquieren mayor inocuidad (menor reactividad) (Frova, C., 2006). Este tipo de reacción detoxificante incluye la eliminación de productos tóxicos generados en el metabolismo del propio parásito, así como de los elementos oxidantes producidos por el hospedero en respuesta a la infección (Wilce, M.C.J y Parker, M.W., 1994). Por otro lado, se han relacionado a las GSTs parasitarias también con la síntesis de compuestos inmunomoduladores, más precisamente prostaglandinas (revisado por Arbildi, P. 2011). Asimismo, se ha descrito que pueden catalizar reacciones de isomerización de esteroides, y que participan en diversos procesos, por ejemplo, en la vía de degradación de la tirosina y de la fenilalanina, en la protección de proteínas ante el estrés oxidativo

mediante la glutationilación de las mismas, en la regulación de las vías de señalización celular y en la formación y regulación de canales iónicos (Board, P.G. y Menon, D., 2013).

Dada la compleja red de funciones que estas enzimas despliegan, la falta de inhibición de la actividad GST evaluada a través de la reacción canónica de conjugación al CDNB como es el caso para EgGST1 sugiere que su importante capacidad protectora pueda deberse a inhibición de alguna otra actividad enzimática. EgGST1 además de catalizar la conjugación del GSH a componentes electrófilos, reduce hidroperóxidos a alcoholes y elimina carbonilos reactivos (conjugándolos a GSH) (Harispe, L. et al, 2010). Sería interesante analizar si alguna de estas funciones enzimáticas está siendo inhibida por los anticuerpos específicos generados en el modelo murino. Por otro lado, la falta de inhibición de la actividad de EgGST1 podría deberse a la forma en que se estructura el sitio de unión a glutatión. En este sentido, se ha descrito que el surco donde se encuentra la unión al glutatión en las enzimas GST-Mu es profundo (Board, P.G., et al, 2000). Esta característica estructural, podría estar impidiendo que se generen anticuerpos específicos contra el sitio catalítico de EgGST1, descrita como Mu (Harispe et al 2010).

Por otro lado, EgGST1 es la isoforma más expresada en protoescoléx (Arbildi, P. 2013), y se localiza en su tegumento (La-Rocca S, 2014), el cual al descamarse, puede permitir que dicha GST se libere en la interface parásito-hospedero (revisado por La-Rocca S., 2014). En este sentido, EgGST1 se encontró en los productos de excreción/secreción de protoescoléx en cultivo y en líquido hidático (La-Rocca S., 2014). Esto sugiere que el sistema inmune del hospedero, tiene acceso a dichos antígenos aún cuando el parásito es viable, por lo que, los anticuerpos anti-GST podrían mediar la protección frente al establecimiento del parásito en forma independiente a la neutralización de cualquier actividad catalítica de dicha enzima. En este contexto, Veerapathran A. et al (2009), mostraron que los anticuerpos anti-GST de *W. bancrofti* median la muerte de larvas de *B. malayi* en ensayos de ADCC *in vitro*. El hecho que la proteína EgGST1 esté en la interfase de contacto entre el parásito y el hospedero (La-Rocca S., 2014), es decir, que es accesible para la interacción con los anticuerpos específicos, podría habilitar los mecanismos de acción de los eosinófilos (con o sin la participación de mastocitos) y brindar protección frente a la hidatidosis secundaria. Sería interesante realizar ensayos de ADCC empleando sueros anti-EgGST1, protoescoléx y eosinófilos, así como los controles necesarios, para determinar la implicancia de este mecanismo en la protección.

