

# **Caracterización estructural y funcional del Antígeno B de *Echinococcus granulosus***



Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Exactas

**Lic. María Valeria Silva Álvarez**

**Director: Dra. Betina Córscico**

**Co-director: Dra. Ana María Ferreira**

**2014**

**Universidad Nacional de La Plata**  
**Facultad de Ciencias Exactas**  
**Departamento de Ciencias Biológicas**

**Caracterización estructural y funcional del**  
**Antígeno B de *Echinococcus granulosus***

**Licenciada en Bioquímica María Valeria Silva Álvarez**

**Director: Dra. Betina Córscico (UNLP)**  
**Co-director: Dra. Ana María Ferreira (UdelaR)**

**Tribunal Evaluador**  
**Dra. Ana Ves Losada**  
**Dra. Mara C. Rosenzvit**  
**Dra. Norma Sterin-Speziale**

**Tesis propuesta para optar por el Título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas en el**  
**Área Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de La Plata**

**La Plata, Buenos Aires, Argentina**  
**Julio, 2014**

El presente trabajo de tesis, que lleva por título “Caracterización Estructural y Funcional del Antígeno B de *Echinococcus granulosus*”, se realizó para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas en el Área de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

El mismo se llevó a cabo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), Instituto que pertenece a la UNLP y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), ubicado en la Facultad de Ciencias Médicas (UNLP). También se realizaron dos estadías por un total de cinco meses en la Cátedra de Inmunología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República (UdelaR), ubicada en el Instituto de Higiene (Facultad de Medicina, UdelaR).

Este trabajo contó con la dirección de la Dra. Betina Córscico (Prof. Adjunta Departamento Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, Argentina) y la co-dirección de la Dra. Ana María Ferreira (Prof. Adjunta Cátedra de Inmunología, Facultad de Ciencias, UdelaR, Uruguay).

Para su realización se recibió el apoyo financiero del CONICET mediante las Becas Internas de Posgrado Tipo I (2009-2012) y Tipo II (2012-2014) con países Latinoamericanos. El trabajo experimental se llevó a cabo mediante financiación de la organización *Wellcome Trust* (WT N° 083625, Reino Unido), de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT N° 2010/2252, Argentina) y de la Comisión Sectorial de Investigación Científica (Proyecto I + D, N° 023/348, Uruguay).

## **AGRADECIMIENTOS**

---

A las Directoras de este trabajo. Sin su apoyo, tiempo y dedicación, la realización del mismo no hubiese sido posible. A Betina, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme formar parte de su grupo de investigación. Por darme la oportunidad de desarrollar el trabajo experimental con libertad y por brindarme su confianza para participar en distintas iniciativas y proyectos del laboratorio, permitiéndome crecer personal y profesionalmente. A Ana, por estos siete años de constante enseñanza, por confiar en mí desde el comienzo y por seguir haciéndolo para el futuro. Por sus consejos, por estar siempre cerca respondiendo innumerables correos electrónicos, haciéndome sentir acompañada. Por todas las horas de valiosas discusiones dedicadas a este trabajo y por siempre incentivarme a intentar dar lo mejor.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio 10. Por hacerme sentir bien recibida desde el comienzo, por su ayuda en el día a día, por enseñarme que el trabajo en equipo es lo más importante. Por todas las horas compartidas dentro y fuera del laboratorio, por generar un excelente lugar de trabajo. A Nati S, Julián y Lisandro, con quienes compartí distintas etapas durante estos años, por el compañerismo que me han demostrado. A Edu, por su gran sentido del humor, a Nati B por contagiarnos su energía. A Mari y Flor por toda su ayuda en el laboratorio, por enseñarme la técnica de HPLC, pero principalmente por el cariño que me han brindado. A Lu por tantas experiencias compartidas, por alegrarme los días con sus anécdotas, por siempre estar. A Gise por su invaluable colaboración para la realización de este trabajo. Por hacerse siempre un tiempo para atender nuestras consultas, por sus enseñanzas.

A todos los miembros del INIBIOLP. Por su apoyo, colaboración y solidaridad. En especial a Annie, Margarita y a sus estudiantes. A Juan Pablo, Martín, Lucía, Boris, Sandra, Yanina y Ángela por los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio. A Mario, Mabel y Ana Laura por toda su ayuda y su buena disposición.

A todos los miembros de la Cátedra de Inmunología. Por los gratos momentos compartidos durante mis estadías allí. En especial, a todo el grupo que conforma “la casita del medio”: Cecilia, Ana, Álvaro, Gustavo y todos sus estudiantes. A mis compañeros de mesada, Lu M., Álvaro P y María, por generar un excelente ambiente laboral. A Maite, porque trabajar en su compañía fue un placer.

A todos los miembros del Laboratorio de Biología de Cestodos en la Universidad Federal de Río Grande del Sur. Sin su generosa colaboración, la realización de este trabajo no hubiese sido posible. En especial al Dr. Arnaldo Zaha y al Dr. Henrique Ferreira por abrirme las puertas de su laboratorio y a Karina Monteiro por su invaluable ayuda en la purificación de las subunidades recombinantes de Antígeno B.

A todos los integrantes de otros laboratorios que de un modo u otro contribuyeron a este trabajo. En especial a la Dra. Mara Rosenzvit y su grupo, al Dr. Marcelo Costabel y al Lic. Fernando Zamarreño, a los Dres. Malcolm W. Kennedy y Brian O. Smith.

A todas las organizaciones financiadoras que posibilitaron este trabajo: CONICET, Wellcome Trust, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y Comisión Sectorial de Investigación Científica.

A todos los docentes que contribuyeron a mi formación a lo largo de todos estos años de estudio. Por su tiempo y dedicación, por dejarme sus enseñanzas.

A mis amigos. Su compañía a lo largo de todos estos años me ha permitido disfrutar los momentos felices y superar los difíciles. A mis amigas de la vida, Vero y Dani. A mis amigos de la facultad, en especial a Vico, por todas las horas compartidas preparando parciales y exámenes. A mis amigos en Argentina, muchos de los cuales ya mencioné. A Vicky, Magui y Vanina, por acompañarme desde mi llegada a La Plata.

A mi familia. Por estar siempre presentes e incentivar me a alcanzar mis metas, aun cuando implicara alejarme de ellos. A mi madre por cuidarme y apoyarme en mis decisiones. A mi padre, que siempre está conmigo. A mis tías y primos, en especial a Vivi por hacerme sentir siempre acompañada. A la familia de Jor, por recibirme y transformarse en mi familia en Argentina.

A Jor. Por ser mi gran compañero y mi sostén. Por elegir seguir transitando el camino, juntos a la par.

A todos ellos, infinitas gracias!

## Publicaciones durante el período de doctorado

Relacionados con esta tesis:

- **Silva-Álvarez V**, Franchini GR, Pórfido JL, Kennedy MW, Ferreira AM, Córscico B. Lipid-free Antigen B Subunits from *Echinococcus granulosus*: Oligomerization, ligand binding, and membrane interaction properties. Manuscrito en preparación.
- **Silva-Álvarez V**, Folle M, Ramos AL, Zamarreño F, Costabel M, García-Zepeda E, Salinas G, Córscico B, Ferreira AM. *Echinococcus granulosus* Antigen B: a novel lipoprotein at the host-parasite interface. PLEFA (2014). Review. Aceptado.
- Franchini GR, Córscico B, Pórfido JL, **Silva V**, Ibañez Shimabukuro M, Rey Burusco F. Análisis Estructural y Funcional de Proteínas Solubles que Unen Lípidos de Parásitos Helmintos. (2013). Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 47(2): 377-384. Review

No presentados en esta tesis:

- Pórfido JL, Alvite G, **Silva V**, Kennedy MW, Esteves A, Córscico B. Direct interaction between EgFABP1, a fatty acid binding protein from *Echinococcus granulosus*, and membranes. (2012). PLoS Negl Trop Dis. 6(11): e1893.
- Oval G; Ramos AL; **Silva V**; Lima A; Batthyany C, Bessio MI; Ferreira F; Salinas G; Ferreira AM. Characterization of the Native Lipid Moiety of *Echinococcus granulosus* Antigen B. (2012). PLoS Negl Trop Dis. 6(5):e1642

Capítulos de Libros

- **Valeria Silva**, Jorge L Pórfido. Interacción de lípidos con el agua y formación de estructuras empaquetadas. (2013). Análisis estructural y funcional de Macromoléculas. ISBN 978-950-34-1057-8. Capítulo 8. Pág.193-219. Ed. EDULP. *Colección Libros de Cátedra, UNLP*.
- Jorge L. Pórfido, **Valeria Silva**. Interacción lípido-proteína. (2013). Análisis estructural y funcional de Macromoléculas. ISBN 978-950-34-1057-8. Capítulo 9. Pág. 220-250. Ed. EDULP. *Colección Libros de Cátedra 2011, UNLP*.

# ÍNDICE

---

## ÍNDICE GENERAL

<b>ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>RESUMEN</b> .....	4
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	6
1.1. Los helmintos parásitos.....	7
1.1.1. Nematodos.....	8
1.1.2. Platelminos.....	10
1.1.2.1. Trematodos.....	10
1.1.2.2. Cestodos.....	11
1.2. El cestodo <i>Echinococcus granulosus</i> .....	13
1.2.1. Ciclo de vida de <i>Echinococcus granulosus</i> .....	14
1.2.2. Especies y cepas comprendidas dentro de <i>Echinococcus granulosus</i> .....	16
1.2.3. Morfología de <i>Echinococcus granulosus</i> .....	17
1.2.3.1. Adulto.....	17
1.2.3.2. Huevo.....	19
1.2.3.3. Metacestodo.....	20
1.2.3.4. Protoescólex.....	23
1.2.4. Distribución geográfica de <i>Echinococcus granulosus</i> .....	24
1.2.5. Importancia de la hidatidosis en nuestra región.....	25
1.2.6. Diagnóstico y tratamiento de la hidatidosis.....	28
1.3. Metabolismo de <i>Echinococcus granulosus</i> y otros cestodos.....	29
1.3.1. Obtención de los nutrientes y características generales del metabolismo de los cestodos.....	29
1.3.2. Metabolismo lipídico.....	32
1.3.3. Proteínas que unen lípidos en cestodos.....	35
1.3.3.1. Proteínas que unen ácidos grasos (FABPs).....	37
1.3.3.2. Proteínas que unen ligandos hidrofóbicos (HLBPs).....	39
1.4. La HLBP de <i>Echinococcus granulosus</i> : Antígeno B.....	41
1.4.1. Componentes del EgAgB.....	44
1.4.2. Funciones del EgAgB.....	49
1.5. Hipótesis y Objetivos.....	52
1.5.1. Hipótesis general.....	52
1.5.2. Objetivo general.....	53
1.5.3. Objetivos específicos.....	54
1.5.3.1. Obtención de las subunidades recombinantes de EgAgB libres de lípidos.....	54
1.5.3.2. Análisis de la capacidad de oligomerización de las subunidades de EgAgB libres de lípidos.....	54
1.5.3.3. Caracterización de las propiedades de unión de las subunidades de EgAgB a ligandos lipídicos.....	54

1.5.3.4. Análisis de la capacidad de las subunidades de EgAgB de unirse y transferir ácidos grasos hacia membranas fosfolipídicas.....	55
1.5.3.5. Análisis de la capacidad del EgAgB nativo de unirse a monocitos y macrófagos: contribución de los componentes proteicos y lipídicos....	55
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>56</b>
2.1. Obtención de las subunidades recombinantes de EgAgB libres de lípidos.....	57
2.1.1. Métodos generales.....	57
2.1.1.1. Aislamiento y purificación de plásmidos bacterianos.....	57
2.1.1.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	58
2.1.1.3. Extracción y purificación de ADN a partir de geles de agarosa.....	59
2.1.1.4. Cuantificación de ADN.....	59
2.1.1.5. Preparación de bacterias competentes.....	60
2.1.1.6. Transformación de bacterias competentes.....	60
2.1.1.7. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.....	61
2.1.1.8. Cuantificación de proteínas.....	62
2.1.1.9. Extracción de lípidos.....	62
2.1.1.10. Análisis de lípidos mediante cromatografía de capa fina.....	63
2.1.2. Subclonado de las subunidades de EgAgB en el plásmido pET28b.....	64
2.1.2.1. Diseño de <i>primers</i> específicos para las subunidades de EgAgB.....	64
2.1.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa para amplificar los genes de EgAgB.....	65
2.1.2.3. Preparación de los fragmentos de EgAgB para subclonar.....	65
2.1.2.4. Preparación del plásmido pET28-b para subclonar.....	67
2.1.2.5. Ligación de EgAgB8/1 en el plásmido pET-28b.....	68
2.1.2.6. Análisis de la expresión de EgAgB8/1 en las bacterias transformadas	69
2.1.3. Análisis de la expresión y purificación de las subunidades de EgAgB a partir del plásmido pGEX-4T-1.....	70
2.1.3.1. Análisis de la expresión de las subunidades de EgAgB.....	70
2.1.3.2. Purificación de las subunidades de EgAgB.....	71
2.1.4. Remoción lipídica de las subunidades de EgAgB mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa.....	72
2.1.5. Estudio estructural de las subunidades obtenidas por dicroísmo circular...	73
2.2. Análisis de la capacidad de oligomerización de las subunidades de EgAgB libres de lípidos.....	74
2.2.1. Estudios utilizando cromatografía de exclusión molecular.....	74
2.2.2. Experimentos de entrecruzamiento con carbodiimidas.....	75
2.3. Caracterización de las propiedades de unión de las subunidades de EgAgB a ligandos hidrofóbicos.....	76
2.3.1. Análisis de la unión de lípidos a las subunidades de EgAgB empleando fluorescencia intrínseca.....	76
2.3.2. Análisis de la unión de análogos fluorescentes de lípidos a las subunidades de EgAgB.....	77
2.3.2.1. Análisis de la unión de dehidroergosterol (DHE).....	77
2.3.2.2. Análisis de la unión de ácido 11-(dansilamino)-undecanoico (DAUDA).....	78

2.3.2.3. Análisis de la unión de antroiloxi-derivados de ácidos grasos (AOFA) y determinación de la constante de disociación ( $K_d$ ) de la interacción.....	78
2.4. Análisis de la capacidad de las subunidades de EgAgB de unirse y transferir ácidos grasos hacia membranas fosfolipídicas.....	79
2.4.1. Preparación de vesículas unilamelares pequeñas (SUVs).....	79
2.4.2. Determinación del coeficiente de partición de 12AS entre las subunidades de EgAgB y SUVs.....	81
2.4.3. Transferencia de 12AS desde las subunidades de EgAgB hacia SUVs.....	82
2.5. Análisis de la capacidad del EgAgB nativo de unirse a monocitos y macrófagos: contribución de los componentes proteicos y lipídicos.....	84
2.5.1. Preparación de suspensiones de monocitos y macrófagos.....	84
2.5.1.1. Mantenimiento de la línea celular de monocitos humanos THP-1.....	84
2.5.1.2. Diferenciación de monocitos THP-1 a macrófagos.....	85
2.5.1.3. Obtención de células inflamatorias de ratón mediante lavados peritoneales.....	85
2.5.2. Preparación del EgAgB nativo y otros ligandos lipídicos de interés.....	86
2.5.2.1. Purificación de EgAgB nativo a partir de líquido hidático.....	86
2.5.2.2. Tratamiento de EgAgB nativo con fosfolipasa D.....	87
2.5.2.3. Marcación de subunidades de EgAgB y EgAgB nativo con biotina....	88
2.5.2.4. Purificación de lipoproteínas plasmáticas: HDL y LDL.....	88
2.5.2.5. Preparación de vesículas unilamelares grandes (LUVs).....	89
2.5.3. Análisis de la interacción de las subunidades de EgAgB con monocitos y macrófagos.....	89
2.5.3.1. Análisis de la interacción de EgAgB nativo y EgAgB8/1 con monocitos y macrófagos THP-1 empleando un anticuerpo monoclonal anti-EgAgB8/1.....	90
2.5.3.2. Análisis de la interacción de las subunidades de EgAgB y EgAgB nativo marcados con biotina a monocitos y macrófagos THP-1.....	91
2.5.3.3. Análisis de la interacción de las subunidades de EgAgB y EgAgB nativo marcados con biotina a macrófagos primarios de ratón.....	92
2.5.4. Análisis de la contribución de la fosfatidilcolina presente en el EgAgB nativo en la interacción con monocitos y macrófagos THP-1.....	93
2.5.4.1. Análisis y comparación de la capacidad de unión de EgAgB nativo y tratado con fosfolipasa D a monocitos y macrófagos THP-1.....	94
2.5.4.2. Ensayos de competencia empleando vesículas de fosfatidilcolina y fosfatidilcolina/fosfatidilserina.....	94
2.5.5. Ensayos de competencia empleando lipoproteínas plasmáticas.....	95
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>96</b>
3.1. Obtención de las subunidades recombinantes de EgAgB libres de lípidos.....	97
3.1.1. Subclonado de las subunidades de EgAgB en el plásmido pET28-b.....	97
3.1.2. Análisis de la expresión y purificación de las subunidades de EgAgB a partir del plásmido pGEX-4T-1.....	103
3.1.3. Remoción lipídica de las subunidades de EgAgB mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa.....	107
3.1.4. Estudio estructural de las subunidades obtenidas por dicróismo circular....	110

3.2. Análisis de la capacidad de oligomerización de las subunidades de EgAgB libres de lípidos.....	111
3.2.1. Estudios utilizando cromatografía de exclusión molecular.....	112
3.2.2. Experimentos de entrecruzamiento con carbodiimidas.....	116
3.3. Caracterización de las propiedades de unión de las subunidades de EgAgB a ligandos hidrofóbicos.....	121
3.3.1. Análisis de la unión de lípidos a las subunidades de EgAgB empleando fluorescencia intrínseca.....	121
3.3.2. Análisis de la unión de análogos fluorescentes de lípidos a las subunidades de EgAgB.....	124
3.4. Análisis de la capacidad de las subunidades de EgAgB transferir ácidos grasos hacia membranas fosfolipídicas.....	130
3.4.1. Determinación del coeficiente de partición de 12-AS entre las subunidades de EgAgB y SUVs.....	131
3.4.2. Transferencia de 12-AS desde las subunidades de EgAgB hacia SUVs.....	133
3.5. Análisis de la capacidad del EgAgB nativo de unirse a monocitos y macrófagos: contribución de los componentes proteicos y lipídicos.....	138
3.5.1. Análisis de la interacción de las subunidades de EgAgB con monocitos y macrófagos.....	139
3.5.2. Análisis de la contribución de la fosfatidilcolina presente en el EgAgB nativo en la interacción con monocitos y macrófagos THP-1.....	148
3.5.3. Ensayos de competencia empleando lipoproteínas plasmáticas.....	151
<b>4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>154</b>
4.1. Obtención de las subunidades recombinantes de EgAgB libres de lípidos.....	155
4.2. Análisis de la capacidad de oligomerización de las subunidades de EgAgB libres de lípidos.....	160
4.3. Caracterización de las propiedades de unión de las subunidades de EgAgB a ligandos lipídicos.....	162
4.4. Análisis de la capacidad de las subunidades de EgAgB de transferir ácidos grasos hacia membranas fosfolipídicas.....	168
4.5. Análisis de la capacidad del EgAgB nativo de unirse a monocitos y macrófagos: contribución de los componentes proteicos y lipídicos.....	174
4.5.1. Contribución de los componentes proteicos y lipídicos en la unión a monocitos y macrófagos.....	174
4.5.2. Estudio preliminar de receptores involucrados en el reconocimiento del EgAgB por monocitos y macrófagos.....	177
4.6. Discusión general.....	184
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>191</b>
<b>6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>194</b>
<b>7. APÉNDICES.....</b>	<b>198</b>
7.1. Mapas de los plásmidos pGEX4-T-1 y pET28b.....	199
7.2. Verificación de la secuencia nucleotídica de los genes de EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 clonados en el plásmido pGEX.....	201

7.3. Verificación de la secuencia nucleotídica del producto de subclonado pET28b-EgAgB8/1.....	204
7.4. Análisis mediante SDS-PAGE de los productos obtenidos durante la purificación de EgAgB8/2 y EgAgB8/3.....	206
7.5. Datos bioquímicos de las proteínas recombinantes EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3.....	207
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>208</b>

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<b>Tabla 1.1.</b> Comparación entre las principales características morfológicas de los distintos grupos de helmintos parásitos.....	8
<b>Tabla 1.2.</b> Distribución y prevalencia de las principales infecciones producidas por nematodos parásitos que afectan al hombre.....	9
<b>Tabla 1.3.</b> Distribución y prevalencia de las principales infecciones producidas por trematodos parásitos que afectan al hombre.....	11
<b>Tabla 1.4.</b> Distribución y prevalencia de las principales infecciones producidas por platelmintos parásitos que afectan al hombre.....	12
<b>Tabla 7.1.</b> Datos bioquímicos de las proteínas recombinantes EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3.....	207
<b>Figura 1.1.</b> Ciclo de vida del parásito <i>Echinococcus granulosus</i> .....	15
<b>Figura 1.2.</b> Esquema del gusano adulto de <i>Echinococcus granulosus</i> .....	16
<b>Figura 1.3.</b> Imagen y esquema del huevo de <i>Echinococcus granulosus</i> .....	20
<b>Figura 1.4.</b> Esquema del metacestodo de <i>Echinococcus granulosus</i> .....	21
<b>Figura 1.5.</b> Esquema del protoescólex de <i>Echinococcus granulosus</i> .....	24
<b>Figura 1.6.</b> Distribución geográfica del parásito <i>Echinococcus granulosus</i> .....	25
<b>Figura 1.7.</b> Focos de Hidatidosis en Argentina.....	27
<b>Figura 1.8.</b> Esquema del tegumento de los cestodos.....	30
<b>Figura 1.9.</b> Esquema del metabolismo lipídico en los cestodos.....	33
<b>Figura 1.10.</b> Relaciones filogenéticas entre las FABPs y las HLBP de cestodos.....	36
<b>Figura 1.11.</b> Caracterización de la fracción proteica y lipídica del EgAgB nativo.....	43
<b>Figura 1.12.</b> Alineamiento de las secuencias de distintas subunidades de EgAgB.....	45
<b>Figura 1.13.</b> Análisis de la fracción lipídica del EgAgB nativo.....	47
<b>Figura 1.14.</b> Estructura propuesta para el EgAgB nativo.....	48
<b>Figura 1.15.</b> Principales células derivadas de precursores mieloides.....	50
<b>Figura 3.1.</b> Obtención de los fragmentos de ADN codificantes para las subunidades de EgAgB mediante PCR con <i>primers</i> específicos.....	98
<b>Figura 3.2.</b> Chequeo de colonias transformadas con la construcción pGEMT-EgAgB8/1.....	99
<b>Figura 3.3.</b> Chequeo de la colonia obtenida luego de transformación con la construcción pET28b-EgAgB8/1.....	100
<b>Figura 3.4.</b> Análisis de la expresión de EgAgB8/1 en las bacterias transformadas.....	101
<b>Figura 3.5.</b> Análisis de la expresión de las subunidades de EgAgB en las bacterias transformadas.....	103
<b>Figura 3.6.</b> Purificación de EgAgB8/1.....	105