La inmunización con EgGST2r no produjo una disminución significativa de la tasa de infección luego del desafío. Sin embargo, es interesante que el 100% de los quistes recuperados fueron pequeños (tamaño menor a 0.5 mL) y que los sueros conteniendo anticuerpos contra EgGST2r fueron capaces de neutralizar parcialmente la actividad GST a pesar de tener un muy bajo título. La proteína EgGST2, se localizó en el tegumento de protoescólex así como en sus productos de excreción/secreción en cultivo (La-Rocca S., 2014) y está filogenéticamente relacionada a las GSTs de clase Sigma de parásitos helmintos (Iriarte A. et al., 2012). Dicha clase de enzimas clásicamente se han mostrado pobres en cuanto a las actividades relacionadas a la detoxificación, y se las posiciona como catalizadoras de la vía de síntesis de prostaglandinas (Flanagan J.U. y Smythe M.L., 2011). En schistosomiasis se ha mostrado que la GST-Si del helminto se secreta al medio que rodea al parásito y sintetiza prostaglandina D2 que relacionaron con la inhibición de la maduración de las células de Langerhans del hospedero (Angeli, V. et al 2001). Por otro lado, para *Fasciola hepatica* se ha descrito que FhGSTsi recombinante altera la función de las células dendríticas (CD) y los macrófagos, concretamente los diferencia hacia un fenotipo de tipo 2, atenuando el desarrollo de una respuesta tipo Th17 (LaCourse E.J., 2012). Aunque no se ha demostrado que el efecto inmunomodulador es debido a la actividad prostaglandina sintasa de FhGSTsi, se observó que la GST de clase Mu del mismo parásito no induce dicho fenotipo supresor de las CD (Dowling D.J. et al, 2010). Tomando en cuenta toda esta información se podría pensar que los anticuerpos anti-EgGST2 podrían afectar la actividad de dicha enzima parasitaria en el medio que rodea al parásito durante la infección. De este modo, el hospedero generaría una respuesta inmune contra el parásito diferente a los controles de infección, que impediría el crecimiento de los quistes.

Por último, la proteína EgGST3 está ampliamente expresada en el tegumento y las ventosas del protoescólex (La Rocca 2014) pero se desconoce sus propiedades. Posee características moleculares similares a las GST de clase Sigma, especialmente en el dominio C-terminal, lo que se cree que permite que forme el dímero activo con la EgGST2 (La-Rocca S., 2014). Así como también muestra características compartidas con las de clase Omega, en particular su dominio N-terminal comparte gran similitud con el sitio de unión a GSH de dichas GSTs (Iriarte A. et al., 2012), por lo que podría presentar las funciones propias de la clase Omega. El grupo de animales inoculados con la proteína EgGST3r presentó títulos apreciables de anticuerpos específicos, pero no se observó protección significativa en el modelo de hidatidosis secundaria. Por lo que se podría

pensar que dichos anticuerpos no modificarían la actividad catalítica de dicha enzima, permitiendo en gran medida, la infección.

De los resultados de este trabajo se puede inferir que la capacidad de conferir protección frente al establecimiento del parásito no estaría directamente relacionada a la capacidad neutralizante de la actividad GST, ni al título generado en el hospedero. Queda por evaluar los isotipos de anticuerpos generados en cada caso así como dilucidar qué mecanismos, activados por dichos anticuerpos, podrían estar interfiriendo con el establecimiento y/o desarrollo del parásito en el hospedero.

BIBLIOGRAFÍA

- Aribildi, P.; La-Rocca, S. y Fernandez, V.; 2011; "4. Glutathiones transferases in helminth parasites". Esteves, Adriana, ed; 2011;"Research in helminths" Pulished by Transworld Research Network. Pp 57-72.
- Arbildi, P.; 2013; "Glutathiones transferasas en *Echinococcus granulosus*: identificación, estudios cinéticos y de expresión". Tesis de Maestría PEDECIBA-Química Facultad de Química.
- Angeli, V.; Faveeuw, C.; Roye, O.; Fontaine, J.; Teissier, E.; Capron, A.; Woloczek, I.; Capron, M. y Trottein F.; 2001; "Role of the parasite-derived prostaglandin D2 in the inhibition of epidermal Langerhans cell migration during schistosomiasis infection" J Exp Med. 193: 1135-1147.
- Barnes, T.S.; Deplazes P.; Gottstein, B.; Jenkins, D.J.; Mathis, A.; Siles-Lucas, M.; Torgerson, P.R.; Ziadinov, I. y Heath, D.D.; 2012; "Challenges for diagnosis and control of cystic hydatid disease" Acta Trop., 123: 1-7.
- Baz, A.; Carol, H.; Marco, M; Casabo, L.; Jones, F.; Dunne, D. y Nieto, A.; 1998; "Fc-binding molecules specific for human IgG1 and IgG3 are present in *Echinococcus granulosus* protoscoleces"; Parasite Immunol., 20: 399-404.
- Bethony, J.M.; Cole, R.N.; Guo, X.; Kamhawi, S.; Lightowers, M.W.; Loukas, A.; Petri, W.; Reed, S.; Valenzuela, J.G. y Hotez, P.J.; 2011; "Vaccines to combat the neglected tropical diseases". Immunol. Rev., 239: 237-270
- Board, P.G. y Menon, D.; 2013; "Glutathione transferasas, regulator of cellular metabolism and physiology". Biochim Biophys Acta. 1830: 3267-3288.
- Board, P.G.; Coggan, M.; Chelvanayagam, G.; Easteal, S.; Jermiin, L.S.; Schulte, G.K.; Danley, D.E.; Hoth, L.R.; Griffor, M.C.; Kamath, A.V.; Rosner, M.H.; Crunyk, B.A.; Perregaux, D.E.; Gabel, C.A.; Geoghegan, K.F.; y Pandit, J.; 2000; "Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferasas" J Biol. Chem., 275: 24798-24806.
- Bradford, M.M.; 1976; "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal. Biochem., 72: 248-254.
- Callahan, H.L.; Crouch, R.K. y James, E.R.; 1988; "Helminth antioxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants". Parasitol. Today, 4: 218-225.
- Carabin, H.; Budke, C.M.; Cowan, L.D.; Willingham, A.L. 3rd y Torgerson, P.R.; 2005; "Methods for assessing the burden of parasitic zoonoses: echinococcosis and cysticercosis" Trends Parasitol., 21: 327-333.
- Cardona, G.A. y Carmena, D.; 2013; "A review of the global prevalence, molecular epidemiology and economics of cystic echinococcosis in production animals". Vet. Parasitol, 192: 10-32.
- Chen, G.; Dai, Y.; Wang, X.; Tang, B.; Zhu, Y. y Hua, Z.; 2011; "Oral delivery of Sj23LHD-GST antigen by *Salmonella typhimurium* type III secretion system protects against *Schistosoma japonicum* infection in mice". PLoS Negl Trop Dis, 5: e1313.