<b>Figura 3.7.</b> Remoción de los lípidos unidos a las subunidades de EgAgB8 recombinantes mediante RP-HPLC.....	109
<b>Figura 3.8.</b> Análisis por dicroísmo circular de las subunidades de EgAgB libres de lípidos.....	110
<b>Figura 3.9.</b> Análisis de las subunidades de EgAgB mediante cromatografía de exclusión molecular.....	113
<b>Figura 3.10.</b> Estimación del peso molecular aparente de los oligómeros de EgAgB mediante cromatografía de exclusión molecular.....	114
<b>Figura 3.11.</b> Análisis de diluciones de EgAgB8/2 mediante cromatografía de exclusión molecular.....	115
<b>Figura 3.12.</b> Análisis de la oligomerización del EgAgB mediante entrecruzamiento con EDC.....	118
<b>Figura 3.13.</b> Análisis de la oligomerización del EgAgB mediante entrecruzamiento con EDC.....	120
<b>Figura 3.14.</b> Análisis de la unión de ligandos a EgAgB8/2 empleando fluorescencia intrínseca.....	123
<b>Figura 3.15.</b> Análisis de la unión de DHE a las subunidades de EgAgB.....	125
<b>Figura 3.16.</b> Análisis de la unión de DAUDA a las subunidades de EgAgB.....	126
<b>Figura 3.17.</b> Análisis de la unión de 12-AS a las subunidades de EgAgB.....	128
<b>Figura 3.18.</b> Determinación de la $K_d$ para la unión 12AS-EgAgB.....	129
<b>Figura 3.19.</b> Determinación de la $K_p$ de 12-AS entre las subunidades de EgAgB y SUVs	132
<b>Figura 3.20.</b> Esquema de la estrategia experimental empleada para determinar la velocidad de transferencia de 12-AS desde EgAgB hacia SUVs mediante FRET.....	133
<b>Figura 3.21.</b> Transferencia de 12-AS desde las subunidades de EgAgB hacia SUVs.....	134
<b>Figura 3.22.</b> Velocidades de transferencia de 12-AS desde las subunidades de EgAgB hacia SUVs.....	136
<b>Figura 3.23.</b> Velocidades de transferencia de 12-AS desde las subunidades de EgAgB hacia SUVs de distinta composición.....	137
<b>Figura 3.24.</b> Esquema de la estrategia experimental para analizar la unión del EgAgB nativo y de las subunidades de EgAgB a los monocitos y macrófagos.....	140
<b>Figura 3.25.</b> Unión de EgAgB nativo a monocitos y macrófagos THP-1.....	141
<b>Figura 3.26.</b> Unión de la subunidad EgAgB8/1 a monocitos y macrófagos THP-1.....	143
<b>Figura 3.27.</b> Unión de la subunidades de EgAgB a monocitos y macrófagos THP-1.....	145
<b>Figura 3.28.</b> Unión de la subunidades de EgAgB a células inflamatorias de ratón.....	147
<b>Figura 3.29.</b> Análisis de la contribución de la PC en la unión del EgAgB a monocitos y macrófagos THP-1.....	149
<b>Figura 3.30.</b> Competencia por la unión a monocitos THP-1 con LUVs de PC y PC/PS....	151
<b>Figura 3.31.</b> Competencia por la unión a monocitos THP-1 con lipoproteínas plasmáticas.....	152
<b>Figura 4.1.</b> Alineamiento de las secuencias de distintas HLBP.....	164
<b>Figura 4.2.</b> Estructura química de sondas fluorescentes y ligandos lipídicos.....	165
<b>Figura 4.3.</b> Esquema de los mecanismos de transferencia de ligandos hacia membranas.....	169
<b>Figura 4.4.</b> Esquema ilustrativo de los distintos receptores pertenecientes a la familia de receptores de LDL.....	179
<b>Figura 4.5.</b> Esquema ilustrativo de los distintos receptores SR.....	181
<b>Figura 4.6.</b> Modelos de las subunidades de EgAgB.....	186
<b>Figura 4.7.</b> Hipótesis sobre la función del EgAgB en la biología de <i>E. granulosus</i> .....	190

<b>Figura 7.1.</b> Mapa del plámsido pGEX-4-T-1.....	199
<b>Figura 7.2.</b> Mapa del plámsido pET28b.....	200
<b>Figura 7.3.</b> Verificación de la secuencia nucleotídica de los genes de EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 clonados en el plásmido pGEX.....	201
<b>Figura 7.4.</b> Verificación de la secuencia nucleotídica del producto de subclonado pET28b-EgAgB8/1.....	204
<b>Figura 7.5.</b> Purificación de EgAgB8/2 y EgAgB8/3.....	206

## ABREVIATURAS

---

<b>12-AS</b>	ácido 12-(9-antroiloxi)-esteárico
<b>16-AP</b>	ácido 16-(9-antroiloxi)-palmítico
<b>ABA-1-A1</b>	subunidad A1 de la poliproteína ABA-1 de <i>Ascaris suum</i> , perteneciente a la familia de proteína alergénicas de nematodos
<b>ABC</b>	transportadores de membrana dependientes de ATP (del inglés <i>ATP-binding cassette</i> )
<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>AG</b>	ácidos grasos
<b>ANS</b>	1-anilino-8-naftaleno sulfonato
<b>AOFA</b>	antroiloxi-derivados de ácidos grasos
<b>BHT</b>	2, 6 di-tert-butil-4-metilfenol
<b>BSA</b>	seroalbúmina bovina
<b>CD</b>	dicroísmo circular (del inglés <i>circular dichroism</i> )
<b>CL</b>	cardiolipina
<b>Col</b>	colesterol
<b>DACA</b>	ácido dansill-D, L- $\alpha$ -amino octanoico
<b>DAG</b>	diacilglicéridos
<b>dATP</b>	desoxiadenosina trifosfato
<b>DAUDA</b>	ácido 11-(dansilamino)undecanoico
<b>DHE</b>	dehidroergosterol
<b>DMSO</b>	dimetilsulfóxido
<b>dNTP</b>	desoxirribonucleótido trifosfato
<b>EDC</b>	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
<b>EE</b>	esteres de esteroides
<b>EgAgB</b>	Antígeno B de <i>Echinococcus granulosus</i>
<b>EgAgB-PLD</b>	Antígeno B nativo tratado con fosfolipasa D
<b>ELISA</b>	enzimoinmunoensayo (del inglés <i>enzyme linked immuno sorbent assay</i> )
<b>FABPs</b>	proteínas que unen ácidos grasos (del inglés <i>fatty acid binding proteins</i> )
<b>FE</b>	ficoeritrina
<b>FITC</b>	isotiocianato de fluoresceína
<b>FPLC</b>	cromatografía líquida de separación rápida de proteínas (del inglés <i>fast protein liquid chromatography</i> )
<b>FRET</b>	transferencia de energía de resonancia de Förster (del inglés <i>Förster resonance energy transfer</i> )
<b>FSC</b>	dispersión frontal
<b>g</b>	gramo
<b>GST</b>	Glutación S-Transferasa
<b>HDL</b>	lipoproteína de alta densidad (del inglés <i>high density lipoprotein</i> )
<b>HLBPs</b>	proteínas que unen ligandos hidrofóbicos (del inglés <i>hydrophobic ligand binding protein</i> )
<b>IgG, IgM</b>	Inmunoglobulina G, Inmunoglobulina M
<b>IL</b>	interleuquina
<b>IPTG</b>	isopropil $\alpha$ -D-tiogalactósido

<b>K<sub>d</sub></b>	constante de disociación
<b>kDa</b>	kiloDalton
<b>K<sub>p</sub></b>	coeficiente de partición
<b>L</b>	litro
<b>LB</b>	medio Luria Bertani
<b>LBPs</b>	proteínas que unen lípidos (del inglés <i>lipid binding protein</i> )
<b>LDL</b>	lipoproteína de baja densidad (del inglés <i>low density lipoprotein</i> )
<b>LDL-A</b>	dominio del receptor de LDL de tipo A (del inglés <i>LDL receptor type A</i> )
<b>LDLr</b>	receptor de LDL
<b>LRP</b>	proteína relacionada al LDLr (del inglés <i>LDLr related protein</i> )
<b>LUV</b>	vesículas unilamelares grandes
<b>M</b>	molar
<b>µg</b>	microgramo
<b>µL</b>	microlitro
<b>µM</b>	micromolar
<b>mg</b>	miligramo
<b>mL</b>	mililitro
<b>mM</b>	milimolar
<b>Mo-EB7</b>	anticuerpo monoclonal anti-EgAgB8/1
<b>MPM</b>	marcador de peso molecular
<b>N</b>	normal
<b>NBD-PC</b>	1-Oleoil-2-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]hexanoil]-sn-Glicero-3-Fosfatidilcolina
<b>NHS-Biotina</b>	N-Hidroxisuccinimida-Biotina
<b>OVA</b>	ovoalbúmina
<b>PAGE</b>	electroforesis en geles de poliacrilamida
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PC</b>	fosfatidilcolina
<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa
<b>PE</b>	fosfatidiletanolamina
<b>PI</b>	fosfatidilinositol
<b>PLD</b>	fosfolipasa D
<b>PMA</b>	forbol-12-miristato-13-acetato
<b>PS</b>	fosfatidilserina
<b>RP-HPLC</b>	cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (del inglés <i>reverse phase high performance liquid chromatography</i> )
<b>RPMI</b>	medio de cultivo <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>s</b>	segundo
<b>SD</b>	desvío estándar
<b>SDS</b>	dodecil sulfato de sodio
<b>SEM</b>	error estándar de la media
<b>SFB</b>	suero fetal bovino
<b>SR</b>	receptor barrendero (del inglés <i>scavenger receptor</i> )
<b>SSC</b>	dispersión lateral
<b>SUV</b>	vesículas unilamelares pequeñas
<b>TAG</b>	triacilglicéridos
<b>TFA</b>	ácido trifluoroacético
<b>Th1/Th2</b>	células T colaboradoras de tipo 1 o 2 (del inglés <i>T-helper 1</i> o <i>T-helper 2</i> )

<b>THP-1</b>	línea celular de premonocitos humanos
<b>TLC</b>	cromatografía de capa fina
<b>TMB</b>	3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina
<b>Tris</b>	tri-(hidroximetil)-aminometano
<b>VLDL</b>	lipoproteína de muy baja densidad (del inglés <i>very low density lipoprotein</i> )
<b>X-Gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

**Medios y soluciones:**

<b>2TY</b>	Triptona 16 g/L, extracto de levadura 10 g/L y NaCl 5 g/L
<b>LB</b>	Triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 10 g/L
<b>PBS</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2 mM, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mM, KCl 2.7 mM, NaCl 137 mM, pH 7.4
<b>TBE</b>	Tris 90 mM, Borato 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8.0
<b>TBS</b>	Tris 40 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4
<b>TE</b>	Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0

## **RESUMEN**

El antígeno B (EgAgB) es una lipoproteína presente en la larva del parásito cestodo *Echinococcus granulosus*, agente causante de la zoonosis conocida como hidatidosis, enfermedad endémica en nuestra región. Esta proteína pertenece a una familia de proteínas exclusivas de cestodos que unen ligandos hidrofóbicos, conocidas como HLBP. A nivel proteico, el EgAgB está formado por subunidades de ~8 kDa codificadas por genes polimórficos pertenecientes a 5 subfamilias distintas (EgAgB8/1 a EgAgB8/5); mientras que su componente lipídico está formado por una amplia variedad de lípidos, incluyendo lípidos neutros y polares. El hecho de que muchos de estos lípidos no pueden ser sintetizados *de novo* por el parásito hace suponer que el EgAgB podría estar involucrado en la adquisición de estos compuestos desde el hospedador, como ha sido propuesto para otras HLBP. Esto implicaría que el EgAgB interactuó con componentes del hospedador para adquirir estos ligandos. En este sentido, existe evidencia de que el EgAgB es capaz de interactuar con células del sistema inmune, modulando su respuesta, lo que a su vez favorecería el establecimiento y permanencia del parásito. Sin embargo, para poder comprender los mecanismos asociados a esta modulación a nivel molecular y determinar si la proteína es capaz de transportar e intercambiar los lípidos, es imprescindible avanzar en el conocimiento estructural y funcional de esta partícula compleja. Con este fin, durante el desarrollo de este trabajo se purificaron las subunidades recombinantes EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3, logrando obtenerlas de forma libre de lípidos. Se logró determinar que estas subunidades son capaces de interactuar consigo mismas aún en ausencia de lípidos, formando oligómeros de entre 40 y 60 kDa, distintos a los que se han reportado previamente en la literatura en presencia de los ligandos. Por otro lado, se analizó la capacidad de distintos ligandos lipídicos de unirse a estas subunidades y se pudieron determinar constantes de disociación en el orden submicromolar empleando antioxi-derivados de ácidos grasos. Más aún, se evaluó la capacidad de las subunidades EgAgB8/2 y EgAgB8/3 de transferir estos derivados hacia membranas fosfolípicas modelo. Utilizando distintos tipos de vesículas se pudo establecer que ambas subunidades son potencialmente capaces de transferir los ácidos grasos. En el caso de la subunidad EgAgB8/2, la transferencia ocurriría por un mecanismo que involucra un contacto directo con la membrana, mientras que en el caso de EgAgB8/3 la cinética de la transferencia estaría determinada por la disociación del complejo proteína-ligando. Asimismo, para ambas proteínas se pudo determinar que las interacciones electroestáticas tienen importancia en el mecanismo, dado que la transferencia se ve favorecida en el caso de vesículas con mayor carga neta negativa, como ocurre en el caso de vesículas ricas en cardiolipina. Por otro lado, con el fin de evaluar la capacidad de las subunidades libres de lípidos de interactuar con células del sistema inmune, particularmente con monocitos y macrófagos, se encontró que las subunidades EgAgB8/1 y EgAgB8/3 libres de lípidos son reconocidas por estas células, mientras que la subunidad EgAgB8/2 no presenta unión a los monocitos y es pobremente reconocida por los macrófagos. Asimismo, se pudo determinar que los fosfolípidos que estarían expuestos en la partícula nativa de EgAgB participarían en la unión, posiblemente modificando la forma en que se exponen las subunidades de EgAgB para que sean reconocidas por las células. En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la partícula de EgAgB puede ser reconocida por células del sistema inmune a través de algunas de sus subunidades y el hecho de que en proximidad de una membrana fosfolípica algunas subunidades pueden ser capaces de transferir sus ligandos, apoya la idea de que EgAgB pueda intercambiar lípidos interactuando con células del hospedador.

# **INTRODUCCIÓN**

El presente trabajo se enfocó en la caracterización estructural y funcional de una lipoproteína muy abundante en el parásito cestodo *Echinococcus granulosus*, denominada Antígeno B. En este capítulo se presentan algunas características generales de los helmintos parásitos, y luego se discute la información disponible acerca de la biología de los cestodos, focalizando la información principalmente en el parásito *Echinococcus granulosus*. Finalmente se abordan los aspectos relacionados al conocimiento actual sobre el Antígeno B.

### **1.1. Los helmintos parásitos**

Los helmintos son organismos pertenecientes al Reino Animalia, comúnmente conocidos como gusanos. Son animales invertebrados de cuerpo alargado, sin extremidades, que presentan simetría bilateral. Su tamaño puede variar desde unas pocas décimas de milímetros a varios metros (Brusca & Brusca, 2003). Los helmintos incluyen organismos de vida libre así como organismos parásitos, que en su mayoría se encuentran muy bien adaptados a este tipo de vida y como consecuencia de esta adaptación, presentan grandes diferencias morfológicas y fisiológicas con los organismos de vida libre. Los helmintos parásitos tienen ciclos de vida complejos y son considerados endoparásitos, ya que en general sus estadios infectantes se alojan en órganos internos (principalmente hígado, intestino, estómago, pulmones) de diversos tipos de animales, tanto vertebrados, como invertebrados.

Los helmintos no constituyen un grupo monofilético, dado que comprenden distintos *phyla*; por un lado se encuentran los nematelmintos, conocidos como nematodos o gusanos redondos, y por otro los platelmintos o gusanos planos. Dentro de este último se encuentran dos grupos importantes de helmintos parásitos, los trematodos y los cestodos. Estos grupos de helmintos presentan varias diferencias entre sí en cuanto a su morfología y fisiología, al tipo de hospedador que parasitan e inclusive al número de hospedadores que emplean para completar sus ciclos de vida. En la mayoría de los casos, presentan distintos estadios, sus huevos dan lugar a larvas de morfología y tamaño variable, que a su vez pueden presentar estadios muy diferenciados entre sí en uno o en distintos hospedadores hasta transformarse en adultos. Los hospedadores que alojan la forma adulta de los parásitos se denominan hospedadores definitivos, mientras que aquellos que alojan las distintas formas larvarias se denominan hospedadores intermediarios. Algunas características generales de estos helmintos se comparan en la Tabla 1.1.

**Tabla 1.1.** Comparación entre las principales características morfológicas de los distintos grupos de helmintos parásitos (información adaptada de Castro GA, 1996).

	<b>NEMATODOS</b>	<b>TREMATODOS</b>	<b>CESTODOS</b>
<b>FORMA DEL CUERPO</b>	Cilíndrico	Plano no segmentado	Plano segmentado
<b>CUBIERTA CORPORAL</b>	Cutícula	Tegumento	Tegumento
<b>CELOMA</b>	Presente (pseudoceloma)	Ausente	Ausente
<b>TUBO DIGESTIVO</b>	Completo: con boca y ano	Incompleto: Sin ano, termina en ciego	Ausente
<b>REPRODUCCIÓN</b>	Ambos sexos	Hermafroditas (excepto <i>Schistosoma</i> )	Hermafroditas

Las infecciones causadas por los helmintos no solo provocan daño en el órgano infectado, sino también debido a la competencia por diversos nutrientes con sus hospedadores provocan debilidad produciendo deficiencias en el desarrollo de los animales que parasitan y en algunos casos la muerte. Las infecciones por helmintos tienen gran importancia a nivel sanitario, muchas de ellas afectan al ganado, produciendo graves pérdidas económicas a nivel mundial y en otros casos afectan directamente al hombre, causando graves afecciones. En este sentido, la Organización Mundial de la Salud estima que en todo el mundo 1500 millones de personas, lo que representa casi el 24% de la población mundial, son afectadas por helmintos parásitos transmitidos por el suelo. Este tipo de infecciones se distribuyen en zonas tropicales y subtropicales, especialmente en las zonas de África subsahariana, América y Asia (Organización Mundial de la Salud, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs366/en/>).

A continuación se describirán brevemente algunas de las características en los distintos grupos de helmintos, dirigiendo mayor atención en la información relacionada al grupo de los platelmintos cestodos, ya que es el grupo al que pertenece el parásito *Echinococcus granulosus*.

### 1.1.1. Nematodos

Las principales características de este grupo han sido revisadas por Anderson y colaboradores (Anderson et al., 2009). Muchos nematodos son organismos de vida libre, mientras que otros parasitan distintos tipos de animales y plantas. Dentro de los nematodos parásitos, existen muchos que afectan al hombre, generando importantes

patologías de gran importancia a nivel mundial, principalmente en zonas subdesarrolladas. Algunas de estas patologías y sus prevalencias se resumen en la Tabla 1.2 (Hotez et al., 2008).

**Tabla 1.2.** Distribución y prevalencia de las principales infecciones producidas por nematodos parásitos que afectan al hombre (información adaptada de Hotez et al., 2008).

Enfermedad	Agente etiológico	Prevalencia Global	Regiones de mayor prevalencia
Ascariasis	<i>Ascaris lumbricoide</i>	807 millones	Asia, África y América Latina
Tricuriasis	<i>Trichuris trichiura</i>	604 millones	Asia, África y América Latina
Anquilostomiasis	<i>Necator americanus</i> ; <i>Ancylostoma duodenale</i>	576 millones	Asia, África y América Latina
Estrongiloidiasis	<i>Strongyloides stercoralis</i>	30–100 millones	Asia, África y América Latina
Filariasis linfática	<i>Wuchereria bancrofti</i> ; <i>Brugia malayi</i>	120 millones	India, Sudeste de Asia y África subsahariana
Oncocercosis	<i>Onchocerca volvulus</i>	37 millones	África subsahariana
Loiasis	<i>Loa</i>	13 millones	África subsahariana

Como se comentó anteriormente, los nematodos son gusanos de morfología cilíndrica, cuya cavidad está formada por un pseudoceloma en el que se encuentran inmersos los distintos órganos. Por fuera, están cubiertos por una cutícula, una estructura químicamente compleja y acelular, que le brinda soporte a esta cavidad. Debajo de esta cutícula se encuentran varias capas musculares que les confieren movilidad a estos organismos. Dado que no poseen sistema circulatorio, dependen de estos movimientos para hacer circular el líquido interno ejerciendo presión hidrostática. Los nematodos presentan un sistema digestivo completo que comienza con una boca rodeada en muchos casos de labios, seguida del esófago. A continuación, el intestino recorre el cuerpo de forma axial con una morfología tubular y termina finalmente en un ano. Estos organismos presentan diferenciación sexual y por lo general se observa que las hembras poseen un tamaño mayor que los machos. En la reproducción, el macho fecunda a la hembra generando los huevos embrionados. Estos huevos son eliminados, eclosionan y se produce la liberación de la larva que pertenece al estadio larvario 1 o L<sub>1</sub>. Luego estas larvas van mudando sucesivamente sus cutículas e

incrementando su tamaño, pasando por distintos estadios hasta alcanzar la madurez sexual o adultez (Brusca & Brusca, 2003).

### 1.1.2. Platelminfos

A diferencia de los nematodos, los platelmintos son gusanos aplanados dorso-ventralmente (Brusca & Brusca, 2003). Son organismos acelomados, es decir que presentan una cavidad maciza recubierta de un tegumento. Dependiendo la clase, pueden contener un sistema digestivo incompleto, o carecer del mismo absorbiendo los nutrientes a través del tegumento. Dado que no poseen aparato circulatorio, el fluido intercelular es el encargado de distribuir estos nutrientes y recoger los productos de desecho. La mayoría de estos organismos son hermafroditas, presentando sistemas reproductores complejos. En algunos estadios también puede ocurrir la reproducción asexual. El *phylum* de los platelmintos está compuesto por cuatro clases distintas: turbelarios, monogéneos, trematodos y cestodos. Dentro de estas clases se incluyen organismos de vida libre, como las planarias (turbelarios) y organismos parásitos (monogéneos, trematodos y cestodos). En particular, los monogéneos son parásitos de peces y anfibios, mientras que los trematodos y los cestodos son parásitos de relevancia sanitaria, ya que afectan a diversos animales domésticos y/o de importancia comercial, así como también al hombre (Brusca & Brusca, 2003; Littlewood, 2006). A continuación se describirán brevemente las características principales de los trematodos y posteriormente se profundizará en la información disponible acerca de los cestodos.

#### 1.1.2.1. Trematodos

Los trematodos son platelmintos no segmentados que en su mayoría presentan ciclos de vida complejos, con estadios que afectan a varias especies (Littlewood, 2006). En general, en su estadio adulto son endoparásitos de vertebrados, mientras que en su estadio larvario suelen ser parásitos de moluscos e incluso pueden llegar a tener más de un hospedador intermediario que aloja a distintos tipos de estadios larvarios.

Los trematodos presentan un tubo digestivo incompleto, que comienza con una boca, seguida de la faringe y del intestino, pero no tienen ano (Brusca & Brusca, 2003). Los trematodos son hermafroditas, con excepción de *Schistosoma* spp., en el que existe diferenciación de sexos. Incluso, en este parásito, el macho adopta una

estructura mayormente circular para albergar a la hembra en el sistema vascular de su hospedador definitivo, el hombre. Estas especies de *Schistosoma* producen la enfermedad conocida como esquistosomiasis, que afecta distintas regiones a nivel global, de acuerdo a la especie en particular, como se resume en la Tabla 1.3. Otros trematodos producen otro tipo de enfermedades, conocidas como trematodiasis de transmisión alimentaria, en la que el ser humano se infecta por el consumo de verduras, peces o crustáceos crudos o poco cocidos que albergan las larvas de los distintos parásitos. Entre estas enfermedades se incluyen la clonorquiasis, la opistorquiasis, la paragonimiasis, la fasciolopsiasis y la fascioliasis cuyas prevalencias se resumen en la Tabla 1.3 (Hotez et al., 2008).

**Tabla 1.3.** Distribución y prevalencia de las principales infecciones producidas por trematodos parásitos que afectan al hombre (información adaptada de Hotez et al., 2008).