-
- Craig, P.S.; McManus, D.P.; Lightowlers, M.W.; Chabalgoity, J.A.; Garcia, H.H.; Gavidia, C.M.; Gilman, R.H.; Gonzalez, A.E.; Lorca, M.; Naquira, C.; Nieto, A. y Schantz, P.M.; 2007; "Prevention and control of cystic echinococcosis" *Lancet Infect Dis.*, 7: 385-394.
- Dowling, D.J.; Hamilton, C.M.; Donnelly, S.; La-Course, J.; Brophy, P.M.; Dalton, J. y O'Neill, S.M.; 2010; "Major secretory antigens of the helminth *Fasciola hepatica* activate a suppressive dendritic cell phenotype that attenuates Th17 cells but fails to activate Th2 immune responses" *Infect Immun.* 78: 793-801.
- Flanagan, J.U. y Smythe, M.L.; 2011; "Sigma-class glutathione transferases" *Drug Metab Rev.* 43: 194-214
- Fernández, V.; Chalar, C.; Martínez, C.; Musto, H.; Zaha, A. y Fernández, C.; 2000; "*Echinococcus granulosus*: Molecular Cloning and Phylogenetic Analysis of an Inducible Glutathione S-Transferase". *Exp Parasitol.*, 96: 190-194.
- Frova, C.; 2006; "Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives". *Biomol Eng.*, 23:149-169.
- Gauci, C.; Vural, G.; Öncel, T.; Varcasia, A.; Damian, V.; Kyngdon, C.T.; Craig, P.S.; Anderson, G.A. y Lightowlers, M.W.; 2008; "Vaccination with recombinant oncosphere antigens reduces the susceptibility of sheep to infection with *Taenia multiceps*". *Int J Parasitol.* 38: 1041-1050
- Grezel, D.; De Bont, J.; Liu, J.; Neyrinck, J.L.; Fontaine, J.; Vercruyssen, J. y Capron, A.; 1993; "Protective immunity induced in rat schistosomiasis by a single dose of the Sm28GST recombinant antigen: effector mechanisms involving IgE and IgA antibodies". *Eur J Immunol*, 23: 454-460.
- Grzych, J.M., Grezel D. y Xu, C.B.; 1993; "IgA antibodies to a protective antigen in human *Schistosomiasis mansoni*" *J Immunol*, 150: 527-535.
- Grzych, J.M.; De Bont, J.; Liu, J.; Neyrinck, J.P.; Fontaine, J.; Vercruyssen, J. y Capron, A.; 1998; "Relationship of impairment of schistosome 28-Kilodalton glutathione S-transferase (GST) activity to expression of immunity to *Schistosoma mattheei* in calves vaccinated with recombinant *Schistosoma bovis* 28-Kilodalton GST". *Infect Immun*, 66: 1142-1148.
- Gupta, S.; Bhandari, P.Y.; Reddy, M.V.; Harinath, B.C. y Rathaur, S.; 2005; "*Setaria cervi*: immunoprophylactic potential of glutathione-S-transferase against filarial parasite *Brugia malayi*". *Exp Parasitol*, 109: 252-255.
- Habig, W.H.; Pabst, M.J. y Jakoby, W.B.; 1974; "Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation" *J Biol Chem.* 249: 7130-7139.
- Harispe, L.; Garcia, G.; Arbildi, P.; Pascovich, L.; Chalar, C.; Zaha, A.; Fernandez, C. y Fernandez, V.; 2010; "Biochemical analysis of a recombinant glutathione transferase from the cestode *Echinococcus granulosus*". *Acta Trop*, 114: 31-36.
- Hayes, J.D. y Pulford, D.J.; 1995; "The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isozymes to cancer chemoprotection and drug resistance". *CRC Crit Rev Biochem Mol Biol*, 30: 445-600.
- Hewitson, J.P.; Ruckerl, D.; Harcus, Y.; Murray, J.; Webb, L.M.; Babayan, S.A.; Allen, J.E.; Kurniawan, A. y Maizels, R.M.; 2014; "The secreted triose phosphate isomerase of
-

Brugia malayi is required to sustain microfilaria production *in vivo*". PLoS Pathog, 2: e1003930.

Iriarte, A.; Arbildi, P.; La-Rocca, S.; Musto, H. y Fernandez, V.; 2012; "Identification of novel glutathione transferases in *Echinococcus granulosus*. An evolutionary perspective" Acta Trop, 123: 208-216.

La-Rocca, S.; 2014; "Estudio de la distribución de las glutationes transferasas en *Echinococcus granulosus* y caracterización de una nueva enzima heterodimérica". Tesis de Maestría PEDECIBA-Biología Facultad de Ciencias.

Lightowers, M.W.; Colebrook, A.L.; Gauci, C.G.; Gauci, S.M.; Kyngdon, C.T.; Monkhouse, J.L.; Vallejo Rodriguez, C.; Read, A.J.; Rolfe, R.A. y Sato, C.; 2003; "Vaccination against cestoda parasites: anti-helminth vaccines that work and why". Vet Parasitol, 115: 83-123.