Enfermedad	Agente etiológico	Prevalencia Global	Regiones de mayor prevalencia
Esquistosomiasis	<i>Schistosoma haematobium</i>	207 millones	África subsahariana
	<i>Schistosoma mansoni</i>		África subsahariana, Brasil
	<i>Schistosoma japonicum</i>		China, Sudeste de Asia
Clonorquiasis	<i>Clonorchis sinensis</i>	> 40 millones	Sudeste de Asia América Latina
Opistorquiasis	<i>Opisthorchis viverrini</i>		
Paragonimiasis	<i>Paragonimus spp</i>		
Fasciolopsiasis	<i>Fasciolopsis buski</i>		
Fascioliasis	<i>Fasciola hepatica</i>		

#### 1.1.2.2. Cestodos

Los cestodos son platelmintos que presentan un cuerpo típicamente alargado con una morfología de cinta (Brusca & Brusca, 2003). Al igual que los trematodos son organismos acelomados que están recubiertos por un tegumento externo. Debido a que no poseen aparato digestivo, el intercambio de los nutrientes y la eliminación de los desechos ocurren a través de este tegumento, por lo que su estructura, está altamente especializada para cumplir con esta función.

Para completar sus ciclos de vida, los cestodos pueden requerir de uno o dos hospedadores distintos (Littlewood, 2006). Salvo algunas excepciones, el estadio adulto de la mayoría de los cestodos es capaz de parasitar exclusivamente el tracto

digestivo de sus hospedadores definitivos, usualmente vertebrados. Por el contrario, los estadios larvarios son capaces de establecerse en diversos órganos de sus hospedadores intermediarios. Los ciclos de vida de los cestodos difieren de una especie a otra, pero el esquema general comienza con la embriogénesis que da como resultado un huevo denominado oncósfera. La oncósfera eclosiona luego de ser ingerida por un hospedador intermediario y migra hasta alcanzar una localización extra-intestinal en diversos órganos, donde se establece como forma larvaria. Cuando la larva es ingerida por un hospedador definitivo se desarrolla en el tracto digestivo del mismo como adulto.

Los cestodos adultos presentan una morfología con distintas secciones, entre las que se diferencian el escólex o cabeza, el cuello y el estróbilo o cuerpo del parásito. En el escólex se encuentran los órganos de fijación a los tejidos del hospedador, tales como el rostelo, las ventosas y los ganchos. El cuello es una región no segmentada de la cual se generan luego los distintos segmentos o proglótides que conforman el estróbilo. En estas proglótides se encuentran los órganos sexuales masculinos y femeninos, dado que los cestodos son organismos hermafroditas. Las proglótides más cercanas al cuello no son maduras sexualmente, mientras que la madurez sexual se va alcanzando a medida que éstas se alejan de esta zona, siendo las últimas las que se encuentran grávidas conteniendo úteros con huevos. Cuando estos huevos se liberan son capaces de infectar a los hospedadores intermediarios para cerrar el ciclo de vida de estos parásitos (Smyth & McManus, 1989).

Al igual que otros helmintos descriptos anteriormente, algunos parásitos cestodos también tienen importancia sanitaria afectando al hombre. Las principales patologías producidas por cestodos y sus prevalencias se resumen en la Tabla 1.4.

**Tabla 1.4.** Distribución y prevalencia de las principales infecciones producidas por platelmintos parásitos que afectan al hombre (información tomada de la Organización Mundial de la Salud, <http://www.who.int/echinococcosis/en/> y <http://www.who.int/taeniasis/en/>).

Enfermedad	Agente etiológico	Prevalencia Global	Regiones de mayor prevalencia
Teniasis/Cisticercosis	<i>Taenia solium</i>	50 millones	Asia, África subsahariana y América Latina
Equinococosis alveolar	<i>Echinococcus multilocularis</i>	>1 millón	Norte de Asia, Europa continental y América del Norte
Equinococosis quística	<i>Echinococcus granulosus</i>		Europa del este y mediterránea, África del norte, América Latina, Asia central

Este trabajo de tesis se centró en el parásito *Echinococcus granulosus*, que constituye uno de los cestodos de gran importancia sanitaria en nuestra región, por causar la infección conocida como equinococosis quística o hidatidosis. Si bien esta infección puede afectar al hombre, que actúa accidentalmente como hospedador intermediario, los ovinos, porcinos, bovinos, caprinos y otros ungulados domésticos son los principales hospedadores intermediarios naturales. Así, la hidatidosis quística tiene un fuerte impacto sobre la salud humana, pero también sobre la salud animal, provocando infecciones en el ganado, lo que conlleva a grandes pérdidas económicas para los productores. A continuación se describirán los aspectos más relevantes de la biología del parásito *Echinococcus granulosus*.

## 1.2. El cestodo *Echinococcus granulosus*

El género *Echinococcus* incluye endoparásitos del *phylum* Platyhelminthes, clase Cestodos, subclase Eucestodos, orden Ciclofilídeos, familia Ténidos. Hasta hace poco tiempo se reconocían cuatro especies en el género, denominadas *E. granulosus*, causante de la equinococosis quística, *E. multilocularis*, causante de la equinococosis alveolar, y de menor relevancia por su incidencia a nivel mundial *E. vogeli* y *E. oligarthrus*, causantes de la equinococosis poliquística. Sin embargo, estudios filogenéticos recientes, basados en la secuencia nucleotídica de todos los genes mitocondriales y de varios genes de proteínas nucleares, han mostrado la existencia de tres nuevas especies denominadas *E. felidis*, *E. ortleppi* y *E. shiquicus* (Nakao et al., 2013). Además, este estudio reveló que *E. granulosus* comprende varias especies mal definidas inicialmente, que han sido diferenciadas como cepas de acuerdo al hospedador intermediario al que mostraban mejor adaptación, tal como se discute más adelante en el ítem 1.2.2. Dado que la comprensión de la filogenia del género *Echinococcus* es muy reciente y aún incompleta, la información disponible sobre la biología y bioquímica de las especies pertenecientes a este género refiere básicamente a las cuatro especies tradicionales. A los efectos de esta tesis, *E. granulosus* sería la especie de interés, por lo cual en adelante nos referiremos a ella de esta manera, aunque por lo anteriormente expuesto debemos mantener en mente que con este nombre estamos englobando a un conjunto de cepas y/o especies. En este sentido, recientemente se ha adoptado la terminología de *Echinococcus granulosus sensu lato (s.l.)* como término general que agrupe a todas las cepas y especies de *E. granulosus* (Spickler, 2011). Para simplificar, salvo que se aclaré

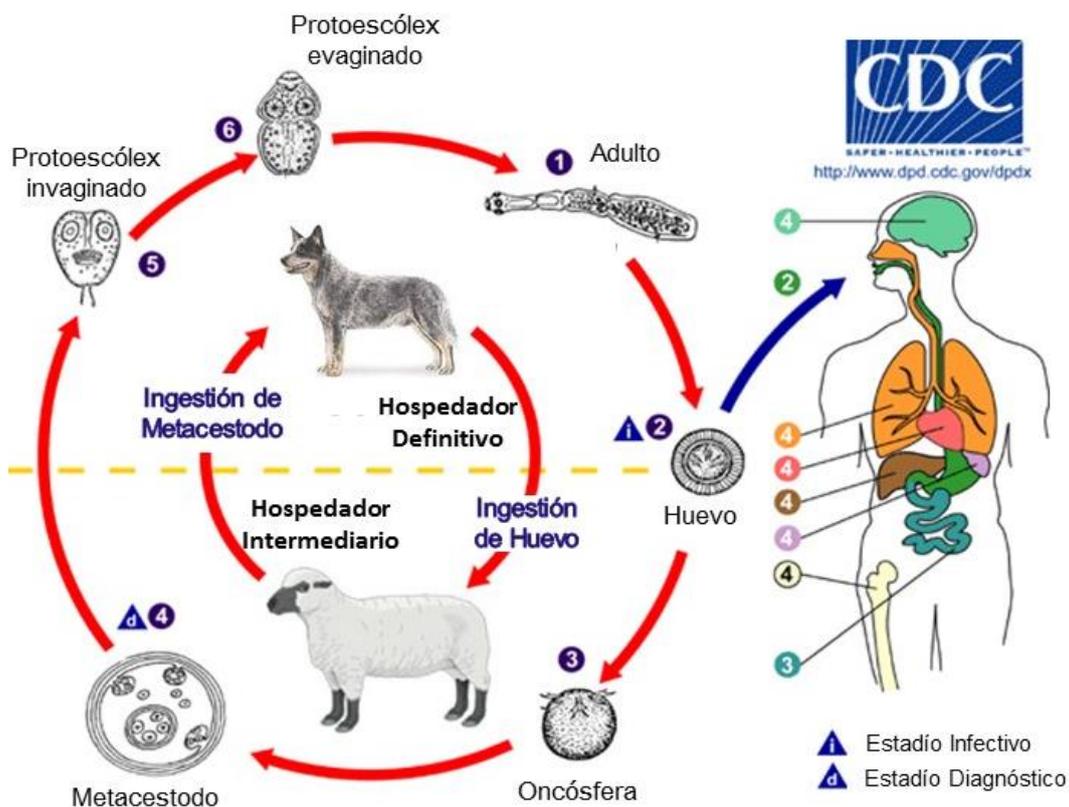
específicamente la cepa, en este trabajo se continuará utilizando el término *E. granulosus*, cuando se refiera a *E. granulosus s.l.*

*E. granulosus* es centro de nuestra atención porque su forma larvaria o metacestodo causa la enfermedad conocida como equinococosis quística o hidatidosis, una zoonosis de tipo endémica o hiper-endémica que afecta a varios animales domésticos, y también al hombre. La enfermedad se transmite a través de un ciclo mantenido entre el perro como hospedador definitivo y distintos ungulados domésticos, principalmente ovinos, porcinos, bovinos y caprinos como hospedadores intermediarios, tal como se detalla en la siguiente sección. Como se comentó anteriormente, el hombre también puede actuar como hospedador intermediario, pero se considera un hospedador accidental, ya que interrumpe el ciclo biológico del mismo. En los hospedadores intermediarios, el metacestodo se establece en el parénquima de un órgano, generalmente hígado o pulmón, generando una estructura quística, denominada quiste hidático. Habitualmente la infección permanece asintomática durante años, hasta que la aparición de complicaciones, como la rotura del quiste o la compresión de los órganos adyacentes, desencadena la sintomatología de la enfermedad, que puede variar según el órgano afectado y el número y tamaño de los quistes presentes.

Finalmente, es importante destacar que la investigación sobre parásitos del género *Echinococcus* cuenta hoy con la ventaja de disponer del genoma de algunas especies, incluyendo *E. granulosus* y *E. multilocularis* (Tsai et al., 2013; Zheng H. et al., 2013), así como también con el transcriptoma de todos los estadios de *E. granulosus* (Parkinson et al., 2012; Zheng H. et al., 2013).

### 1.2.1. Ciclo de vida de *Echinococcus granulosus*

*E. granulosus* presenta un ciclo de vida indirecto, dado que requiere de dos hospedadores para poder completarlo (Thompson, 1986). El hospedador definitivo es un animal carnívoro, generalmente el perro, zorro u otros cánidos, que aloja en su intestino delgado a la forma adulta del parásito, mientras que el hospedador intermediario es un animal herbívoro u omnívoro, incluyendo al hombre y otros ungulados domésticos, que aloja en sus vísceras a la forma larvaria o metacestodo. Un esquema del ciclo de vida de *E. granulosus* se muestra en la Figura 1.1 (<http://www.cdc.gov/parasites/echinococcosis/biology.html>).



**Figura 1.1. Ciclo de vida del parásito *Echinococcus granulosus*.** La forma adulta (1) se establece en el intestino delgado de su hospedador definitivo y genera huevos embrionados que se liberan con las heces. El hospedador intermediario se infecta con estos huevos (2), la oncósfera eclosiona en el intestino (3) y por circulación llega al órgano donde se transforma en metacestodo (hígado y pulmón principalmente). El metacestodo constituye el estadio diagnóstico de la enfermedad (4). El quiste madura y por reproducción asexual genera protoescólices, que son el estadio infeccioso para el hospedador definitivo (5) y (6). El hombre puede actuar como un hospedador intermediario accidental, interrumpiendo el ciclo de vida del parásito. Adaptado de "Centros para el Control y Prevención de Enfermedades" (CDC, <http://www.cdc.gov/parasites/echinococcosis/biology.html>).

El adulto de *E. granulosus* es hermafrodita segmentado en el que cada segmento presenta órganos sexuales masculinos y femeninos. La madurez sexual del adulto se alcanza en el segmento terminal tras 4-5 semanas post-infección, produciendo huevos que se liberan al ambiente junto a las heces del hospedador definitivo. El hospedador intermediario se infecta cuando ingiere alimentos o agua contaminada con los huevos del parásito. Una vez en el intestino, el huevo eclosiona y libera el embrión u oncósfera, que atraviesa la lámina propia y es transportado por los vasos sanguíneos hasta alcanzar diversos órganos o tejidos, generalmente hígado o pulmón, pero también pueden ser riñones, bazo o cerebro. Tras establecerse en ellos, la oncósfera da origen al estadio larvario, metacestodo o hidátide, que se desarrolla como una vesícula unilocular de contenido líquido, el líquido hidático. Cuando el metacestodo alcanza la fertilidad, genera por reproducción asexual los protoescólices, que constituyen el

estadio infectivo para el hospedador definitivo. Cuando éste ingiere vísceras de animales infectados, los protoescolices se establecen en el intestino delgado y se diferencian a adulto, cerrando así el ciclo de vida del parásito. Es por ello que si bien el hombre puede actuar como hospedador intermediario alojando al metacestodo en sus vísceras, se considera un hospedador accidental, dado que interrumpe el ciclo de vida natural del parásito, con excepción de algunas regiones de África donde el ciclo puede ser mantenido debido a la existencia de carnívoros salvajes (Macpherson, 1983; McManus et al., 2003).

Las otras especies de *Echinococcus* presentan ciclos de vida similares, en el caso de *E. multilocularis*, causante de la equinococosis alveolar, el hospedador definitivo suele ser el zorro mientras que la larva se desarrolla en distintos tipos de roedores, aunque de forma menos común el hombre también puede actuar como hospedador intermediario. A diferencia de *E. granulosus*, la larva de *E. multilocularis* se mantiene en un estado proliferativo de forma indefinida, generando pequeños quistes alveolares que se pueden extender hacia otros órganos por metástasis, pudiendo provocar la muerte del hospedador. Los parásitos *E. vogeli* y *E. oligarthrus*, suelen emplear roedores como hospedadores intermediarios, mientras que el hospedador definitivo suele ser el perro o perro de monte (*Speothos venaticus*) en el caso de *E. vogeli* y felinos salvajes en el caso de *E. oligarthrus*. Sin embargo, si bien estos parásitos también pueden afectar al hombre, lo hacen en mucho menor medida que *E. granulosus* y *E. multilocularis* (McManus et al., 2003).

### 1.2.2. Especies y cepas comprendidas dentro de *Echinococcus granulosus*

Como se comentó previamente, con el nombre de *E. granulosus* se engloban varias especies, algunas no bien definidas todavía, y que tradicionalmente han sido diferenciadas como variantes genotípicas o cepas distintas, de acuerdo a su morfología, grado de desarrollo, virulencia, adaptación a diferentes hospedadores y alcance geográfico, entre otros factores. A las distintas cepas se les han asignado genotipos, denominados G1 a G10. Los genotipos G1, G2 y G3, si bien muestran algunas diferencias entre ellos, constituirían la especie ahora denominada *E. granulosus sensu stricto* (*E. granulosus s.s.*). El genotipo G1 es uno de los más relevantes, ya que está ampliamente distribuido a nivel mundial y se asocia con la existencia de un alto porcentaje de quistes fértiles ubicados principalmente en hígado y pulmón. Si bien el genotipo G1 afecta un amplio rango de hospedadores intermediarios, se lo llamó cepa oveja, puesto que está muy bien adaptado a este

hospedador. También puede infectar a otros ungulados domésticos; de hecho suele infectar bovinos, aunque muchas veces se asocia a quistes infértiles, es decir sin protoescólices. Este genotipo es uno de los más importantes en nuestra región, encontrado frecuentemente en casos de hidatidosis humana. El genotipo G2 o cepa oveja de Tasmania también utiliza a la oveja como hospedador y ha sido encontrado en casos de hidatidosis humana, mientras que el genotipo G3 parece afectar al búfalo, aunque también se ha encontrado en bovinos. Por otra parte, los genotipos G4 (caracterizado por infectar equinos y no ser zoonótico aparentemente) y G5 (caracterizado por infectar bovinos), serían especies diferentes denominadas *E. equinus* y *E. ortleppi*, respectivamente. El genotipo G6 o cepa camello, el genotipo G7 o cepa cerdo, los genotipos G8 y G10 (cepas cérvido) y el genotipo G9 han sido propuestos como *E. canadensis*. Sin embargo, el genotipo G9 ha sido muy poco definido y algunos autores lo consideran una variante del genotipo G7. Algunas de estas cepas están pobremente definidas y posiblemente existan cepas adicionales. En conjunto, de esta información se desprende que existe actualmente una gran polémica en cuanto al estatus taxonómico de las cepas tradicionales de *E. granulosus*. Como se ha comentado antes, actualmente el término *E. granulosus* s.l agrupa las distintas cepas y especies de *E. granulosus* anteriormente mencionadas (Spickler, 2011).

### 1.2.3. Morfología de *Echinococcus granulosus*

#### 1.2.3.1. Adulto

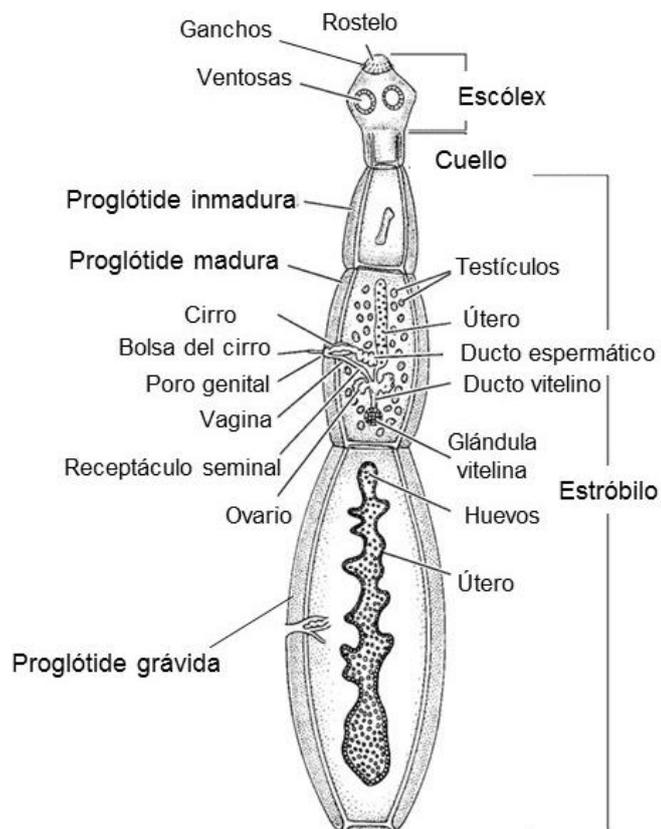
El adulto maduro de *E. granulosus* tiene un tamaño aproximado de entre 2 y 6 mm de longitud. La región correspondiente a la cabeza o escólex presenta cuatro ventosas y una protuberancia en el extremo anterior, denominada rostelo, que contiene una doble corona de ganchos. Estas estructuras le permiten al parásito la fijación al intestino delgado del perro. Luego del escólex sigue la región del cuello, una región más estrecha que une el escólex con el cuerpo o estróbilo del parásito. El estróbilo está luego formado por tres proglótides distintas que se diferencian de acuerdo a su madurez sexual, siendo la más cercana al cuello la más inmadura. En la Figura 1.2 se muestra un esquema de un individuo adulto (Brusca & Brusca, 2003).

Como se comentó anteriormente, *E. granulosus* carece de tubo digestivo, por lo cual la adsorción de todos los nutrientes se realiza a través del tegumento. Por este motivo, el tegumento presenta una estructura altamente especializada en la absorción, compartiendo características con las células de la mucosa intestinal de los mamíferos

(Smyth & McManus, 1989). La ultraestructura del tegumento se discutirá más adelante en esta sección (ver ítem 1.3.1). Debajo del tegumento se ubica una capa de músculos longitudinales y circulares no estriados.

En cuanto al sistema nervioso de *E. granulosus*, el mismo está constituido por un complejo de ganglios ubicado en el escólex, mientras que las fibras nerviosas se extienden a lo largo de las proglótides. El estudio del sistema nervioso de los cestodos en general ha mostrado que la serotonina actuaría como un neurotransmisor excitatorio (Smyth & McManus, 1989; Camicia et al., 2013), mientras que la acetilcolina actuaría como un neurotransmisor inhibitorio (Smyth & McManus, 1989).

El sistema de excreción del adulto es del tipo protonefridial formado por células flamíferas que introducen los desechos extracelulares mediante sus movimientos en un sistema de túbulos que convergen en cuatro canales excretores, dos laterales, uno ventral y uno dorsal (Smyth & McManus, 1989).



**Figura 1.2. Esquema del gusano adulto de *Echinococcus granulosus*.** El parásito adulto está formado por un escólex, seguido de la región del cuello y luego por el estróbilo formado por tres proglótides con distintos estados de maduración. En éstas se encuentran los órganos sexuales masculinos y femeninos a través de los cuales se generan los huevos por reproducción sexual. La proglótide grávida que contiene estos huevos es la más distante del escólex y finalmente será liberada para su eliminación con las heces del hospedador definitivo. Se indica en la figura las distintas estructuras del parásito. Adaptado de Brusca & Brusca, 2003.

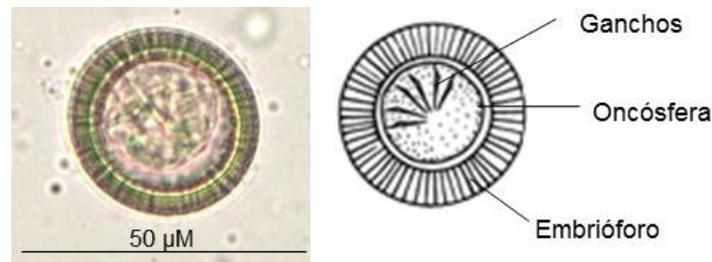
En *E. granulosus* la reproducción sexual puede ocurrir por auto-inseminación, en la que el órgano sexual masculino, denominado cirro, se introduce en la vagina de una misma proglótide. A diferencia de otros cestodos, la auto-inseminación de un mismo individuo, pero en distintas proglótides no ha sido reportada en *E. granulosus*, posiblemente debido a que este parásito no presenta un gran número de proglótides y a que éstas se encuentran en distintos estados de maduración (Kumaratilake et al., 1986). La inseminación cruzada entre distintos individuos tampoco parece ocurrir en *E. granulosus*, e incluso se conoce la existencia una membrana tegumentaria que recubre el poro genital, previniendo que el cirro emerja hacia el exterior (Smyth & McManus, 1989). Mediante esta forma de reproducción sexual se generan los huevos que se conservan en el útero del parásito adulto generando la proglótide grávida. Esta proglótide grávida es finalmente liberada junto con las heces del hospedador definitivo para liberar los huevos al ambiente, dónde quedan disponibles para ingresar al hospedador intermediario. Los huevos contienen dentro a la oncósfera, su morfología se describirá a continuación.