McManus, D.P.; Zhang, W.; Li, J. y Bartley, P.B.; 2003; "Echinococcosis" Lancet, 362: 1295-1304

Moro, P. y Schantz, P.M.; 2009; "Echinococcosis: a review" Int J Infect Dis, 13: 125-133.

Morrison, C.A.; Colin, T.; Sexton, J.L.; Bowen, F.; Wicker, J.; Friedel, T. y Spithill, T.W.; 1996; "Protection of cattle against *Fasciola hepatica* infection by vaccination with glutathione S-transferase". Vaccine, 14: 1603-1612.

Mourglia-Ettlin, G.; Marqués, J.M.; Chabalgoity, J.A. y Dematteis, S.; 2011; "Early peritoneal immune response during *Echinococcus granulosus* establishment displays a biphasic behavior." PLoS Negl Trop Dis. 5:e1293

Preyaavichyapugdee, N.; Sahaphong, S.; Riengrojpitak, S.; Grams, R.; Viyanant, V. y Sobhon, P.; 2008; "*Fasciola gigantica* and *Schistosoma mansoni*: Vaccine potential of recombinant glutathione S-transferase (rFgGST26) against infections in mice". Exp Parasitol; 119: 229-237.

Rao, K.V.N.; He, Y.X. y Kalyanasundaram, R.; 2003; "Expression of a 28-Kilodalton glutathione S-transferase antigen of *Schistosoma mansoni* on the surface of filamentous phages and evaluation of its vaccine potential" Clin Diagn Lab Immunol, 4: 536-541.

Robinson, R.D. y Arme, C.; 1985; "*Echinococcus granulosus*: failure of eosin-exclusion test to demonstrate death of protoscoleces". Ann Trop Med Parasitol. 79: 117-123.

Rossi, A.; Marqués, J.M.; Gavidia, C.M.; Gonzalez, A.E.; Carmona, C.; García, H.H. y Chabalgoity, J.A.; 2012; "*Echinococcus granulosus*: different cytokine profiles are induced by single versus multiple experimental infections in dogs" Exp Parasitol, 130: 110-115.

Sambrook, J. y Russel, D.W.; 2001; "Molecular Cloning. A Laboratory Manual" 3ra edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Schmidt, A.E.; Chand, H.S.; Cascio, D.; Kisiel, W. y Bajaj, S.P.; 2005; "Crystal structure of Kunitz domain 1 (KD1) of tissue factor pathway inhibitor-2 in complex with trypsin. Implications for KD1 specificity of inhibition" J Biol Chem. 280: 27832-27838.

Sexton, J.L.; Milner, A.R.; Panaccio, M.; Waddington, J.; Wijffel, G.; Chandler, D.; Thompson, C.; Wilson, L.; Spithill, T.W. y Mitchel, G.F.; 1990; "Glutathione S-

transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep” J Immunol, 145: 3905-3910.

Torgerson, P.R.; 2003; “The use of mathematical models to simulate control options for echinococcosis” Acta Trop, 85: 211-221.

Torres-Rivera, A. y Landa, A.; 2008; “Glutathione transferases from parasites: A biochemical view” Acta Trop, 105: 99-112.

Veerapathran, A.; Dakshinamoorthy, G.; Gnanasekar, M.; Reddy, M.V.R. y Kalyanasundaram, R.; 2009; “Evaluation of *Wuchereria bancrofti* GST as a vaccine candidate for lymphatic filariasis” PLoS Negl Trop Dis, 3: e457.

Wilce, M.C.J. y Parker, M.W.; 1994; “Structure and function of glutathione S-transferases”. Biochim Parasitol. 49:177-180.

Woollard, DJ.; Gauci, C.G.; Heath, D.D. y Lightowers, M.W.; 2001; “Protection against hydatid disease induced with the EG95 vaccine is associated with conformational epitopes” Vaccine, 19: 498-507.

Zhang, W. y McManus D.P.; 2008;” Vaccination of dogs against *Echinococcus granulosus*: a means to control hydatid disease?” Trend Parasitol, 24: 419-424.