#### 1.2.3.2. Huevo

El huevo de *E. granulosus* presenta una forma ligeramente ovoide, casi esférico, con aproximadamente unos 30  $\mu\text{M}$  de diámetro. A diferencia de los huevos de otros cestodos, no presentan una capsula embriónica vitelina, dado que por lo general la pierden antes de ser liberados con las heces. Sin embargo, poseen una gruesa capa externa formada por bloques de queratina, denominada embrióforo, que le brinda protección física al embrión u oncósfera presente dentro del huevo. Gracias a esta capa los huevos son sumamente resistentes a las condiciones climáticas adversas; de hecho se ha encontrado que son capaces de sobrevivir bajo tierra durante períodos mayores a un año (Smyth & McManus, 1989). La oncósfera es un embrión formado por células glandulares, musculares y germinales que posee tres pares de ganchos, razón por la cual se denomina embrión hexacanto (Holcman et al., 1994). En la Figura 1.3 se muestra la imagen y un esquema del huevo de *E. granulosus*, donde se indican estas estructuras.

La eclosión del huevo ocurre una vez que este es ingerido por el hospedador intermediario. El primer paso para que ocurra la eclosión es la desintegración de los bloques de queratina que forman el embrióforo, lo cual ocurriría por acción de las enzimas digestivas. Sin embargo, para que la oncósfera se torne infectiva debe sufrir un proceso de activación que no se conoce con exactitud, donde debe emerger de la

membrana oncósfera que la recubre, proceso que en muchos casos se ve favorecido por la acción de la bilis (Smyth & McManus, 1989).



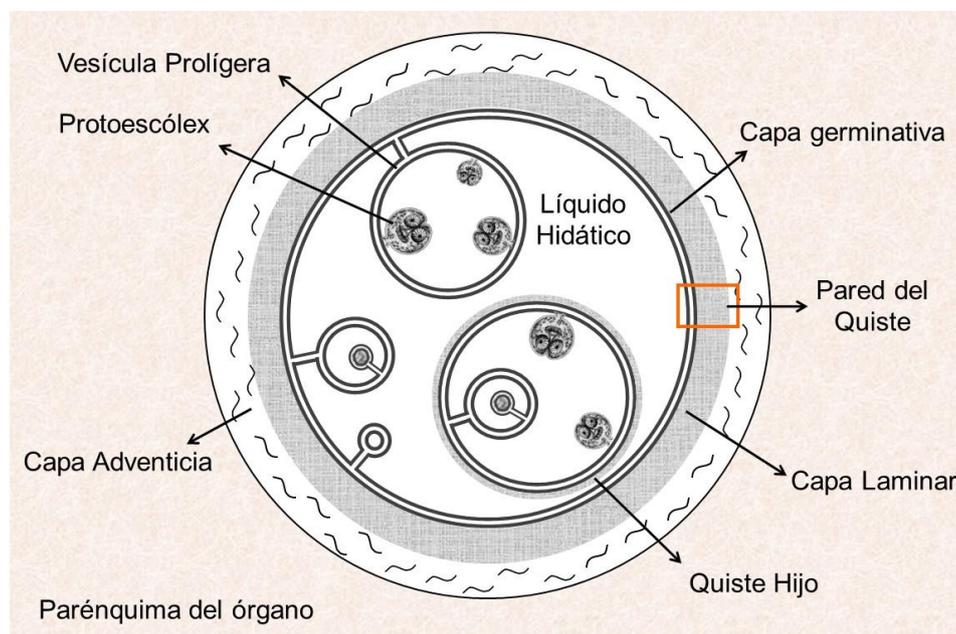
**Figura 1.3. Imagen y esquema del huevo de *Echinococcus granulosus*.** El huevo de *E. granulosus* presenta una capa externa denominada embrióforo, formada por bloques de queratina que le dan un aspecto radial. Hacia el interior de esta capa se encuentra la oncósfera o embrión hexacanto, denominado de este modo porque posee tres pares de ganchos. La fotografía del huevo fue tomada del Banco de Imágenes de la Universidad Complutense de Madrid (<http://escalera.bio.ucm.es/recursos/bioimagen>).

Una vez liberada, la oncósfera es capaz de penetrar las vellosidades intestinales y a través de los vasos sanguíneos llegar hasta el hígado, dónde generalmente se establece. En otros casos llega hasta la vena suprahepática y mediante circulación a través de la aurícula y ventrículo derecho puede alcanzar los pulmones y establecerse allí. En casos menos frecuentes, puede alcanzar la aurícula y ventrículo izquierdo y llegar así hacia otras vísceras menos comunes. En estos órganos la oncósfera se establece generando el estadio larval o metacestodo, estadio causante de la hidatidosis, cuya morfología se describirá a continuación.

#### 1.2.3.3. Metacestodo

El metacestodo, hidátide o estadio larval de *E. granulosus* consiste en una vesícula unilocular de forma casi esférica que contiene dentro el líquido hidático. Esta vesícula está delimitada por la pared de quiste, una estructura compuesta por dos capas. La capa más externa, denominada capa laminar, es acelular y es generada por las células de la capa más interna, denominada capa germinativa. A su vez, a partir de la capa germinativa se generan por gemación estructuras denominadas vesículas prolíferas, en las que se generan los protoescólices, que luego constituirán el estadio infectivo para el hospedador definitivo. En algunos casos, si el metacestodo es lo suficientemente grande puede contener dentro quistes hijos que presentan el mismo tipo de estructura. Por fuera del metacestodo existe una capa perteneciente al hospedador, denominada capa adventicia. El metacestodo rodeado de la capa

adventicia es lo que se conoce como quiste hidático. En la Figura 1.4 se muestra un esquema dónde se indican estas estructuras.



**Figura 1.4. Esquema del metacestodo de *Echinococcus granulosus*.** La estructura del metacestodo puede asemejarse a un saco de contenido líquido. Está delimitado por una pared, formada por una capa externa acelular, la capa laminar, y por una interna celular, la capa germinativa. A partir de la capa germinativa surgen por gemación las vesículas prolíferas conteniendo los protoescolices. El líquido en su interior se conoce como líquido hidático, colecta los productos de secreción y excreción del parásito y también moléculas del hospedador que logran atravesar la pared de la larva. Por fuera de la larva se encuentra rodeada de una capa perteneciente al hospedador, la capa adventicia. El metacestodo rodeado de la capa adventicia se conoce como quiste hidático. Este quiste se encuentra inmerso en el parénquima de un órgano, por lo general hígado o pulmón. Muchas veces el quiste puede contener dentro quistes hijos, que presentan el mismo tipo de estructura.

La capa laminar que rodea al metacestodo es la encargada de brindarle resistencia y soporte, así como también de mantener a las células del parásito alejadas del sistema inmune del hospedador. Esta capa es sintetizada por las células de la capa germinativa y estructuralmente está formada por una red o malla tridimensional compuesta por un componente fibrilar rico en mucinas decoradas con O-glicanos compuestos por galactosa, N-acetilgalactosamina y N-acetilglucosamina, y un componente granular formado mayoritariamente por *myo*-inositol hexakisfosfato cálcico (Díaz et al., 2011). Esta malla tridimensional permite el intercambio de nutrientes y productos de desecho entre el interior y el exterior del metacestodo, dado que permite el pasaje de macromoléculas de hasta 150 kDa (Coltorii & Varela-Díaz, 1974). Los mecanismos que regulan este transporte son aún desconocidos.

La capa germinativa está formada por un sincitio celular distal con una estructura similar a la estructura tegumentaria del parásito adulto. La porción en contacto con la capa laminar está compuesta por extensiones denominadas microtriquias que se insertan en la misma, mientras que en la región más distal se encuentran células del tegumento, células musculares, células nerviosas (Koziol et al., 2013), células de reserva de glucógeno y células indiferenciadas. A medida que la larva madura las células indiferenciadas proliferan, originando pequeñas vesículas que crecen hacia el interior del metacestodo, denominadas vesículas prolíferas. Estas vesículas aumentan de tamaño y dentro de ellas se generan los protoescólices por reproducción asexual. Tanto las células de la capa germinativa, como los protoescólices son metabólicamente activos, generando diversos productos de excreción-secreción que son vertidos al líquido que se encuentra en el interior del quiste, el líquido hidático.

El líquido hidático está formado por una mezcla compleja de glicoproteínas, lipoproteínas, hidratos de carbono y sales minerales. Si bien muchos de estos componentes son producidos por el propio parásito, debido a la permeabilidad de la capa laminar que se comentó anteriormente, también se encuentran componentes del hospedador (Aziz et al., 2011), principalmente albúmina e inmunoglobulinas.

Cuando la larva contiene protoescólices en su interior, se considera que el parásito ha alcanzado la fertilidad. Muchas veces, cuando el parásito no se encuentra bien adaptado a su hospedador intermediario, el metacestodo no es capaz de generar protoescólices y se considera que es infértil, aunque no se conoce con exactitud los mecanismos que regulan estos procesos. De hecho, en general se asocia la adaptación del parásito al hospedador con su capacidad de regular la respuesta inmune temprana generada por el mismo. Como resultado de la resolución de esta respuesta temprana se forma una estructura de tipo fibrosa, compuesta mayoritariamente por colágeno, la capa adventicia, que envuelve al metacestodo formando el quiste hidático. Esta capa en general se asocia con un proceso de adaptación al hospedador exitoso, que culmina con la formación de quistes fértiles, mientras que si la adaptación al hospedador no es buena, la inflamación temprana evoluciona generando una estructura del tipo granuloma con infiltración de leucocitos, y se forman quistes infértiles, incluso llevando a la muerte del metacestodo.

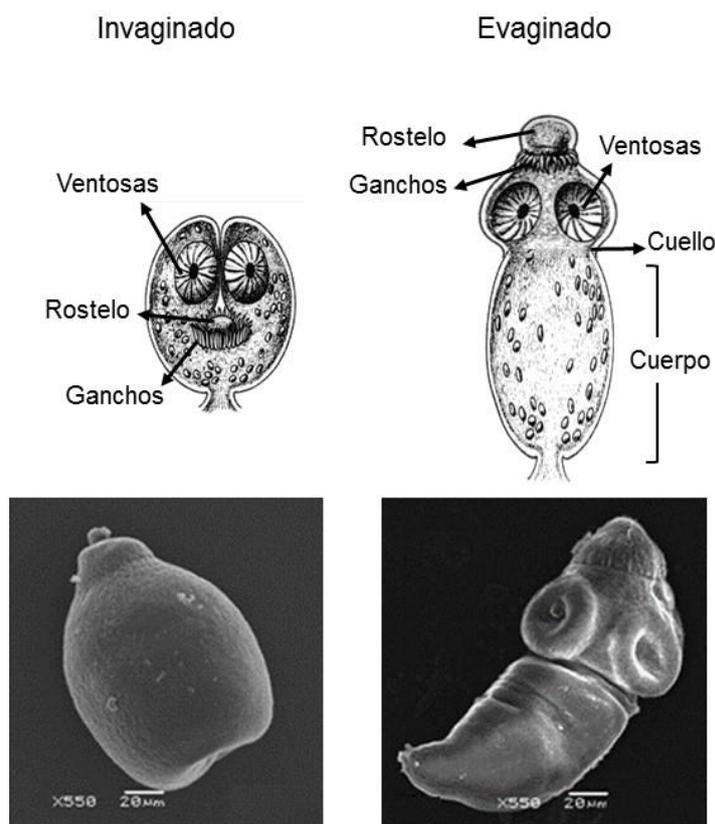
Los protoescólices presentan una gran plasticidad en cuanto a su capacidad de desarrollo; pudiendo desarrollarse en dirección estrobilar, dando lugar al estadio adulto en el hospedador definitivo o en dirección vesicular generando nuevos metacestodos en el hospedador intermediario. Los mecanismos moleculares que gobiernan esta diferenciación no han sido esclarecidos. La formación de nuevos metacestodos en el

hospedador intermediario, conocida como infección secundaria, puede ocurrir si los protoescolices son liberados, por ejemplo cuando se produce alguna rotura del quiste (Smyth & McManus, 1989). Muchas veces estos quistes secundarios pueden localizarse en otros órganos. Esto ha permitido generar modelos de infección secundaria en animales, herramienta ampliamente utilizada para el estudio de la infección provocada por *E. granulosus* (Breijo et al., 1998). A continuación se describirá la morfología de los protoescolices.

#### 1.2.3.4. Protoescolix

Los protoescolices surgen en el metacestodo de *E. granulosus* mediante gemación aproximadamente entre los 10 y 16 meses luego de la infección. Su proceso de formación es asincrónico, pudiéndose encontrar protoescolices con diferentes niveles de diferenciación dentro de las vesículas prolíferas. Por lo general, durante su formación quedan unidos a la membrana germinal a través de un pedúnculo, y finalmente se separan una vez que se encuentran totalmente desarrollados, quedando suspendidos en el líquido hidático (Galindo et al., 2002).

Morfológicamente, los protoescolices presentan un rostelo con una doble corona de ganchos y cuatro ventosas que dentro del metacestodo normalmente se encuentran invaginados. Su cuerpo está recubierto por un tegumento similar al del parásito adulto y al de la capa germinativa del metacestodo. Cuando el metacestodo es ingerido por el hospedador definitivo, los protoescolices se liberan y en el tracto digestivo se transforman en evaginados, quienes luego darán lugar al parásito adulto en el intestino delgado. Sin embargo, tal como se comentó previamente, en el hospedador intermediario también pueden dar lugar a la formación de nuevos metacestodos, presentando por lo tanto una capacidad de diferenciación excepcional (Smyth & McManus, 1989). Si bien se cree que existen factores propios de uno u otro tejido, capaces de modular esta diferenciación, no se conocen con exactitud los mecanismos que la gobiernan (Thompson, 1986). Un esquema de la morfología de los protoescolices invaginados y evaginados se muestra en la Figura 1.5.

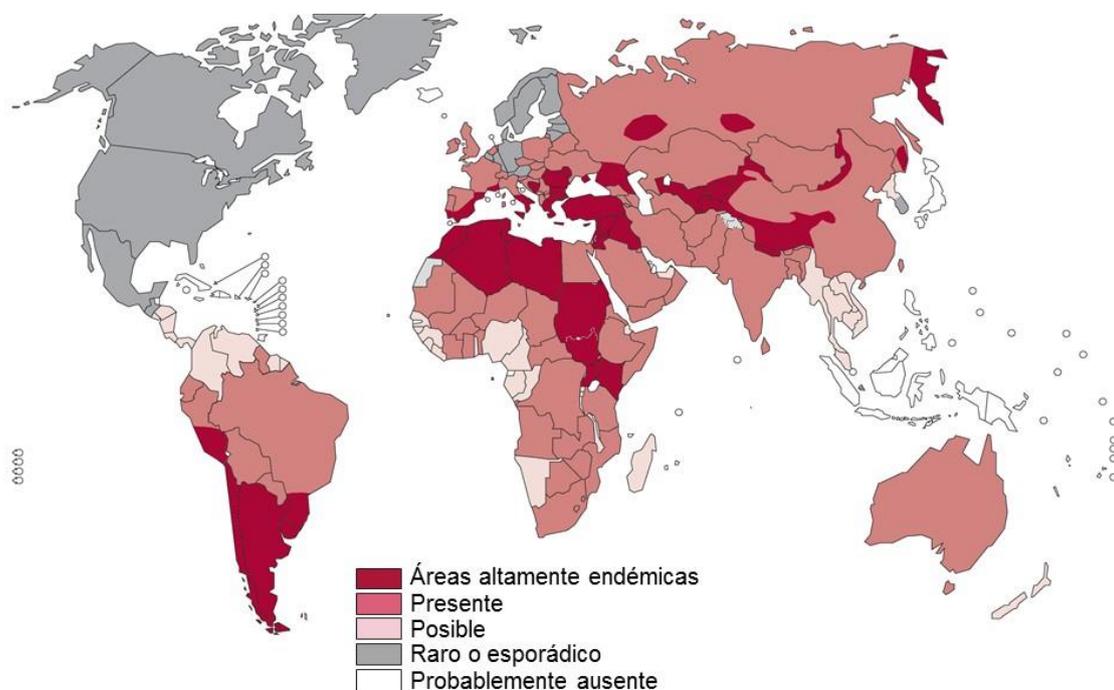


**Figura 1.5. Esquema del protoescólex de *Echinococcus granulosus*.** El protoescólex está formado por un rostellum con doble corona de ganchos y cuatro ventosas, que puede encontrarse invaginado sobre sí mismo o evaginado. Esquema adaptado del centro de Recursos de Imágenes de Medicina Tropical (<http://tmcr.usuhs.edu/tmcr/chapter3/epidemiology6.htm>). Las imágenes de abajo fueron obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido y fueron adaptadas de Ceballos et al., 2011.

#### 1.2.4. Distribución geográfica de *Echinococcus granulosus*

El parásito *E. granulosus* se encuentra presente en todos los continentes, con excepción de muy pocos países, como se puede apreciar en la última distribución geográfica publicada por la Organización Mundial de la Salud en el año 2011, que se observa en la Figura 1.6. Sin embargo, distintas cepas o especies han sido reportadas con una distribución geográfica variable entre ellas. Como se comentó anteriormente, la cepa oveja o genotipo G1 es cosmopolita, se encuentra presente en Europa, Medio Oriente, África, Asia, Australia, Nueva Zelanda, América Latina y América del Norte. En América del Norte, el genotipo G1 principalmente se ha encontrado en el este de EEUU. El genotipo G2 en un principio se encontró limitado a la región geográfica de Tasmania, en Australia, sin embargo actualmente también ha sido identificado en Asia, América Latina, África y Europa. El genotipo G3 se ha encontrado en Asia y Europa y se sabe que el genotipo G4 (*E. equinus*) se encuentra en Europa, el Medio Oriente y

África. El genotipo G5 (*E. ortleppi*) se ha reportado en Europa, África, Asia y América Latina. El genotipo G6 se ha documentado en Medio Oriente, África, Asia y América Latina. El genotipo G7 o cepa cerdo ha sido identificado en Europa, Rusia y América Latina, mientras que el genotipo G9, estrechamente relacionado, solamente se ha informado desde Polonia. Los genotipos G8 y G10 se encuentran en América del Norte, principalmente en Canadá y al norte de EEUU, al igual que en Eurasia. Por último, se cree que *E. felidis* o cepa león solamente se produce en África. Sin bien estos datos brindan información sobre la distribución de las distintas cepas en el mundo, durante los últimos años se han empleado diversas técnicas de biología molecular para la identificación de los distintos genotipos y especies, por lo que es probable que estos alcances geográficos aún estén incompletos (Spickler, 2011).



**Figura 1.6. Distribución geográfica del parásito *Echinococcus granulosus*.** Este parásito se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial, con alta prevalencia en la zona Mediterránea de Europa, en Asia (especialmente en Rusia y China), en la zona norte y este de África y en la zona sur de América Latina. Adaptado del sitio web de la Organización Mundial de la Salud. Distribución correspondiente al año 2011 (<http://www.who.int/echinococcosis/en/>).

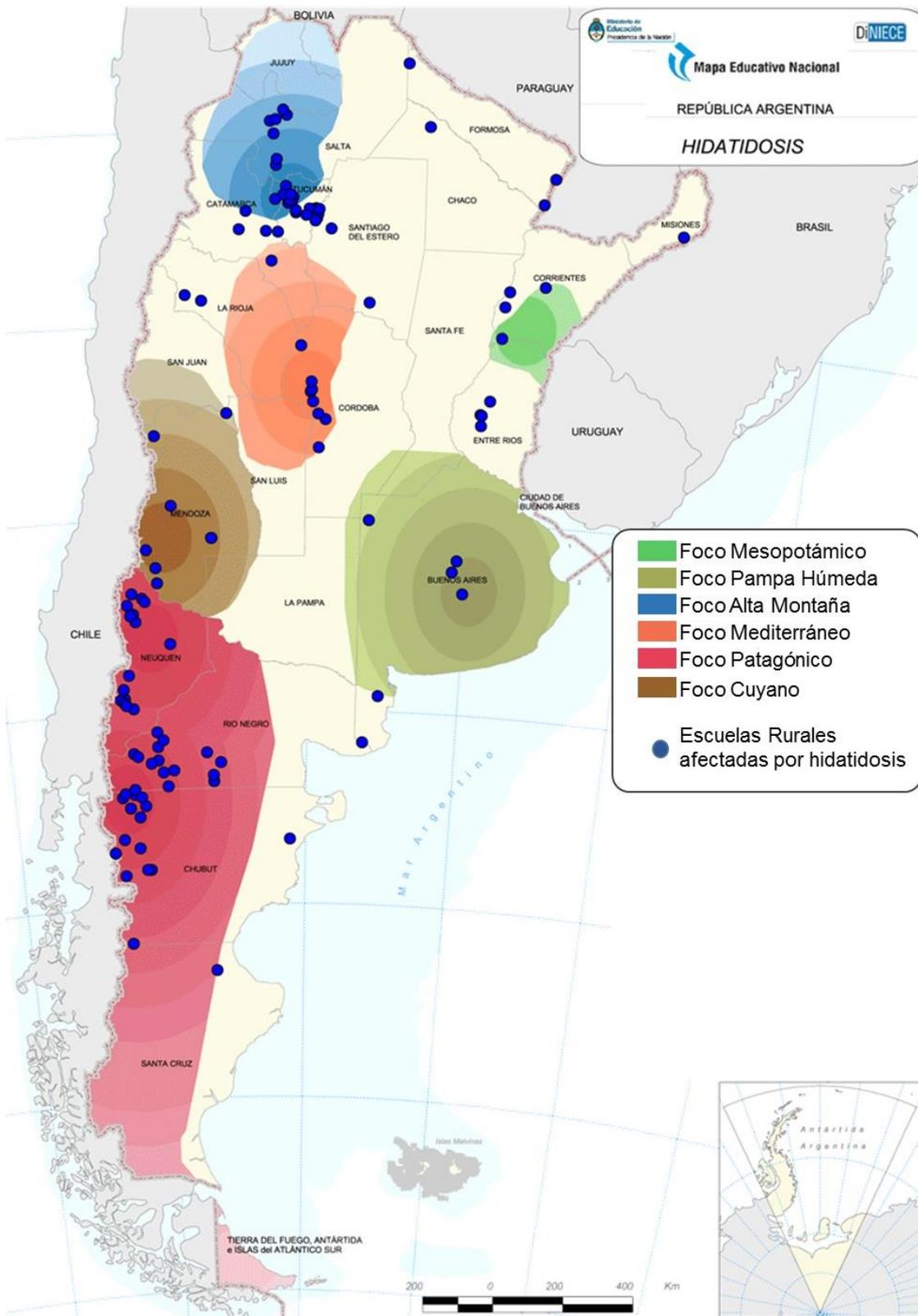
### 1.2.5. Importancia de la hidatidosis en nuestra región

En América Latina la hidatidosis se encuentra en la mayoría de los países, pero en Argentina, Chile, Bolivia, Perú, Uruguay y en el sur de Brasil esta enfermedad constituye un importante problema de salud pública, siendo una de las mayores

enfermedades zoonóticas presentes. Además de ser un importante problema de salud, la hidatidosis provoca elevadas pérdidas económicas, no solo en el sistema de salud debido a los costos de internación y tratamiento de los pacientes, sino también en la producción animal, debido a las vísceras decomisadas y disminución en la producción de lana, leche y carne (Moral, 2012).

En nuestra región se han encontrado las cepas oveja (G1), oveja de Tasmania (G2), bovina (G5), camello (G6) y cerdo (G7). Estas cepas pueden poseer períodos de prepatencia de diferente magnitud y diferente infectividad para el hombre. Particularmente en Argentina, se han identificado focos endémicos importantes en distintas regiones, como el área Patagónica (Tierra del Fuego, Santa Cruz, Chubut, Río Negro y Neuquén), el área de la Pampa Húmeda (Buenos Aires, sur de Santa Fe y Córdoba), el área Mediterránea (noreste de Córdoba, La Rioja, norte de San Luis y San Juan, sur de Catamarca y Santiago del Estero), el área Mesopotámica (Corrientes ubicado al sur del río Corrientes y el norte de Entre Ríos), el área Cuyana (Mendoza y el oeste de San Juan) y el área de Alta Montaña (Tucumán, Salta, Jujuy y noroeste de Catamarca); como se muestra en la Figura 1.7.

Actualmente en algunos de los países afectados existen políticas de control y vigilancia tendientes a disminuir la prevalencia de esta enfermedad en la región, como por ejemplo el Proyecto Subregional Cono Sur de Control y Vigilancia de la Hidatidosis de la Organización Panamericana de la Salud. Estas políticas incluyen la administración de drogas (praziquantel) para desparasitar a los perros, el control de las faenas para evitar la alimentación de perros con vísceras crudas de animales infectados y el control de las poblaciones caninas; así como programas de vigilancia epidemiológica de perros infectados y tamizajes serológicos en las poblaciones de riesgo. Sin embargo, a pesar de estos esfuerzos, ninguna de las zonas endémicas ha logrado la erradicación de la enfermedad (Larrieu et al., 2004; Larrieu & Zanini, 2012). Esto se debe principalmente a deficiencias en la infraestructura necesaria para administrar praziquantel a los perros en zonas rurales ocho veces al año durante varios años. Tal infraestructura no ha sido sostenible desde el punto de vista económico o político en las zonas endémicas, que tienden a ser las más pobres (Larrieu & Zanini, 2012). Por otro lado, actualmente se está implementando una vacuna recombinante para los hospedadores intermediarios, basada en antígenos provenientes de la oncosfera, denominada EG95 (Jabbar et al., 2011). La quimioterapia preventiva y la vacunación, sumadas a la continuidad y mejora de los programas educativos previamente establecidos, podrían mejorar la evolución disminuyendo la incidencia de esta importante enfermedad en nuestra región (Larrieu & Zanini, 2012).



**Figura 1.7. Focos de Hidatidosis en Argentina.** La hidatidosis se encuentra distribuida a lo largo y ancho de todo el país, principalmente asociada a zonas rurales, presentando algunos focos hiperendémicos. Adaptado del sitio web Programa Nacional Mapa Educativo (<http://www.mapaeducativo.edu.ar/Atlas/Hidatidosis>).

### 1.2.6. Diagnóstico y tratamiento de la hidatidosis

Actualmente el diagnóstico de la hidatidosis se realiza principalmente a través de técnicas de imágenes, como ultrasonido, radiología, tomografía o resonancia magnética nuclear (Spickler, 2011). Para confirmar el diagnóstico es necesario aplicar técnicas serológicas, utilizando enzimoimmunoensayos (ELISA), inmunofluorescencia indirecta, hemaglutinación indirecta y *Western-Blot* (Edwards, 1999). Para ello se pueden utilizar antígenos crudos o semi-purificados de *E. granulosus* obtenidos de líquido hidático o de protoescolices. Dentro de las proteínas del líquido hidático empleadas para el diagnóstico se encuentran el Antígeno 5 y el Antígeno B (Larrieu et al., 2004). Sin embargo, en pacientes que no presentan sintomatología, la serología no suele dar buenos resultados en cuanto a la detección de la enfermedad. En otros casos el diagnóstico puede confirmarse mediante técnicas de detección de ADN parasitario en muestras obtenidas por remoción quirúrgica empleando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) (Spickler, 2011).

Una vez confirmada la enfermedad, el tratamiento con mayor frecuencia es la extracción quirúrgica. Sin embargo, el índice de éxito puede variar de acuerdo a la ubicación, el tamaño y la fertilidad del quiste. Por lo general, el tratamiento quirúrgico es acompañado de un tratamiento post-quirúrgico con drogas antihelmínticas de amplio espectro, como mebendazol o albendazol (Spickler, 2011). Por otro lado, en los últimos años se ha puesto en práctica un tratamiento menos invasivo, conocido como PAIR (Punción-Aspiración-Inyección-Re-aspiración). Brevemente, esta técnica consiste en la aspiración del contenido del quiste, seguido de la introducción de un químico antihelmíntico o escólicida dentro del mismo y finalmente una cirugía laparoscópica. El uso de estas técnicas ha permitido acortar en gran medida el período de internación de los pacientes (Larrieu & Zanini, 2012; Spickler, 2011).

No obstante, dada la alta prevalencia de la hidatidosis en nuestra región, sería beneficioso contar con nuevas drogas que permitan el tratamiento específico de la enfermedad para evitar el uso de terapias invasivas. Sin embargo, para ello es de imperiosa necesidad conocer con mayor profundidad los aspectos relevantes en cuanto a la biología del parásito y a los factores que favorecen su establecimiento, con el fin de desarrollar estrategias que permitan interferir con su desarrollo y permanencia en el hospedador.

### 1.3. Metabolismo de *Echinococcus granulosus* y otros cestodos

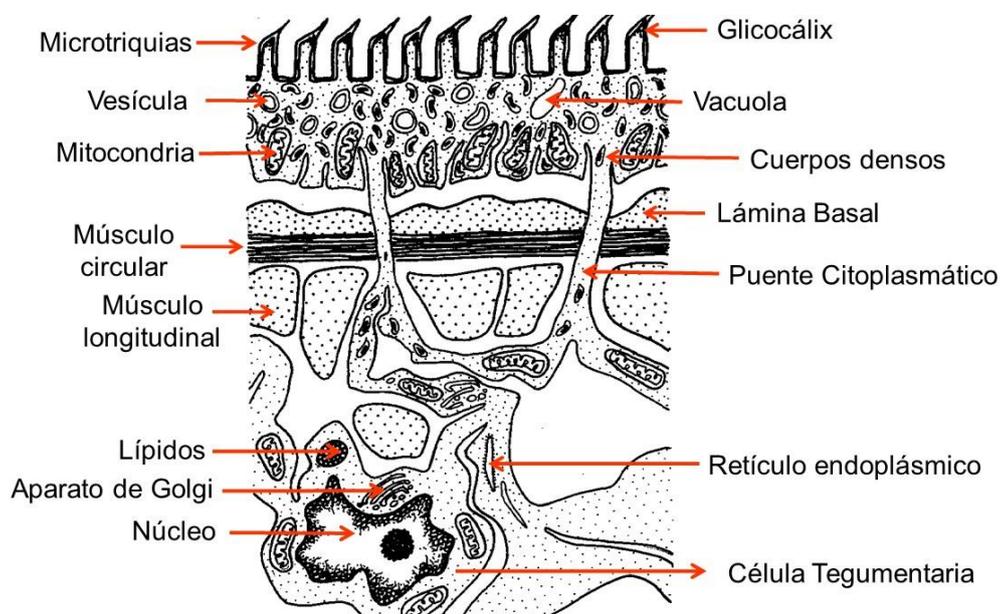
Como ya se mencionó, avanzar en el conocimiento general de la biología de este parásito tiene interés no sólo desde un punto de vista básico, sino porque esta información podrá eventualmente ser útil para el diseño de estrategias que pretendan interferir con la instalación, crecimiento o maduración del parásito. El foco de interés en este trabajo fue el Antígeno B, una proteína que une lípidos, muy abundante en el líquido hidático. A continuación se describirán los aspectos fundamentales en cuanto al metabolismo general y particularmente al metabolismo lipídico del parásito que explican la importancia de esta proteína. Dado que la información disponible sobre *E. granulosus* es muy limitada, gran parte del conocimiento existente deriva del estudio de otros cestodos, tal como se discute en forma integrada a continuación.

#### 1.3.1. Obtención de los nutrientes y características generales del metabolismo de los cestodos

Como se ha comentado previamente, los cestodos carecen de sistema digestivo. En su lugar, poseen una superficie externa, el tegumento, que además de cumplir funciones de recubrimiento y protección tiene gran importancia por su papel en la absorción de nutrientes. Las características estructurales y funcionales que se describen a continuación han sido revisadas por Smyth y McManus; en la Figura 1.8 se observa un esquema con estas estructuras (Smyth & McManus, 1989).

El tegumento es un sincitio organizado en dos zonas, una zona superficial anucleada y una zona citoplasmática nucleada. En la región más superficial está cubierto de extensiones citoplasmáticas, variables en tamaño y número, conocidas como microtriquias. Las microtriquias pueden ser comparadas con las microvellosidades intestinales, en este caso su función también es amplificar el área superficial para la absorción. En el caso de *E. granulosus*, la estructura de la región correspondiente al tegumento es similar en el parásito adulto, en el protoescólex y en la capa germinativa del metacestodo. El tegumento de los cestodos contiene sistemas específicos para el transporte de moléculas e iones, particularmente aminoácidos, azúcares, vitaminas, purinas, pirimidinas, nucleótidos y algunos lípidos. También contiene enzimas del parásito y posiblemente del hospedador, funciona como órgano de protección contra las enzimas digestivas y contra el sistema inmune del hospedador, es un órgano auxiliar en la locomoción y un sitio de transferencia

metabólica. La membrana plasmática apical del tegumento está cubierta por un glicocáliz de mucopolisacáridos y glicoproteínas. Este glicocáliz es producido por el propio parásito y colabora en la inactivación de algunas enzimas del hospedador por acumulación de iones orgánicos e inorgánicos. Además tiene la capacidad de unir enzimas del hospedador, como amilasas para degradar azúcares complejos. El transporte de algunos nutrientes como azúcares y aminoácidos generalmente requiere la presencia de bombas de  $\text{Na}^+$ , en particular en el caso de *E. granulosus* se ha identificado una bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-asa que podría cumplir esta función. Además de estos elementos, se ha descrito en el tegumento la presencia de corpúsculos calcáreos, estructuras compuestas por capas concéntricas de minerales, como carbonato de calcio. El citoplasma distal contiene una gran abundancia de gránulos, vesículas, vacuolas y mitocondrias. La mayoría de las vesículas y gránulos tendrían un origen en el aparato de Golgi, que se encuentra en la zona proximal. Se cree que estos gránulos participan en la formación del glicocáliz y las microtriquias. Luego de esta zona se encuentran capas musculares longitudinales y circulares y por debajo la zona citoplasmática proximal que contiene los núcleos y otros organelos como el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico, las mitocondrias, así como áreas de almacenamiento de glucógeno y cuerpos lipídicos.



**Figura 1.8. Esquema del tegumento de los cestodos.** El tegumento está compuesto por una zona superficial anucleada y una zona citoplasmática nucleada. La zona superficial anucleada presenta microtriquias cubiertas de un glicocáliz. En el citoplasma distal hay presencia de cuerpos densos, vacuolas, vesículas y mitocondrias, mientras que en el citoplasma proximal, por debajo de la región muscular se encuentran los núcleos y organelos como el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico y las mitocondrias. Adaptado del Banco de Recursos Educativos Multimedia de la Universidad de Ottawa, BIODIDAC (<http://biodidac.bio.uottawa.ca/>).

En lo que respecta al metabolismo de los cestodos, así como de los platelmintos en general, la característica principal es la adaptación que estos parásitos presentan a los diferentes ambientes a los que están expuestos durante su ciclo de vida, principalmente en lo que tiene que ver con la disponibilidad de oxígeno y de nutrientes. En los estadios de vida libre estos parásitos tienen acceso al oxígeno, por lo cual su metabolismo es principalmente aerobio, obteniendo energía a partir de sus reservas de glucógeno mediante ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa (Tielens & Hellemond, 2006). A través de esta vía, el organismo se asegura de maximizar la energía obtenida gastando la menor cantidad posible de sus reservas, con el objetivo final de sobrevivir un tiempo suficiente como para interactuar con un hospedador que le permita continuar su ciclo de vida. Una vez en el hospedador, el parásito se establece en sitios donde, la disponibilidad de oxígeno y nutrientes cambia respecto al ambiente externo, induciendo un cambio hacia el metabolismo anaerobio (Tielens & Hellemond, 2006). Así, en sus estadios como parásito los cestodos utilizan glucosa proveniente del hospedador para obtener energía, realizando fermentación láctica mediante glucólisis anaerobia, generando dos moléculas de ATP por molécula de glucosa. Si bien este metabolismo tiene un menor rendimiento energético que el metabolismo aerobio que emplean en los estadios de vida libre, les resulta más eficiente, dado que los nutrientes en este caso provienen del hospedador y no de sus propias reservas. Además, estos parásitos suelen emplear otra vía fermentativa para obtener energía, conocida como dismutación del malato, vía que no es compartida con el hospedador (Tielens & Hellemond, 2006). En esta vía, el fosfoenolpiruvato producido por vías glucolíticas clásicas es carboxilado a oxalacetato y luego reducido a malato. Este malato es transportado a la mitocondria; una parte puede ser oxidado para dar acetato y otra parte transformado en fumarato. Éste puede luego ser reducido a succinato, que en un paso posterior puede ser metabolizado a propionato. El paso de reducción de fumarato a succinato está acoplado a una cadena de transporte de electrones anaerobia en la que el fumarato es el aceptor final de los electrones en lugar del oxígeno, empleando rodoquinona como complejo transportador de los electrones. Una característica fundamental de estos organismos es que usan vías fermentativas que los hacen dependientes exclusivamente de los carbohidratos para generar energía. La baja tensión de oxígeno en los sitios de instalación no permite la obtención de energía a partir de los lípidos y se sabe que la oxidación de los aminoácidos contribuye muy poco al metabolismo energético global de los cestodos (Tielens & Hellemond, 2006).

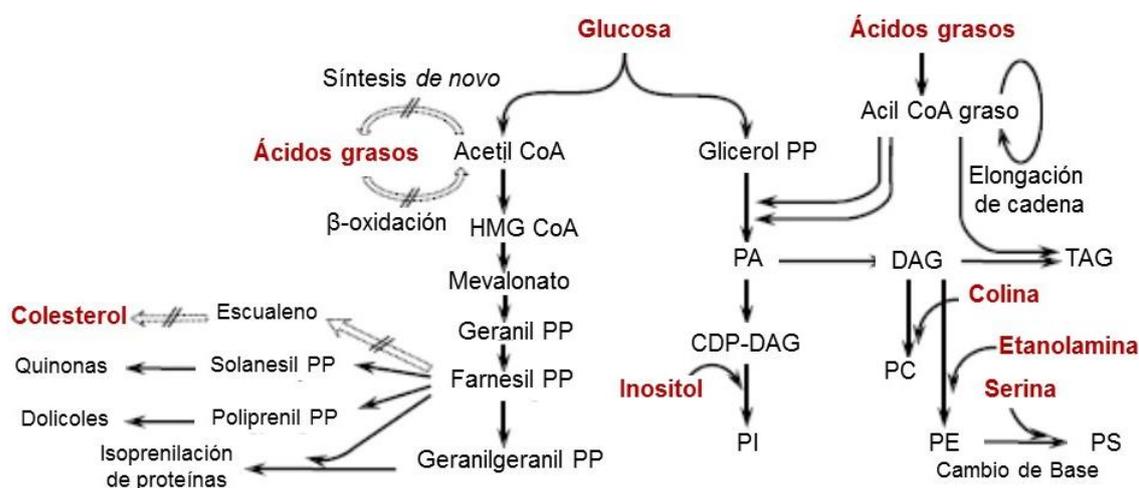
Respecto a la capacidad biosintética de estos parásitos, estudios metabólicos, así como el reciente ensamblaje del genoma de varios de estos organismos, ha mostrado

que los cestodos han reducido al mínimo muchas de sus rutas biosintéticas debiendo obtener muchos sustratos simples del hospedador para utilizarlos como bloques a partir de los cuales construir moléculas más complejas (Tielens & Hellemond, 2006; Tsai et al., 2013; Zheng H. et al., 2013). En este sentido, los carbohidratos, como la glucosa, no pueden ser sintetizados por los cestodos y deben ser adquiridos de su hospedador para formar derivados más complejos como el glicocálix, las glicoproteínas y el glucógeno que el parásito utilizará luego como fuente de almacenamiento de carbohidratos. Respecto a los aminoácidos, la mayoría de ellos son esenciales para estos parásitos, debiendo adquirirlos desde el hospedador. Sin embargo, éstos tienen la capacidad de generar algunos aminoácidos a partir de esqueletos carbonados generados mediante las vías glucolíticas. En relación a la síntesis de los intermediarios para la formación de los ácidos nucleicos, se ha determinado que si bien no son capaces de sintetizar purinas *de novo*, tienen vías de salvataje elaboradas para maximizar su uso, mientras que sí son capaces de sintetizar las pirimidinas. Finalmente, respecto a la biosíntesis de lípidos, los cestodos no son capaces de sintetizar *de novo* los lípidos simples como los ácidos grasos y el colesterol y por tanto necesitan partir de bloques obtenidos desde el hospedador para sintetizar lípidos más complejos como fosfolípidos, triacilglicéridos y ésteres de colesterol. Otros lípidos menos abundantes, como algunos ácidos grasos insaturados y eicosanoides pueden ser sintetizados a partir de sustratos más abundantes obtenidos desde el hospedador.

### 1.3.2. Metabolismo lipídico

Los lípidos tienen un rol muy importante en la biología de la mayoría de los organismos, no sólo como constituyentes de las membranas biológicas de las células, como los fosfolípidos y el colesterol, sino porque también participan en procesos de señalización, en las interacciones y reconocimiento celular, en el transporte de membrana y muchos de ellos actúan como reguladores de enzimas y factores de transcripción. La composición lipídica de los cestodos es, en principio, similar a la de otros organismos (Smyth & McManus, 1989). Su metabolismo lipídico ha sido relativamente poco explorado, pero ensayos metabólicos han mostrado que no son capaces de sintetizar la mayoría de sus lípidos *de novo* (Smyth & McManus, 1989; Tielens & Hellemond, 2006). Cabe mencionar que los datos obtenidos mediante estos ensayos han sido recientemente confirmados tras la obtención del genoma de varios cestodos, entre los que se incluye *E. granulosus* (Tsai et al., 2013; Zheng H. et al.,

2013). El análisis de estos genomas mostró que efectivamente, estos organismos carecen de las enzimas para llevar a cabo la síntesis de muchos de sus lípidos por las vías actualmente conocidas. En la Figura 1.9 se muestra un esquema donde se indican las características principales del metabolismo lipídico de los cestodos (Tielens & Hellemond, 2006).



**Figura 1.9. Esquema del metabolismo lipídico en los cestodos.** Los cestodos no son capaces de sintetizar algunos lípidos simples, como ácidos grasos y colesterol *de novo* y deben adquirirlos del hospedador. Asimismo para sintetizar otros lípidos complejos, como triacilglicéridos y fosfolípidos también deben partir de bloques más simples que deben tomar del hospedador. Los compuestos que el parásito necesita adquirir de su hospedador están marcados en rojo. Las flechas claras indican las vías metabólicas que no están presentes en estos organismos, mientras que las flechas oscuras indican aquellas vías que si pueden llevar a cabo. PP: pirofosfato, PC: fosfatidilcolina, PS: fosfatidilserina, PI: fosfatidilinositol, PE: fosfatidiletanolamina, DAG: diacilglicéridos, TAG: triacilglicéridos, CDP-DAG: Citidina-difosfato-diacilglicérido y HMG-CoA: hidroximetilglutaril CoA, CoA: Coenzima A. Adaptado de Tielens & Hellemond, 2006

En cuanto al metabolismo de los esteroides, se encontró que los cestodos no son capaces de sintetizar colesterol y que toman este lípido de su hospedador (Frayha, 1968). En particular, el metacestodo de *E. granulosus* no puede sintetizar colesterol a partir de acetato o mevalonato, ya que no se detectó colesterol marcado radiactivamente cuando se cultivaron quistes hidáticos con estos precursores marcados con  $^{14}\text{C}$ . Además, se comprobó que el metacestodo incorpora el colesterol del hospedador utilizando el modelo de infección secundaria, en el cual se detectó radioactividad en quistes hidáticos cuando los ratones fueron alimentados con colesterol marcado radiactivamente. Más aún, se determinó que en *E. granulosus* y *Taenia hydatigena*, la síntesis de los esteroides a partir de precursores marcados radiactivamente culmina en el farnesil pirofosfato, uno de los primeros intermediarios

de la vía del mevalonato por la cual se sintetiza el escualeno y por ende el colesterol. El farnesil pirofosfato es rápidamente hidrolizado a farnesol, particularmente a su isómero 2-*cis*,6-*trans*-farnesol. Los autores de este trabajo proponen que este isómero podría cumplir un rol importante en el desarrollo de estos parásitos, si se considera que puede estar actuando de forma similar a la hormona juvenil descrita en insectos (Frayha, 1974). Asimismo, la formación de farnesil pirofosfato en los platelmintos también puede ser importante como precursor en la síntesis de quinonas, en particular de la rodoquinona que participa en transporte de electrones en el metabolismo energético anaerobio de estos organismos. Más aún, en otros platelmintos se ha demostrado que la importancia de la vía del mevalonato también radica en la síntesis de dolicoles para glicosilación de proteínas y que tanto el farnesil, como el geranilgeranil pirofosfato pueden actuar como sustratos para la isoprenilación de proteínas (Tielens & Hellemond, 2006).

En lo que respecta al metabolismo de ácidos grasos, se ha determinado que estos parásitos no pueden sintetizar sus ácidos grasos *de novo* a partir de Acetil Coenzima A (acetil CoA) y por lo tanto también deben adquirirlos de su hospedador. Tampoco se han encontrado evidencias de que puedan desaturar los ácidos grasos, por lo que también deben adquirir los ácidos grasos insaturados del hospedador. En este sentido, se ha descrito que el tipo de ácidos grasos que presentan suelen ser similares a los de su hospedador, en general los ácidos grasos predominantes son los ácidos grasos de 16 y 18 carbonos, como el ácido palmítico (16:0) el ácido oleico (18:1) el ácido esteárico (18:0) y el ácido linoleico (18:2). El metabolismo de los ácidos grasos en estos organismos parece estar restringido a la elongación de los ácidos grasos del hospedador, donde el acetil CoA funcionaría como dador de dos carbonos. Por otro lado, como ya se comentó los cestodos tampoco pueden realizar la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos debido a la baja tensión de oxígeno en el sitio de instalación del parásito, por lo que los lípidos no constituyen una fuente de energía (Smyth & McManus, 1989). Los ácidos grasos obtenidos del hospedador o elongados por el parásito si pueden ser incorporados a fosfolípidos y triacilglicéridos (Tielens & Hellemond, 2006).

En cuanto a los fosfolípidos, se ha determinado que el cestodo *Hymenolepis diminuta*, posee algunas vías de síntesis de fosfolípidos *de novo* a partir de ácidos grasos, glicerol o glucosa (Smyth & McManus, 1989). En otros platelmintos se conoce que los grupos pertenecientes a las cabezas polares de muchos fosfolípidos, como la colina y la etanolamina también deben ser adquiridos del hospedador (Tielens & Hellemond, 2006), lo que ha sido confirmado en *E. granulosus* de acuerdo a los datos del genoma (Zheng H. et al., 2013).

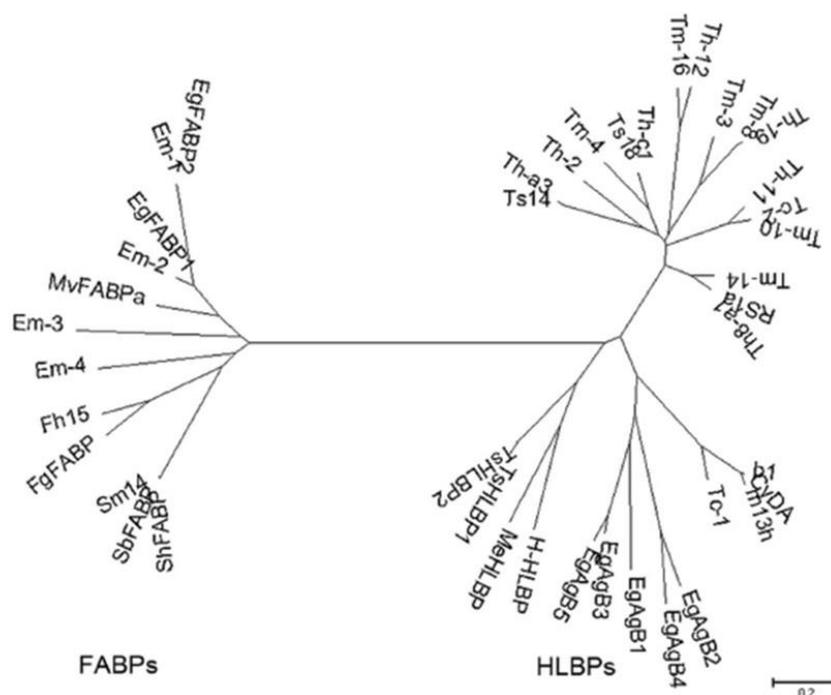
En relación a los triacilglicéridos, también se ha encontrado que el cestodo *H. diminuta* es capaz de sintetizarlos empleando bloques más simples como los ácidos grasos obtenidos del hospedador y empleando la vía  $\alpha$ -glicerofosfato-ácido fosfatídico-diglicérido (Buteau & Fairbairn, 1969). En la mayoría de los organismos, los triacilglicéridos son empleados como reserva de ácidos grasos para obtención de energía, sin embargo como ya se comentó previamente, estos organismos no son capaces de obtener energía de los ácidos grasos. Sin embargo, se ha encontrado actividad lipasa en los cestodos, por lo que se considera que los triacilglicéridos pueden actuar como fuente de ácidos grasos para construir los fosfolípidos de las membranas y/o para algún tipo de señalización celular.

De las características del metabolismo lipídico descritas anteriormente se desprende que los cestodos deben haber desarrollado mecanismos para lograr obtener sus lípidos del hospedador. Asimismo, dada la hidrofobicidad característica de los lípidos, también es probable que, como la mayoría de los organismos, deban utilizar distintas proteínas para su transporte y distribución entre sus distintos tejidos. En este sentido, se han descrito dos familias de proteínas que unen lípidos (LBP del inglés *lipid binding protein*) en los organismos cestodos, las proteínas que unen ácidos grasos (FABP del inglés *fatty acid binding protein*) y las proteínas que unen ligandos hidrofóbicos (HLBP del inglés *hydrophobic ligand binding protein*). La familia de las FABPs se encuentra ampliamente distribuida en el reino animal, mientras que la familia de las HLBP es una familia exclusiva de organismos cestodos. A continuación se describirán las características principales de estas familias de proteínas.

### 1.3.3. Proteínas que unen lípidos en cestodos

Debido a su hidrofobicidad, los lípidos, deben ser transportados unidos a proteínas en medio acuoso. Para esto, la mayoría de los organismos poseen proteínas que los unen y transportan dentro de las células o hacia diferentes tejidos. En particular, los helmintos poseen varias familias de LBPs, muchas de ellas distintas a las que poseen sus hospedadores. Los nematodos poseen proteínas que unen ácidos grasos y retinol, proteínas de la familia de las poliproteínas alergénicas, y FABPs con características únicas, como la presencia de señales de secreción extracelular (Franchini et al., 2013). Como se comentó anteriormente, en los cestodos se han descrito la familia de las FABPs y la familia de las HLBP (Alvite & Esteves, 2012). Si bien, todas estas familias de proteínas comparten la habilidad de unir lípidos, difieren ampliamente en sus secuencias, estructuras, especificidad de ligandos y posiblemente en su función. En

los cestodos, los estudios filogenéticos muestran que las FABPs y las HLBP s poseen orígenes distintos y que han evolucionado a través de diferentes vías, como se observa en la Figura 1.10 (Alvite & Esteves, 2012).



**Figura 1.10. Relaciones filogenéticas entre las FABPs y las HLBP s de cestodos.** Se muestran las relaciones filogenéticas para las proteínas FABPs: EgFABP1 y EgFABP2 de *E. granulosus*; Em-1, Em-2, Em-3 y Em-4 de *E. multilocularis*, Fh15 de *Fasciola hepatica*; FgFABP de *F. gigantica*; Sm14 de *Schistosoma mansoni*; SbFABP de *S. bovis*; ShFABP de *S. haematobium*; MvFABPa de *Mesocestoides vogae*; y para las proteínas HLBP s: EgAgB1-5 de *E. granulosus*; RS1, Ts14, Ts18, CyDA, b1 y m13h, TsHLBP1, TsHLBP2 de *Taenia solium*; Tc1-2 de *T. crassiceps*; H-HLBP de *Hymenolepis diminuta*; MeHLBP de *Moniezia expansa*; Tm-3, Tm4, Tm8, Tm10, Tm14 y Tm16 de *T. multiceps*; Th-a1, Th-c1, Th-a3, Th11, Th12, Th19, y Th2 de *T. hydatigena*. Tomado de Alvite & Esteves, 2012.

Al igual que las FABPs de mamíferos, las FABPs de los cestodos son proteínas citosólicas, o al menos no poseen ninguna secuencia o péptido señal de secreción extracelular por las vías convencionales actualmente conocidas. Por otro lado, las HLBP s incluyen miembros intracelulares y extracelulares que sí poseen secuencias específicas para su secreción (Alvite & Esteves, 2012). Si bien las funciones de estas familias de proteínas no han sido elucidadas, debido a su capacidad de unir lípidos y a sus distintas localizaciones, se cree que las FABPs cumplirían un papel importante en el transporte de los lípidos dentro de la célula; mientras que las HLBP s participarían principalmente en la captación de lípidos desde el hospedador y/o en su posterior distribución hacia los diferentes tejidos del parásito. A continuación se describirán las características principales de ambos grupos de proteínas.

### 1.3.3.1 Proteínas que unen ácidos grasos (FABPs)

Las FABPs son proteínas de bajo peso molecular (14 - 15 kDa), que poseen una distribución filogenética muy amplia (Zheng Y. et al., 2013). A pesar de poseer secuencias aminoacídicas distintas, estas proteínas poseen una estructura terciaria prácticamente superponible que consta de un barril formado por 10 hojas- $\beta$  antiparalelas coronado por dos  $\alpha$ -hélices a modo de tapa. Las FABPs unen de forma no covalente ácidos grasos de cadena larga y algunas de ellas en particular también pueden unir ácido retinoico y otros ligandos hidrofóbicos como sales biliares. Más allá de toda la información estructural disponible sobre estas proteínas, sus funciones no han sido completamente establecidas. Se ha propuesto que estarían involucradas en la captación de los ácidos grasos dentro de la célula, en la regulación del metabolismo lipídico y en la protección del efecto deletéreo que podría causar una alta concentración de ácidos grasos en la célula (Storch & Corsico, 2008). Algunos miembros de esta familia han sido relacionados con procesos de proliferación celular y modulación del crecimiento (Furuhashi & Hotamisligil, 2008).

En los platelmintos, la primera FABP caracterizada fue la de *Schistosoma mansoni*, denominada Sm14. Luego se encontraron otras proteínas homologas en otros trematodos como *S. japonicum* (Sj-FABPc), *S. bovis* (SbFABP), *Fasciola hepatica* (Fh15), *F. gigantica* (FgFABP); y en cestodos como *Taenia solium* (TsFABP), *T. pisiformis* (TpFABP), *T. muliceps* (TmFABP), *Mesocestoides vogae* (MvFABPa y MvFABPb), *E. multilocularis* (EmFABP) y *E. granulosus* (EgFABP), según lo revisado por Alvite y Esteves, y citas más actuales (Alvite & Esteves, 2012; Nie et al., 2013; Yang et al., 2013; Zheng Y. et al., 2013).

Particularmente, en *E. granulosus* se han descrito hasta el momento dos FABPs, la EgFABP1 y EgFABP2, proteínas que se expresan en los protoescolices y en la capa germinativa del metacestodo. Un análisis más reciente del genoma de *E. granulosus* ha revelado que también se expresarían al menos otras tres FABPs además de EgFABP1 y EgFABP2 (Jorge L. Pórfido, INIBIOLP, comunicación personal). De estas FABPs, la proteína EgFABP1 ha sido la primera descrita, y por lo tanto la más caracterizada (Esteves et al., 1993). La determinación de su estructura mostró la típica estructura de barril  $\beta$  coronado por dos  $\alpha$ -hélices (Jakobsson et al., 2003). También se analizó su capacidad de unir ligandos hidrofóbicos mediante ensayos de desplazamiento de sondas fluorescentes, lo cual determinó que los ligandos unidos preferencialmente por esta proteína son los ácidos grasos insaturados de cadena larga, aunque también es capaz de unir ácidos grasos de diferente longitud y diversos

grados de insaturación (Alvite et al., 2001). Por otro lado, en nuestro grupo se ha estudiado la capacidad de EgFABP1 de transferir ácidos grasos fluorescentes a membranas fosfolipídicas artificiales (Porfido et al., 2012), técnica empleada para la caracterización de varias FABPs de mamíferos (Storch, 1993). Estos ensayos permitieron determinar que para que la proteína EgFABP1 transfiera los ácidos grasos hacia las membranas fosfolipídicas es necesario que exista una interacción directa con las mismas. Asimismo, la transferencia de ligando está influenciada por interacciones de tipo iónico e hidrofóbico (Porfido et al., 2012). Estos datos apoyan la idea de que esta proteína pueda participar en el intercambio de ácidos grasos dentro de la célula. Al igual que en muchos organismos, la función de las FABPs en los cestodos no ha sido esclarecida, pero en general se ha propuesto que participarían en la distribución de los ácidos grasos hacia distintos compartimentos intracelulares. Resulta interesante también el hecho que algunos cestodos, como *E. granulosus* y *E. multilocularis*, expresan más de una FABP (Zheng Y. et al., 2013). En otros organismos, particularmente en mamíferos, también se expresan varios tipos de FABPs en diferentes tejidos o incluso en un mismo tejido, como ocurre en el intestino con la expresión de la FABP intestinal y hepática. En este caso ha sido propuesto que estas FABPs pueden cumplir diferentes funciones en estos tejidos, quizás uniendo específicamente distintos tipos de ácidos grasos y/o dirigiéndolos hacia diferentes localizaciones subcelulares (Storch & Corsico, 2008). En los cestodos, por su parte, diferentes FABPs podrían expresarse en distintos tejidos y/o estadios de los parásitos. En este sentido, ensayos preliminares sugieren que las distintas FABPs de *E. multilocularis* (EmFABPs) se expresan de forma diferencial en la capa germinativa y en los protoescólices (Jorge L. Pórfido, INIBIOLP, comunicación personal).

Dado que los ácidos grasos no son sintetizados por estos parásitos, necesariamente deben provenir del hospedador. En relación a esto, el interrogante que aún resta por responder es cómo llegan los ácidos grasos del hospedador a las células del parásito para ser distribuidos intracelularmente por las FABPs. En general, se asume que los ácidos grasos son capaces de atravesar las membranas biológicas por difusión simple, aunque más recientemente se ha descrito que existen proteínas asociadas a mecanismos de transporte de ácidos grasos a través de membranas biológicas (van der Vusse et al., 2002). Si bien estas proteínas no han sido descritas en platelmintos, la búsqueda de secuencias similares en los genomas de los organismos descritos hasta el momento indica la posible existencia de proteínas que cumplan con funciones similares (Alvite & Esteves, 2012; Zheng H. et al., 2013). Esto facilitaría el ingreso de los ácidos grasos a las células del parásito, pero no permite

explicar de dónde provienen dichos ácidos grasos. Se ha determinado la presencia de lipoproteínas y albúmina provenientes del hospedador en el líquido hidático (Coltorii & Varela-Díaz, 1974; Aziz et al., 2011), por lo que es posible pensar que estas proteínas participen en el suministro de ácidos grasos. No obstante, también se ha propuesto que las HLBP's cumplan ese rol (Lee et al., 2007). A continuación se describirán con más detalle las características principales de la HLBP's.

### 1.3.3.2 Proteínas que unen ligandos hidrofóbicos (HLBP's)

A diferencia de las FABPs descritas previamente, las HLBP's son una familia de proteínas exclusiva de organismos cestodos. Muchas de estas proteínas se identificaron inicialmente como antígenos específicos de las distintas enfermedades producidas por estos parásitos. Miembros de esta familia se han identificado en *T. solium*, *T. crassiceps*, *T. hidatigena*, *T. multiceps*, *Moniezia expansa*, *Himenolepys diminuta*, *E. multilocularis* y *E. granulosus* (Alvite & Esteves, 2012). Se trata de proteínas oligoméricas, compuestas por subunidades pequeñas (entre 7 y 11 kDa), cuya estructura secundaria posee un alto porcentaje de  $\alpha$ -hélices anfipáticas con alta capacidad para unir ligandos hidrofóbicos. Muchos de los estudios realizados para caracterizar los ligandos unidos por estas proteínas han sido ensayos *in vitro* basados en el uso de sondas fluorescentes. De este modo, se logró establecer que algunas de estas proteínas son capaces de unir ácidos grasos saturados e insaturados de cadena larga, esteroides, retinoides y algunas drogas antihelmínticas (Barrett et al., 1997; Saghir et al., 2001; Chemale et al., 2005; Kim et al., 2011; Rahman et al., 2012). Como se ha comentado previamente, algunas HLBP's son intracelulares, mientras que otras poseen una secuencia señal para su secreción extracelular.

Dentro de las HLBP's intracelulares, se encuentran descritas la proteína Me-HLBP de *M. expansa* (Janssen & Barrett, 1995; Barrett et al., 1997) y la proteína Hd-HLBP de *H. diminuta* (Saghir et al., 2001, 2000). La proteína Me-HLBP constituye un oligómero de aproximadamente 250 kDa formado por subunidades de 8 kDa (Barrett et al., 1997). Mediante ensayos de desplazamiento empleando ácido 11-(dansilamino)undecanoico (DAUDA), se determinó que esta proteína une ácidos grasos de cadena larga, esteroides, ácido retinoico, algunas drogas antihelmínticas, pero no la mayoría de los acil-CoA derivados de ácidos grasos analizados (Janssen & Barrett, 1995). Ensayos posteriores mostraron que esta proteína también es capaz de unir el ácido 16-(9-antróiloxi)-palmítico (16-AP) y la sonda 1-anilino-8-naftaleno sulfonato (ANS). Asimismo en este trabajo se estableció que el único triptófano de la

proteína, ubicado en la posición 41 (Trp41), está cercano al sitio de unión del ligando (Barrett et al., 1997). La proteína Hd-HLBP purificada del parásito *H. diminuta* y analizada mediante geles de poliacrilamida en condiciones reductoras mostró una banda de 11 kDa, mientras que la proteína nativa parece ser un oligómero de 115 kDa, según análisis mediante filtración en gel (Saghir et al., 2000). Asimismo, empleando DAUDA se determinó que esta proteína es capaz de unir ácidos grasos de cadena larga y sus acil CoA derivados, aunque con menor afinidad (Saghir et al., 2000). Ensayos posteriores también determinaron que al igual que la Me-HLBP, la proteína Hd-HLBP es capaz de unir 16-AP y ANS, sondas que fueron desplazadas por el ácido oleico (18:1). También se determinó que es capaz de unir algunos antihelmínticos y que el Trp41 está cercano al sitio de unión del ligando (Saghir et al., 2001).

En relación a las HLBP's extracelulares, las más caracterizadas en cuanto a su capacidad de unir lípidos han sido las HLBP's de *T. solium* y de *E. granulosus*. En el caso de *T. solium*, se han obtenido y parcialmente caracterizado las HLBP's pertenecientes al metacestodo y al estadio adulto del parásito. En el metacestodo de *T. solium* se expresa una HLBP denominada TsM150, dado que tiene un tamaño de 150 kDa (Lee et al., 2007; Kim et al., 2011). Esta proteína es un hetero-oligómero formado por proteínas de 7 kDa (RS1) y de 10 kDa (CyDA, b1 y m13h). Empleando distintas sondas, entre ellas DAUDA, ANS y 16-AP, se determinó que estas subunidades unen los lípidos de forma diferencial; las subunidades CyDA, b1 y m13h unen 16-AP pero no DAUDA ni ANS, mientras que la subunidad RS1 se comporta en forma inversa, une DAUDA y ANS pero no 16-AP (Kim et al., 2011). Funcionalmente, se ha propuesto que la proteína TsM150 podría participar en la translocación de lípidos hacia el interior del metacestodo. Esto se apoya en ensayos utilizando parásitos en cultivo, donde observaron que la proteína TsM150 es capaz de unir DAUDA y transportarlo hacia el interior de metacestodos, por una vía de translocación que resultó inhibida por anticuerpos específicos anti-TsM150 (Lee et al., 2007). Esta es la única evidencia de que las HLBP's participan en la adquisición de lípidos desde el hospedador. Además de la proteína TsM150, en el metacestodo de *T. solium* se ha descrito otra proteína oligomérica de 120 kDa, constituida por subunidades de 14 y 18 kDa (Lee et al., 2005), aunque no se ha descrito su capacidad de unión a lípidos. Más recientemente se caracterizó una proteína de excreción-secreción obtenida a partir de adultos de *T. solium*, denominada TsHLBP, de aproximadamente 100 kDa. Estos autores determinaron que esta proteína está compuesta por subunidades de aproximadamente 10 kDa, que denominaron TsHLBP1 y TsHLBP2. Asimismo, determinaron que estas subunidades son capaces de unir las sondas ANS, 16-AP y el

ácido *cis*-parinárico (ácido graso fluorescente naturalmente), mientras que no unieron DAUDA. Ensayos de desplazamiento de ANS revelaron que ambas subunidades son capaces de unir ácido mirístico (14:0), palmítico (16:0), oleico (18:1) y linoleico (18:2), siendo estos últimos los que producen los mayores desplazamientos, mientras que el ácido araquidónico (20:4) no produjo desplazamiento de ANS (Rahman et al., 2012). La HLBP de *E. granulosus*, denominada Antígeno B (EgAgB), fue caracterizada inicialmente como una lipoproteína (Oriol et al., 1971; Oriol & Oriol, 1975). Tal como se explicará en detalle más adelante (ver ítem 1.4), a nivel proteico el EgAgB está compuesto por diferentes subunidades, denominadas EgAgB8/1 a EgAgB8/5. Mediante ensayos *in vitro* se determinó que algunas de estas subunidades, en particular EgAgB8/1 y EgAgB8/2, son capaces de unir el análogo fluorescente 16-AP, mientras que no presentaron unión a DAUDA, ANS ni al ácido dansill-D,L- $\alpha$ -amino octanoico (DACA). Asimismo, en este trabajo se determinó que el 16-AP no logró ser desplazado por ácidos grasos ni drogas antihelmínticas (Chemale et al., 2005).

Como se detalló hasta ahora, los lípidos identificados como ligandos de las distintas HLBP fueron determinados mediante ensayos *in vitro*, la gran mayoría empleando sondas fluorescentes y en algunos casos realizando desplazamiento de estas sondas con ligandos naturales como los ácidos grasos. Por mucho tiempo no se contó con información acerca de cuáles podían ser los ligandos unidos por las HLBP en su entorno natural. Más recientemente, nuestro grupo logró caracterizar por primera vez los ligandos naturales del EgAgB purificado del líquido hidático. El componente lipídico del EgAgB nativo representa aproximadamente la mitad de la masa total de la partícula y es muy heterogéneo, presentando una amplia variedad de lípidos polares y neutros (Obal et al., 2012). Esta información permitió proponer que el EgAgB cumple un rol en el metabolismo lipídico del parásito, una función que no había sido considerada anteriormente. A continuación se describirán con más detalle los antecedentes relacionados a la caracterización de esta lipoproteína, que ha sido objeto de estudio del presente trabajo de tesis.

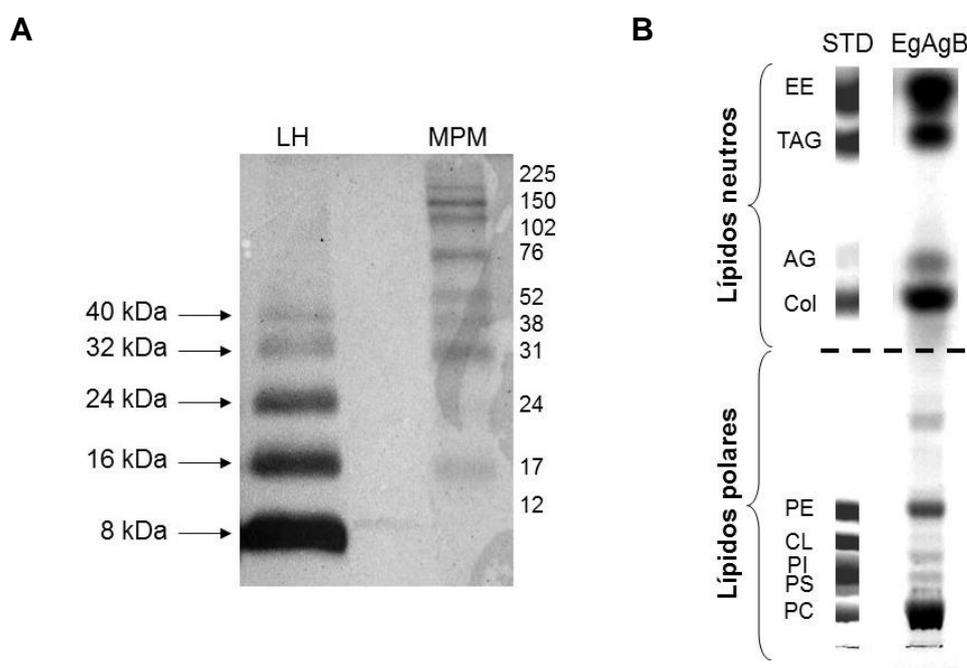
#### **1.4. La HLBP de *Echinococcus granulosus*: Antígeno B (EgAgB)**

Como se comentó anteriormente, el EgAgB es una de las proteínas más abundantes secretadas por el metacestodo de *E. granulosus*. Fue identificada inicialmente como una lipoproteína presente en una fracción antigénica del líquido hidático, y por ello se la denominó antígeno B, para diferenciarla de otra fracción antigénica denominada antígeno A (Williams et al., 1971). Su naturaleza lipoproteica

se puso de manifiesto en este trabajo, evidenciando la presencia de lípidos por tinción con el colorante *Sudán Black*. Asimismo, se reportó una fuerte, pero no covalente, asociación entre los lípidos y la proteína, dado que la fracción lipídica se pudo extraer únicamente empleando solventes orgánicos. En los trabajos iniciales realizados por Oriol y colaboradores para caracterizar esta fracción antigénica, se determinó que esta proteína presentaba un tamaño de entre 120 kDa y 160 kDa, según ensayos de sedimentación y gel filtración, respectivamente (Oriol et al., 1971; Oriol & Oriol, 1975). Más recientemente, mediante gel filtración acoplada a dispersión de luz (SEC-MALLS, del inglés *Size Exclusion Chromatography - Multi-Angle Laser Light Scattering*) se demostró que las partículas de EgAgB presentan un tamaño heterogéneo, con un tamaño promedio de 230 kDa (Obal et al., 2012). Dado que el interés inicial en esta lipoproteína radicó en su importancia para el inmunodiagnóstico de la hidatidosis (Williams et al., 1971), muchos trabajos se avocaron principalmente al estudio del componente proteico de la lipoproteína, dejando de lado su componente lipídico. En este sentido, se realizaron varios trabajos con el fin de evaluar los epítopes inmunodominantes de esta proteína y el valor diagnóstico de la misma (Leggatt & McManus, 1994; Barbieri et al., 1998; González-Sapienza et al., 2000; Ortona et al., 1995, 2000; González-Sapienza & Cachau, 2003; Lorenzo et al., 2005). Asimismo, el análisis inicial del componente proteico del EgAgB mediante geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes mostró un patrón de bandas regularmente espaciadas de 8, 16, 24, 32 kDa, siendo las fracciones mayores las menos abundantes, de forma similar a lo que se muestra en el panel A de la Figura 1.11. Posteriormente, se determinó que las bandas de mayor peso molecular correspondían a oligómeros de por lo menos dos subunidades de 8 kDa distintas (González et al., 1996). Estas subunidades fueron denominadas EgAgB8/1 y EgAgB8/2 (Fernández et al., 1996; Rott et al., 2000). Más adelante se describieron otras subunidades de 8 kDa y se determinó que estas subunidades están codificadas por una familia multigénica (Chemale et al., 2001; Arend et al., 2004; Zhang et al., 2010). Asimismo, se ha descrito un alto polimorfismo en los genes que codifican para estas subunidades (Arend et al., 2004; Kamenetzky et al., 2005; Muzulin et al., 2008).

Como ya fue descrito en el ítem anterior, el análisis posterior de las subunidades de EgAgB mostró que éstas agrupan con un conjunto de proteínas de bajo peso molecular que forman oligómeros, son capaces de unir ligandos hidrofóbicos y son exclusivas de organismos cestodos, las HLBP. Asimismo, se analizó cuáles eran los ligandos hidrofóbicos unidos por el EgAgB y se encontró que las subunidades EgAgB8/1 y EgAgB8/2 obtenidas de forma recombinante unían ácidos grasos

(Chemale et al., 2005). Más recientemente, se determinó que la fracción lipídica del EgAgB constituye el 40-50% de la masa total de la partícula y que está formada por lípidos polares como fosfolípidos, y lípidos neutros, como ácidos grasos, triacilglicéridos, colesterol y ésteres de colesterol, tal como se puede observar en el panel B de la Figura 1.11 (Obal et al., 2012).

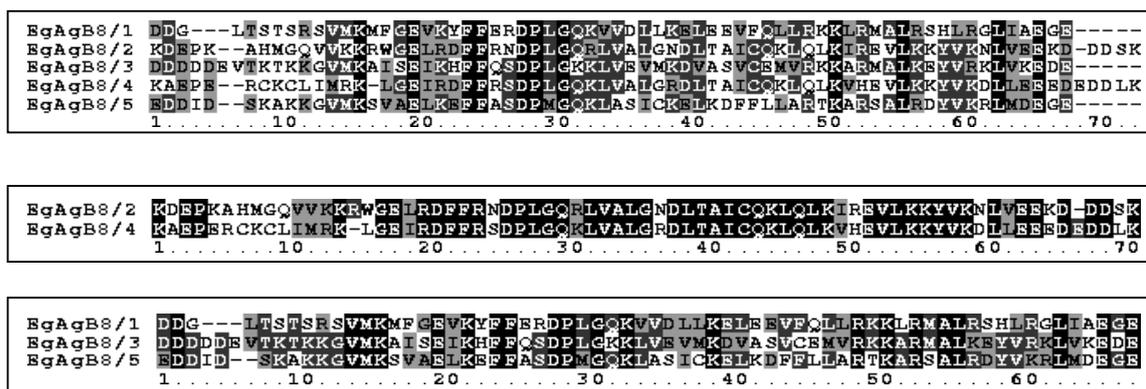


**Figura 1.11. Caracterización de la fracción proteica y lipídica del EgAgB nativo.** **(A)** Composición proteica del EgAgB analizada mediante *Western-Blot* de una muestra de líquido hidático (LH) proveniente de quistes hidáticos de cerdo (generosamente donado por la Dra. Mara Rosenzvit, UBA) empleando un anticuerpo policlonal de conejo obtenido contra el EgAgB nativo (generosamente donado por la Dra. Ana M. Ferreira, UdelaR). A la derecha se muestran los tamaños del marcador de peso molecular empleado. Se puede observar el patrón de bandas regularmente espaciadas de 8, 16, 24, 32 y 40 kDa característico del EgAgB, en donde la subunidad de 8 kDa constituye el bloque a partir del cual se arman los oligómeros de mayor tamaño (González et al., 1996). **(B)** Composición lipídica del EgAgB analizada mediante cromatografía de capa fina de alta performance (HPTLC) de la fracción lipídica de EgAgB extraída con solventes orgánicos. Se encontraron lípidos neutros, como ésteres de esteroides (EE), triacilglicéridos (TAG), colesterol (Col) y ácidos grasos (AG); y lípidos polares como fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI) y cardiolipina (CL). La identificación de las clases lipídicas se realizó por comparación con estándares primarios corridos en paralelo (STD). Imagen adaptada de Obal et al., 2012.

A partir de la información descripta previamente, se desprende que el EgAgB es una molécula compleja, conformada por distintas subunidades y que presenta una amplia variedad de lípidos. La forma en que estos componentes se relacionan para dar lugar a la partícula nativa aún no se conoce con claridad. A continuación se describirán en más detalle los componentes proteicos y lipídicos del EgAgB.

### 1.4.1. Componentes del EgAgB

Como ya se ha comentado previamente, el componente proteico del EgAgB comprende distintas subunidades de bajo peso molecular. Estas subunidades están codificadas por una familia de genes polimórficos divididos en cinco subfamilias, denominados *EgAgB1* a *EgAgB5* (Frosch et al., 1994; Fernández et al., 1996; Rott et al., 2000; Chemale et al., 2001; Arend et al., 2004; Kamenetzky et al., 2005; Muzulin et al., 2008; Zhang et al., 2010). Luego de un amplio debate en cuanto al número de genes de EgAgB, el análisis del genoma de *E. granulosus* recientemente obtenido mostró la existencia de un único clúster con siete genes distintos (Zheng H. et al., 2013). Tres de estos siete genes corresponden a *EgAgB3*, mientras que existe una única copia para el resto de las subunidades. La estructura de estos genes es similar, están compuestos por un exón 5' pequeño (entre 47-59 pb), un intrón (entre 67-164 pb) y un exón 3' (entre 199 y 214 pb). El primer exón codifica para un pequeño péptido que actúa como señal de secreción, mientras que las subunidades maduras son codificadas por el segundo exón. Considerando la secuencia codificante, la identidad de nucleótidos puede variar entre el 45 y el 82% entre las distintas subfamilias de genes, mientras que dentro de una misma subfamilia puede variar entre el 88 y el 100%, por ello se considera que estas subfamilias son polimórficas (Monteiro et al., 2008). Se cree que este polimorfismo está asociado a una adaptación de diferentes cepas de *E. granulosus* a los hospedadores que estos infectan, de hecho se ha encontrado que distintas cepas pueden contener distintos alelos o isoformas de algunos de estos genes (Kamenetzky et al., 2005; Muzulin et al., 2008). Las distintas subunidades maduras codificadas por estos genes contienen entre 65 y 71 aminoácidos y tienen un peso molecular de aproximadamente 8 kDa, razón por la cual se las ha denominado EgAgB8/1 a EgAgB8/5. La identidad de aminoácidos entre las distintas subfamilias puede variar entre el 25 y el 69%, mientras que dentro de una misma subfamilia puede variar entre el 79 y el 100% (Monteiro et al., 2008). En la Figura 1.12 se muestra un alineamiento de algunas isoformas de las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/2, EgAgB8/3, EgAgB8/4 y EgAgB8/5. Como se puede observar en la figura, la comparación de la secuencia de aminoácidos de las distintas subunidades muestra que las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/3 y EgAgB8/5 están más relacionadas entre sí que con las subunidades EgAgB8/2 y EgAgB8/4 y viceversa.



**Figura 1.12. Alineamiento de las secuencias de distintas subunidades de EgAgB.** Las distintas secuencias correspondientes a los polipéptidos maduros de EgAgB fueron alineadas empleando la herramienta *ClustalW* del programa *Biology Workbench*. Los residuos completamente conservados, idénticos o similares se muestran en negro, gris oscuro y gris claro, respectivamente. Se puede observar que las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/3 y EgAgB8/5 están más relacionadas entre sí, así como las subunidades EgAgB8/2 y EgAgB8/4 entre sí. Números de acceso en *GenBank*: EgAgB8/1 (AAD38373), EgAgB8/2 (AAC47169), EgAgB8/3 (AAK64236), EgAgB8/4 (AAQ74958) y EgAgB8/5 (BAE94835).

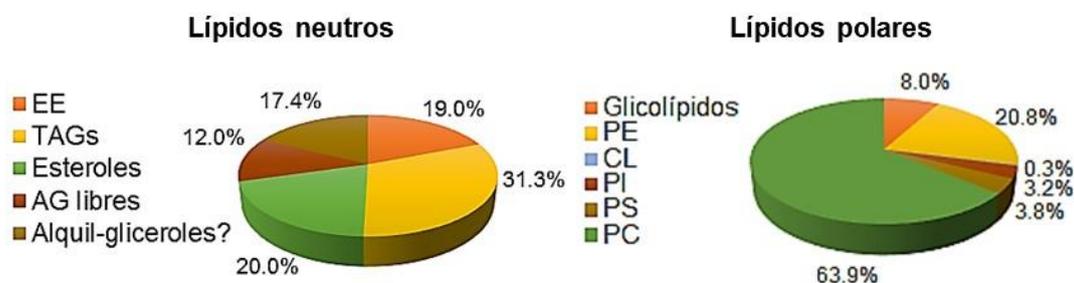
En cuanto a la expresión de las subfamilias del EgAgB en el parásito, se ha observado que existe una transcripción diferencial de estos genes en distintos estadios de *E. granulosus*, incluyendo adultos inmaduros, adultos maduros y oncósferas, así como también en distintos componentes de un mismo estadio, como la capa germinativa y los protoescólices del metacestodo (Zhang et al., 2010). Mediante análisis por PCR cuantitativa, se encontró que la subunidad EgAgB8/3 se expresa en todos los estadios analizados, siendo el producto mayoritario en protoescólices, adultos inmaduros y adultos maduros. En protoescólices y oncósferas se detectaron niveles muy bajos de las otras subunidades, mientras que en la capa germinativa se expresarían principalmente la subunidad EgAgB8/1, seguida de la subunidad EgAgB8/3, EgAgB8/2 y EgAgB8/4. La subunidad EgAgB8/5 se ha encontrado principalmente en el estadio adulto, tanto maduro como inmaduro; aunque también se expresa en muy bajos niveles en oncósferas, protoescólices y capa germinativa (Zhang et al., 2010). A nivel proteico, mediante análisis por espectrometría de masas se determinó que en el líquido hidático de quistes infértiles provenientes de la cepa G1 se encuentra principalmente la subunidad EgAgB8/1, seguida luego de las subunidades EgAgB8/2, EgAgB8/3 y EgAgB8/4 (Lic. Maite Folle y Dra. Ana M. Ferreira, UdelaR, comunicación personal), en concordancia con los datos descriptos anteriormente para la expresión de los genes en la capa germinativa. Asimismo, en el líquido hidático de quistes fértiles, se encuentran estas mismas subunidades, aunque comparativamente la proporción de EgAgB8/1 fue menor y se encontraron mayores

niveles de EgAgB8/2, EgAgB8/3 y EgAgB8/4. Apoyando estos resultados, empleando anticuerpos monoclonales específicos se encontró que distintas subunidades del antígeno B de *E. multilocularis* también se expresan de forma diferencial en distintas etapas del desarrollo de este parásito (Mamuti et al., 2006). Estos datos sugieren que estas subunidades podrían interactuar con diferentes blancos en los distintos tejidos donde se expresan y por tanto sus funciones podrían ser diferentes.

La estructura del EgAgB no se ha elucidado, pero existe información sobre la estructura de las subunidades proteicas que lo conforman. Por un lado el análisis por dicroísmo circular ha demostrado que sus subunidades presentan un alto contenido de  $\alpha$ -hélices (entre 35 y 65 %) (Oriol & Oriol, 1975; González-Sapienza & Cachau, 2003; Monteiro et al., 2007). Por otro lado, es posible que estas subunidades adopten estructuras más complejas, ya que son capaces de formar oligómeros de mayor tamaño. Como se comentó anteriormente, el análisis de la fracción proteica del EgAgB nativo muestra bandas correspondientes a dímeros, trímeros y tetrámeros (ver Figura 1.11A). El mecanismo por el cual estas subunidades forman estos oligómeros no se conoce, pero se determinó que no está mediado por puentes disulfuro, puesto que este patrón característico en los geles de poli-acrilamida ocurre del mismo modo al emplear condiciones reductoras (Lightowers et al., 1989 y Figura 1.11A). A su vez, mediante análisis de digestión en gel, se encontró que en las bandas correspondientes a estos oligómeros hay presencia de la mayoría de las subunidades presentes en el líquido hidático, EgAgB8/1 mayoritariamente, EgAgB8/2, EgAgB8/3 y EgAgB8/4 (Monteiro et al., 2012), aunque no se conoce con exactitud si los oligómeros se forman por distintas subunidades o si existen diferentes homo-oligómeros. Asimismo, algunas subunidades recombinantes, en particular EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 también son capaces de auto-asociarse en homo-oligómeros de mayor tamaño (Monteiro et al., 2007, 2012). El análisis mediante gel filtración mostró que estas subunidades forman oligómeros de tamaño variable, mayoritariamente de 125, 164 y 113 kDa, para EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3, respectivamente (Monteiro et al., 2007). El análisis de la estabilidad de estos homo-oligómeros determinó que la subunidad EgAgB8/3 forma los oligómeros más compactos, mientras que la subunidad EgAgB8/1 formaría oligómeros menos compactos o más laxos (Monteiro et al., 2007, 2012.). También se determinó que la característica anfipática de estas subunidades tendría que ver con el proceso de oligomerización (Monteiro et al., 2007, 2008). Cabe mencionar que los estudios realizados sobre la capacidad de oligomerización de las subunidades del EgAgB no tomaron en cuenta la presencia de lípidos en el antígeno, es decir no fueron realizados con las subunidades libres de lípidos. Por lo tanto, no se conoce hasta el

momento si esta capacidad de oligomerizar es una propiedad inherente al componente proteico o requiere de la participación de los lípidos. Del análisis por modelado molecular se ha propuesto que la característica anfipática de las subunidades explicaría su capacidad de oligomerizar (Monteiro et al., 2007, 2008).

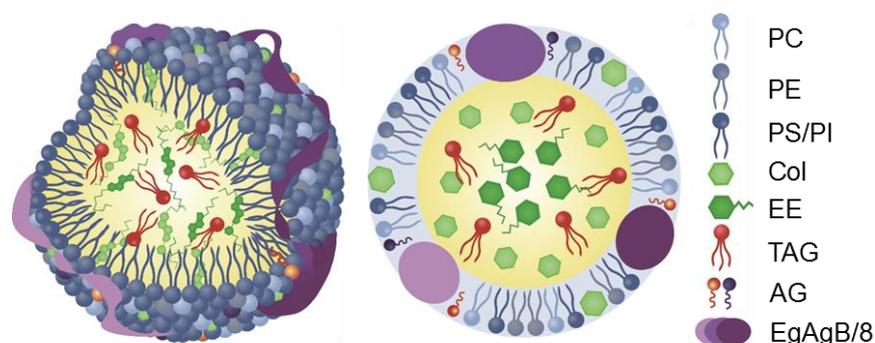
En relación al componente lipídico del EgAgB, éste es muy heterogéneo ya que incluye diferentes clases lipídicas (Obal et al., 2012). Utilizando cromatografía en capa fina de alta performance, se demostró que la fracción lipídica del EgAgB contiene lípidos neutros y lípidos polares (ver Figura 1.11B). Tal como se muestra en la Figura 1.13, dentro de los lípidos neutros, se encontró una alta proporción de triacilglicéridos (31.3%), esteroides (20.2%), ésteres de esteroides (19%) y ácidos grasos libres (12%), así como también una fracción propuesta como alquildiacilgliceroles y/o alquenildiacilgliceroles. En el caso de los lípidos polares, la fosfatidilcolina fue el lípido mayoritario, representando aproximadamente el 64% de los lípidos polares totales. También se encontraron fosfatidiletanolamina (20.8%), glicolípidos (8%), fosfatidilserina (3.8%), fosfatidilinositol (3.2%) y cardiolipina (0.3%). Estos lípidos mostraron una alta similitud a la proporción de lípidos presentes en el líquido hidático a partir del cual se purificó el EgAgB, indicando que la proteína es capaz de unir la mayoría de los lípidos que tiene disponibles en su entorno (Obal et al., 2012).



**Figura 1.13. Análisis de la fracción lipídica del EgAgB nativo.** La proporción de las distintas clases lipídicas fue estimada mediante densitometría a partir de placas de TLC de alta performance. Se puede observar que el EgAgB es capaz de unir una amplia variedad de clases lipídicas. Imagen adaptada de Obal et al., 2012.

Asimismo, en dicho trabajo se determinó que la porción lipídica del EgAgB constituye aproximadamente entre el 40 y el 50% de la masa total de la proteína. El hecho de presentar una gran proporción de lípidos tan variados hace suponer que la partícula de EgAgB podría adoptar una organización similar a la de las lipoproteínas que se encuentran en la hemolinfa de los invertebrados o en el plasma de los vertebrados (Jonas & Phillips, 2008). En este sentido, el análisis del EgAgB nativo en relación a su tamaño, relación lípido:proteína y densidad, sugiere que presentaría

similitudes con las lipoproteínas de alta densidad (HDL, del inglés *high density lipoprotein*) más pequeñas, conocidas como HDL<sub>3</sub> (Obal et al., 2012). En la Figura 1.14 se muestra un esquema con la estructura propuesta para el EgAgB nativo. Los lípidos más hidrofóbicos, como los triacilglicéridos y los esteres de esteroides se ubicarían en el interior de la partícula formando un *core* hidrofóbico, mientras que los fosfolípidos se encontrarían más expuestos, ubicando sus cabezas polares hacia el exterior y sus colas hidrofóbicas hacia el *core*. Otros lípidos neutros menos hidrofóbicos, como el colesterol y los ácidos grasos podrían estar en el *core* o más probablemente en contacto con los fosfolípidos, debido a sus grupos polares. Las diferentes subunidades de EgAgB también estarían expuestas en la superficie de esta partícula.



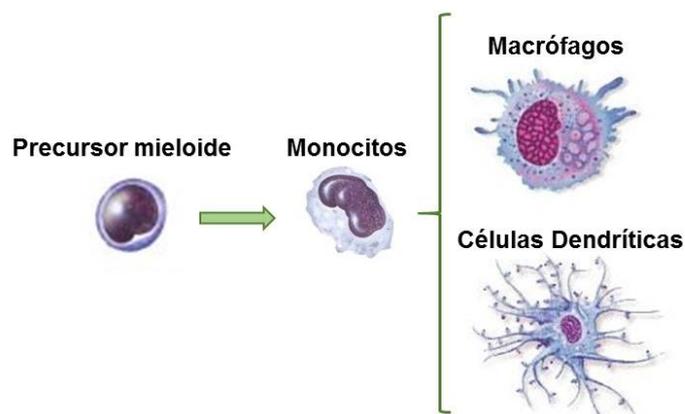
**Figura 1.14. Estructura propuesta para el EgAgB nativo.** En base a la variedad de lípidos unidos por el EgAgB nativo, a la densidad y tamaño de las partículas y a la relación lípido:proteína se propone que el EgAgB nativo formaría una estructura similar a la de las lipoproteínas conocidas, con un *core* hidrofóbico compuesto por triacilglicéridos (TAG) y los esteres de esteroides (EE); mientras que los fosfolípidos (PC, PE, PS y PI) y las distintas subunidades de EgAgB se encontrarían expuestas hacia el exterior. El colesterol y los ácidos grasos podrían repartirse entre un entorno más apolar y la capa fosfolípida. Imagen realizada por el diseñador Mario R. Ramos (INIBIOLP, UNLP-CONICET).

De acuerdo al tamaño de estas partículas, aproximadamente entre 10 y 15 subunidades se encontrarían expuestas, lo cual le permitiría al EgAgB establecer múltiples contactos con distintas moléculas. Esto tiene especial repercusión, teniendo en cuenta su posible interacción con receptores en células blanco, ya que aumentaría la avidez de la interacción. La posibilidad de que el EgAgB interacte con células blanco del hospedador, en particular con células del sistema inmune, se apoya en varios trabajos que han descripto que este antígeno es capaz de modular la respuesta inmune establecida por el hospedador (Siracusano et al., 2008). Estas ideas se describen con más detalle a continuación.

### 1.4.2. Funciones del EgAgB

El rol que cumple el EgAgB en *E. granulosus* es aún desconocido, los primeros trabajos llevados a cabo para conocer su función se centraron en su potencial como modulador de la respuesta inmune del hospedador. En este sentido, los ensayos iniciales mostraron que las subunidades de EgAgB eluidas a partir de una fracción de bajo peso molecular de geles de poliacrilamida inhibieron la quimiotaxis de los neutrófilos inducida por quimioquinas como la proteína de complemento C5a y el factor activador de las plaquetas (Shepherd et al., 1991) y por productos bacterianos (Riganò et al., 2001). Asimismo, se encontró que en células mononucleares de sangre periférica ésta preparación fue capaz de inducir la síntesis de IL-4 e IL-13, interleuquinas asociadas con una respuesta de tipo Th2 (del inglés *T-helper*), pero no así de IL-12, interleuquina típica de la respuesta Th1. Además, las células tratadas con EgAgB produjeron menores niveles de otras citoquinas pro-inflamatorias, como el interferón- $\gamma$ , que las mismas células estimuladas directamente con líquido hidático (Riganò et al., 2001). Más recientemente, se encontró que el EgAgB es capaz de interferir con la diferenciación y/o activación de varias poblaciones celulares de la línea mieloide, incluyendo monocitos, células dendríticas y macrófagos (ver Figura 1.15). En particular se encontró que es capaz de inhibir la diferenciación de monocitos a células dendríticas, afectando la expresión de moléculas co-estimuladoras (Rigano et al., 2007). Asimismo, se encontró que el EgAgB también es capaz de modular el fenotipo que adquieren estas células dendríticas maduras y activadas por lipopolisacáridos bacterianos; se observó que la presencia del EgAgB durante la estimulación de células dendríticas inmaduras por lipopolisacáridos bacterianos interfiere con la síntesis de interleuquinas pro-inflamatorias (Rigano et al., 2007). Evidencias en similar dirección se han obtenido por nuestro grupo, empleando monocitos y macrófagos. A diferencia de los estudios anteriormente descritos, en estos ensayos se utilizó EgAgB nativo inmunopurificado a partir de líquido hidático. En estos ensayos se encontró que esta preparación fue capaz de inhibir la quimiotaxis de monocitos de sangre periférica inducida por quimioquinas implicadas en el direccionamiento de los monocitos a sitios inflamatorios, como las proteínas CCL2 y CCL13. Más aún, el EgAgB fue capaz de modular la activación de monocitos y macrófagos de la línea celular THP-1 por componentes de patógenos como lipopolisacáridos bacterianos y sonicado de protoescolices, sintetizando menores niveles de interleuquinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa y la IL-1. Ensayos preliminares sugieren que esto ocurriría por un mecanismo que involucra una disminución en la translocación al

núcleo de la subunidad p65 del factor nuclear  $\kappa$ B (Ramos, 2008). En conjunto, los datos obtenidos con los diferentes tipos celulares sugieren que el EgAgB estaría implicado en la regulación de la respuesta de las células mieloides. Sin embargo, no se ha determinado el mecanismo por el cual el EgAgB cumpliría esta función



**Figura 1.15. Principales células derivadas de precursores mieloides.** En la médula ósea se originan diferentes precursores, entre ellos el precursor mielóide a partir del cual se originan los monocitos. Los monocitos son células que circulan en la sangre y son capaces de migrar hacia los tejidos y diferenciarse a macrófagos (Geissmann et al., 2008, 2010). En los tejidos, los macrófagos actúan como células centinela, monitoreando la presencia de señales de peligro, como microorganismos, células muertas o cuerpos extraños, fagocitándolos y manteniendo así la homeostasis. Los macrófagos presentan una gran diversidad de receptores que les permiten reconocer motivos asociados a patógenos y patrones moleculares asociados al daño, desencadenando distintas vías de señalización que modulan su expresión génica y determinan su fenotipo celular resultante. Así, los macrófagos contribuyen a la inflamación tanto en su fase inicial como en su resolución a través de la generación de citoquinas tanto pro como anti-inflamatorias que modulan su propia respuesta y la de otros tipos celulares. Además localmente actúan como células presentadoras de antígeno a células T efectoras que sean reclutadas en el sitio de inflamación (Janeway et al., 2001). En condiciones inflamatorias, los monocitos de la sangre también pueden migrar al tejido y diferenciarse a células dendríticas (Geissmann et al., 2010). Las células dendríticas son importantes mediadoras en la respuesta inmune, que también reconocen a los patógenos y son capaces de migrar a los ganglios a través de la linfa, actuando principalmente como células presentadoras de antígeno a células T, siendo un importante nexo entre la inmunidad innata y la adaptativa (Janeway et al., 2001)

Por otro lado, la reciente elucidación del componente lipídico del EgAgB ha contribuido a proponer un papel para esta molécula en el metabolismo lipídico del parásito. Este papel se sustenta en varias evidencias: i) el EgAgB es capaz de unir una amplia variedad de lípidos, muchos de los cuales son esenciales para el parásito, como los ácidos grasos y el colesterol (Obal et al., 2012); ii) el EgAgB se encuentra presente en la interfaz con el hospedador; iii) que esta función sería compartida por las HLBP, dado que la proteína TsM150, ha mostrado capacidad para captar lípidos fluorescentes y transportarlos hacia el interior de metacestodos en cultivo (Lee et al., 2007); y iv) la presencia de receptores con homología receptores de lipoproteínas

flanqueando los genes de EgAgB (Zheng H. et al., 2013). La participación del EgAgB en el metabolismo se centraría en la captación y distribución de lípidos que son esenciales para el parásito. Para que esto ocurra, sería necesario que el EgAgB interactúe con moléculas o células blanco del hospedador de los cuales pueda adquirir estos lípidos. Una vez adquiridos, el EgAgB debería de poder descargarlos a los diferentes tejidos del parásito. La toma y descarga de estos ligandos implicaría que el EgAgB deber ser capaz de interactuar con distintos tipos de blancos moleculares, tanto en el hospedador como en el propio parásito. Es posible que estas interacciones involucren distintas subunidades de EgAgB.

Dentro de las moléculas del hospedador con las que el EgAgB podría interactuar para adquirir lípidos están las lipoproteínas plasmáticas. Es interesante mencionar que las lipoproteínas de los mamíferos suelen intercambiar lípidos entre ellas formando los diferentes tipos de lipoproteínas circulantes (Fielding & Fielding, 2008). Dado que un estudio proteómico ha mostrado presencia de apolipoproteínas en el líquido hidático, particularmente la apolipoproteína AI, componente de la HDL (Aziz et al., 2011), este intercambio podría ocurrir tanto dentro como fuera del quiste. No se conocen los mecanismos que permiten el ingreso de la apolipoproteína A-I al metacestodo.

Por otro lado, la interacción que se ha descrito entre el EgAgB y células mieloides, sugiere que el EgAgB podría tomar los lípidos a través de la interacción con estas células, por un mecanismo que podría asemejarse al mediado por la HDL para extraer el exceso de colesterol de los macrófagos (transporte reverso del colesterol). A su vez, esta interacción podría afectar el fenotipo inflamatorio de las mismas, como se ha visto para otras lipoproteínas (De Nardo et al., 2014), explicando los efectos descritos para el EgAgB. Más aún, esta interacción podría dirigir a las células a activar vías metabólicas que favorezcan la producción de determinados intermediarios lipídicos necesarios para el parásito. Estas ideas implican la interacción del EgAgB con estas células a través de receptores que puedan activar vías de señalización celular. En este sentido, ensayos preliminares de nuestro grupo, utilizando citometría de flujo mostraron que el EgAgB nativo es capaz de unirse a monocitos purificados a partir de sangre periférica y a monocitos y macrófagos de la línea THP-1 (Ramos, 2008). En estos ensayos no se evaluó si esta unión está mediada únicamente por la fracción proteica del EgAgB o si los lípidos participan en la interacción. Tampoco se ha podido determinar cuál es el receptor que reconoce al EgAgB en estas células, ni las cascadas de señalización eventualmente inducidas. En este sentido, debe considerarse también la posibilidad de que el EgAgB ejerza su función moduladora transfiriendo lípidos hacia estas células, sin embargo, la capacidad del EgAgB de

transferir ligandos tampoco ha sido explorada.

Finalmente, para que el EgAgB funcione como transportador de lípidos del hospedador hacia el parásito necesariamente deber entregar los lípidos a células o moléculas blanco en el parásito. Como ya se mencionó, es interesante el hecho que los genes que codifican para las distintas subunidades de EgAgB están flanqueados por genes que codifican para proteínas que tienen similitud con los dominios de clase A presentes en receptores de varias lipoproteínas. Esto significa que las células del parásito podrían expresar receptores capaces de reconocer lipoproteínas (Zheng H. et al., 2013). A través de la interacción con este tipo de receptores el EgAgB podría entregar sus lípidos a estas células.

En resumen, el EgAgB podría estar involucrado en diversos mecanismos que favorecerían la sobrevivencia del parásito en su hospedador. Por un lado, participando en la generación de una respuesta inmune más permisiva y tolerante hacia el parásito, así como también en la adquisición de lípidos que el parásito no puede sintetizar por sí mismo y debe adquirir del hospedador para formar lípidos más complejos. Estas funciones no necesariamente serían independientes, dado que ambas podrían ocurrir mediante la interacción del EgAgB con diferentes tipos de células, incluyendo células del sistema inmune. Recientemente se ha descrito que las vías metabólicas e inmunológicas han evolucionado compartiendo algunas características que le permiten una coordinación y comunicación bidireccional (Odegaard & Chawla, 2013). Sin embargo, muchos interrogantes restan aún por ser esclarecidos para conocer el papel del EgAgB en la biología de *E. granulosus*.

## **1.5. Hipótesis y objetivos**

### **1.5.1. Hipótesis general**

Como se comentó anteriormente, la función tradicionalmente propuesta para el EgAgB está relacionada con su capacidad de modular la respuesta inmune del hospedador. No obstante, el reciente avance en la caracterización bioquímica del EgAgB sugiere que esta lipoproteína tendría una estructura similar a la de las lipoproteínas plasmáticas, donde las subunidades proteicas y principalmente los fosfolípidos, en particular la fosfatidilcolina, formarían una capa externa de naturaleza anfipática, capaz de establecer interacciones con el medio acuoso externo y con los lípidos más hidrofóbicos contenidos en el interior de la misma. A partir de esta

información, es posible plantear una novedosa función para el EgAgB en la biología de *E. granulosus*. Esta lipoproteína podría participar en el transporte de lípidos propios, pero también en la adquisición de lípidos esenciales que no son sintetizados por el parásito y deben ser tomados del hospedador. De este modo, el EgAgB sería capaz de transportar estas moléculas hidrofóbicas a través del medio acuoso y transferirlas a los diferentes tejidos del parásito. En este marco, las distintas subunidades de EgAgB podrían tener diferente afinidad por distintos ligandos lipídicos y transferir estos ligandos hacia distintas moléculas y/o células blanco de diferente modo, hecho que podría estar relacionado con la expresión diferencial de estas subunidades en diferentes tejidos y/o estadios del parásito. Por otro lado, proponemos que la adquisición de los lípidos a partir del hospedador podría implicar que el EgAgB interactúe con diversas moléculas y en particular con células. En este caso, las distintas subunidades también podrían unirse de forma diferencial a estas células. Esta interacción con las células del hospedador, en particular con las células del sistema inmune, tendría consecuencias relevantes en la adaptación del parásito a las defensas del hospedador. La unión del EgAgB a las células dispararía vías de señalización intracelulares que inducirían globalmente un fenotipo modulador que contribuya al apagado de la inflamación generada por el parásito, en concordancia con los datos experimentalmente obtenidos y con la función inicialmente propuesta para el EgAgB. Esta modulación podría implicar que el EgAgB utilice receptores evolutivamente desarrollados para la interacción con lipoproteínas plasmáticas nativas, razón por la cual sus señales no sean de tipo inflamatorio. No obstante, la capacidad de las distintas subunidades de EgAgB de interactuar con estas células, así como la participación de los lípidos en esta interacción no ha sido establecida.

### 1.5.2. Objetivo general

La hipótesis general es indudablemente compleja y difícil de abarcar en el marco de un trabajo de tesis doctoral. De hecho, comprender el papel del EgAgB en la biología de *E. granulosus* requiere de una gran variedad de estudios que aborden diferentes aspectos de la hipótesis planteada. En este trabajo se intentó profundizar en algunos puntos que contribuirán a la comprensión general de la estructura y función del EgAgB, pero que no logran abordar muchas de las preguntas que es posible formular dentro de la hipótesis general. En particular, el trabajo apuntó a aportar información sobre las interacciones involucradas entre los constituyentes proteicos y lipídicos en el EgAgB y entre las subunidades proteicas y membranas modelo o células

del sistema inmune. Concretamente se propuso analizar: i) la participación de los lípidos en el proceso de oligomerización de las subunidades de EgAgB; ii) la capacidad de distintas subunidades de EgAgB de unir diferentes ligandos y de transferirlos hacia membranas fosfolipídicas, y iii) la capacidad de distintas subunidades de EgAgB de interactuar con células del sistema inmune, evaluando la participación de los lípidos en esta interacción. Para esto, se utilizaron como herramientas las subunidades recombinantes EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3, dado que las tres están presentes en el metacestodo. Para cumplir con este objetivo general se plantearon los objetivos específicos detallados a continuación.

### 1.5.3. Objetivos específicos

#### 1.5.3.1. Obtención de las subunidades recombinantes de EgAgB libres de lípidos.

Con el fin de analizar la contribución de la fracción proteica y lipídica en algunas de las propiedades descritas para la partícula de EgAgB nativo, primeramente se planteó como objetivo la obtención de las subunidades recombinantes EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 con un alto grado de pureza, en cantidades adecuadas y en su forma libre de lípidos.

#### 1.5.3.2. Análisis de la capacidad de oligomerización de las subunidades de EgAgB libres de lípidos.

Para evaluar la contribución de los lípidos en la oligomerización previamente descrita para las subunidades de EgAgB se planteó como objetivo analizar la capacidad de oligomerización de las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 libres de lípidos obtenidas en el primer objetivo.

#### 1.5.3.3. Caracterización de las propiedades de unión de las subunidades de EgAgB a ligandos lipídicos.

Con el objetivo de analizar posibles ligandos de las distintas subunidades de EgAgB se planteó evaluar la capacidad de las subunidades recombinantes EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 libres de lípidos bacterianos de unirse a diferentes ligandos hidrofóbicos *in vitro*, así como determinar su afinidad por los mismos y la estequiometría de los complejos obtenidos.

#### 1.5.3.4. Análisis de la capacidad de las subunidades de EgAgB de unirse y transferir ácidos grasos hacia membranas fosfolipídicas.

Para estudiar la capacidad de las distintas subunidades de EgAgB de transferir ligandos hacia membranas, se planteó como objetivo específico evaluar la transferencia de ácidos grasos desde las subunidades de EgAgB hacia vesículas fosfolipídicas modelo y caracterizar los factores que modulan la velocidad con que ocurre dicho proceso.

#### 1.5.3.5. Análisis de la capacidad del EgAgB nativo de unirse a monocitos y macrófagos: contribución de los componentes proteicos y lipídicos.

Con el fin de evaluar la contribución de las fracciones proteicas y lipídicas del EgAgB en la unión del EgAgB nativo a monocitos y macrófagos descrita previamente, se planteó analizar la capacidad de las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 libres de lípidos de unirse a estas células, así como también se evaluó la contribución de los fosfolípidos presentes en el EgAgB nativo en esta interacción.

**MATERIALES**  
**Y**  
**MÉTODOS**

En este capítulo se describen los materiales y métodos empleados durante el desarrollo de este trabajo, divididos en varias secciones, ordenados según el objetivo específico para el cual se utilizaron. Salvo que se aclare explícitamente, todos los procedimientos descritos fueron llevados a cabo en el INIBIOLP. En caso contrario, se indica oportunamente el lugar donde los experimentos fueron realizados.

## **2.1. Obtención de las subunidades recombinantes de EgAgB libres de lípidos**

En esta sección se describen los materiales y métodos empleados para llevar a cabo el primer objetivo de este trabajo, es decir la obtención de las subunidades recombinantes de EgAgB libres de lípidos. En una primera instancia se detallan los materiales y métodos generales de biología molecular, análisis de ADN, proteínas y lípidos utilizados. Algunos de estos métodos generales también fueron empleados en el desarrollo de otros objetivos, por lo que son citados de acuerdo a su numeración según corresponda en las secciones siguientes. Posteriormente se desarrollan los materiales y métodos específicos empleados para purificar y caracterizar las subunidades de EgAgB deslipidizadas.

### **2.1.1. Materiales y métodos generales**

#### **2.1.1.1. Aislamiento y purificación de plásmidos bacterianos**

El aislamiento y purificación de los distintos plásmidos bacterianos a partir de sus correspondientes cepas de *Escherichia coli* se llevó a cabo empleando el kit comercial *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas, Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello 5 mL de un cultivo bacteriano líquido fueron centrifugados en tubos tipo *Falcon* de 50 mL durante 10 minutos a 4500 rpm en una centrifuga *Avanti J-E* (Beckman Coulter) empleando el rotor oscilante *JS-5.3*. El sobrenadante fue retirado y el *pellet* resultante fue resuspendido en la solución de resuspensión proporcionada en dicho kit. Luego de agitar vigorosamente, se transfirió este contenido a un tubo tipo *Eppendorf*, se le agregó la solución de lisis y luego de mezclar por inversión se le agregó la solución de neutralización. Luego de mezclar nuevamente por inversión los tubos se centrifugaron durante 5 minutos a 15000 rpm

(velocidad máxima) en una centrífuga refrigerada *Sorvall® Legend Mach 1.6R* (Thermo Fisher Scientific) empleando el rotor de ángulo fijo *Microliter Rotor*, para eliminar los restos celulares bacterianos y el ADN cromosómico. El sobrenadante resultante fue transferido a las columnas *GeneJET Spin Column* proporcionados en el kit y centrifugado a velocidad máxima durante 1 minuto, descartando el filtrado. El ADN plasmídico retenido en el filtro fue lavado dos veces con solución de lavado y los restos de etanol contenido en dicha solución fueron eliminados por centrifugación a velocidad máxima durante 1 minuto. Finalmente, el ADN plasmídico fue eluido en un nuevo tubo tipo *Eppendorf* incubando el filtro con la solución de elución durante dos minutos y luego centrifugando a velocidad máxima durante dos minutos. Este paso fue repetido dos veces y el filtrado conteniendo el ADN plasmídico fue conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso. Los distintos plásmidos empleados en este trabajo serán aclarados en los ítems siguientes, según corresponda.

#### 2.1.1.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

El análisis y la separación de los distintos plásmidos bacterianos, fragmentos de ADN y productos de PCR utilizados en este trabajo fueron realizados mediante geles de agarosa. Se utilizaron geles con una concentración de agarosa adecuada para resolver los fragmentos de interés en cada caso, en un rango entre 1.5 y 0.8 % (m/v). La agarosa (Invitrogen, Life Technologies) fue disuelta en una solución amortiguadora Tris 90 mM, Borato 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8.0 (TBE) conteniendo *SYBR® Safe* (Invitrogen, Life Technologies) en una dilución 1/10000 para la detección del ADN. Las muestras de ADN fueron preparadas agregando solución siembra 6X (sacarosa 40%, azul de bromofenol 0.25%). En paralelo se emplearon marcadores moleculares de acuerdo a las necesidades: marcador para fragmentos pequeños *100 bp DNA Ladder*, y marcador para fragmentos grandes *1 Kb Plus DNA Ladder*, ambos adquiridos a Invitrogen, Life Technologies. Las muestras de ADN conjuntamente con los marcadores moleculares empleados en cada caso se corrieron a una intensidad de corriente eléctrica de 100 V durante 50-70 minutos, de acuerdo al avance del frente de corrida en cada caso. Las imágenes de los geles fueron tomadas en un equipo *ImageQuant 350* (GE Healthcare Life Sciences) empleando iluminación ultravioleta.

### 2.1.1.3. Extracción y purificación de ADN a partir de geles de agarosa

La extracción y purificación de ADN a partir de los geles de agarosa descritos en el ítem 2.1.1.2, se realizó empleando el kit comercial *DNA Gel Extraction Kit* (Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones. Las bandas de ADN de interés se visualizaron mediante iluminación ultravioleta, se cortaron con bisturí y se procesaron sobre una superficie lisa. La banda de gel procesada conteniendo el ADN de interés se transfirió a la columna proporcionada por el kit y se centrifugó a velocidad máxima durante 15 minutos empleando el rotor y la centrifuga *Sorvall® Legend Mach 1.6R* descritos previamente. Luego se incubó con 100 µL de solución amortiguadora Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0 (TE) durante 10 minutos y se centrifugó nuevamente a máxima velocidad durante 10 minutos. El filtrado obtenido conteniendo el ADN purificado se sometió a un protocolo de precipitación con etanol (Sambrook & Russell, 2001) para concentrar la muestra. Para ello se agregó el equivalente al 10% del volumen obtenido de acetato de sodio 3 M y dos veces el volumen de etanol 96% y se incubó durante toda la noche a -20°C. A continuación se centrifugó a velocidad máxima durante 20 minutos y se descartó el sobrenadante. El *pellet* obtenido se lavó con etanol 70%, se centrifugó a velocidad máxima durante 10 minutos y se dejó secar a temperatura ambiente con el tubo abierto. El *pellet* resultante fue luego resuspendido en el volumen deseado de agua bidestilada o de solución TE y conservado a -20°C hasta su posterior uso.

### 2.1.1.4. Cuantificación de ADN

La cuantificación de ADN se llevó a cabo mediante la comparación de las bandas obtenidas en geles de agarosa con estándares de ADN aptos para estimar de forma cuantitativa la cantidad de ADN. De acuerdo a las necesidades, se emplearon los estándares comerciales *Low DNA Mass Ladder* para fragmentos pequeños o *High DNA Mass Ladder* para fragmentos grandes, ambos adquiridos a Invitrogen, Life Technologies. Dichos estándares fueron corridos en paralelo a las muestras de interés en geles de agarosa de acuerdo a las instrucciones del fabricante, siguiendo el protocolo de preparación de geles de agarosa descrito en el ítem 2.1.1.2. La determinación de la cantidad de ADN en ng se realizó analizando las imágenes de los geles de agarosa tomadas en el equipo *ImageQuant 350* empleando el programa *ImageQuant TL* provisto con el equipo.

#### 2.1.1.5. Preparación de bacterias competentes

La preparación de las bacterias competentes con la finalidad de hacerlas más permeables a la adquisición del ADN plasmídico se llevó a cabo empleando un tratamiento químico. Para ello, se inocularon 5 mL de un cultivo líquido de bacterias no competentes crecidas toda la noche a 37°C con agitación fuerte en presencia del antibiótico correspondiente en 100 mL de medio Luria-Bertani (medio LB) preparado con triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 10 g/L, esterilizado en autoclave y sin antibiótico. Se dejó crecer este inóculo hasta alcanzar una absorbancia a 600 nm cercana a 0.5 y se enfrió el cultivo durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente el cultivo se transfirió a tubos estériles tipo *Falcon* de 50 mL y se centrifugó a 2000 rpm en frío durante 15 minutos, empleando el rotor y la centrifuga *Avanti J-E* descriptos previamente. Se descartó el sobrenadante y los *pellets* resultantes se resuspendieron en 30 mL (por cada 100 mL de cultivo original) de solución amortiguadora RbCl 100 mM, MnCl<sub>2</sub> 50 mM, acetato de potasio 30 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, Glicerol 15 %, pH=5.8, esterilizado mediante filtración en membranas de 0.22 µm. Luego de incubar los tubos durante 90 minutos en hielo, se centrifugaron a 2000 rpm a 4°C durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante. Los *pellets* resultantes se resuspendieron en 4 mL (por cada 100 mL de cultivo original) de solución amortiguadora MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 75 mM, Glicerol 15 %, pH= 8.0, esterilizada en autoclave. Las bacterias competentes así preparadas se separaron en alícuotas de 300 µL y se conservaron a -70°C hasta su posterior uso.

#### 2.1.1.6. Transformación de bacterias competentes

La transformación de las bacterias competentes preparadas de acuerdo al ítem 2.1.1.5 para la adquisición de los plásmidos utilizados en este trabajo se realizó mediante la técnica de choque térmico. Con tal fin, a 200 µL de bacterias competentes se le adicionaron 50 ng de ADN plasmídico (en un volumen no mayor a 10 µL) y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Posteriormente se transfirieron los tubos a un baño con una temperatura fija de 42°C durante 50 segundos e inmediatamente se transfirieron nuevamente al hielo. Luego se agregaron 0.9 mL de medio LB a cada tubo y se mantuvieron a 37°C durante una hora con agitación fuerte. Una alícuota de 100 µL de este cultivo líquido, así como el *pellet* obtenido por centrifugación, fueron extendidos sobre placas de LB conteniendo Agar 15 g/L con el antibiótico correspondiente en cada caso. Controles positivos de la transformación con plásmidos

comerciales, así como controles negativos adicionando H<sub>2</sub>O bidestilada estéril en lugar de ADN fueron llevados a cabo en paralelo. El control de viabilidad de las células competentes se llevó a cabo extendiendo una alícuota de las células tratadas con H<sub>2</sub>O bidestilada estéril en placas de LB-Agar sin antibiótico. El contenido extendido en las placas se dejó adsorber durante 15 minutos y posteriormente las placas invertidas fueron incubadas a 37°C durante toda la noche. A continuación se seleccionaron varias colonias que fueron inoculadas en medio líquido para verificar la presencia del plásmido mediante obtención del ADN plasmídico y posterior análisis en geles de agarosa, siguiendo los protocolos descritos en los ítems 2.1.1.1 y 2.1.1.2, respectivamente. Las bacterias transformadas con los distintos plásmidos fueron conservadas en medio LB conteniendo 20% glicerol y mantenidas a -80°C hasta su posterior uso. Las distintas cepas de bacterias utilizadas durante este trabajo se aclararán en los ítems siguientes, según corresponda.

#### 2.1.1.7. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

El análisis de la expresión de las proteínas en las bacterias transformadas, así como el análisis de las distintas fracciones proteicas obtenidas durante los pasos de purificación de proteínas, se realizó mediante geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones reductoras, siguiendo el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Para ello, se prepararon geles concentradores al 4% (m/v) y geles separadores de 12.5%, 15% o 20% (m/v) de acuerdo a las necesidades de las muestras a analizar, con un espesor de 1.0 mm, 6 cm de altura, 8 cm de largo y 10 pozos, empleando el equipo *Mini-PROTEAN® Tetra Cell* (Bio-Rad). Las muestras fueron preparadas en una solución de siembra Tris-HCl 70 mM, SDS 2% (m/v), Glicerol 10% (v/v), pH 6.8, conteniendo 2-mercaptoetanol 2.5% (v/v) y azul de bromofenol (20 µg/mL) y calentadas a 100°C durante 3-5 minutos en bloque térmico previo a ser sembradas en el gel. Los geles se corrieron en una solución de corrida Tris-HCl 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1%, pH 8.3 a intensidad de corriente eléctrica de 100 V durante 20 minutos y de 200 V durante otros 40-60 minutos, de acuerdo al avance del frente de corrida. En paralelo se utilizaron marcadores de peso molecular de acuerdo a las necesidades: marcador de bajo peso molecular *LMW-SDS Marker Kit* y marcador de péptidos *Peptide Marker Kit*, ambos adquiridos a GE Healthcare Life Sciences. La detección de las bandas proteicas se llevó a cabo empleando el colorante *Coomassie Brilliant Blue R-250* (Bio-Rad) en una solución al 0.1% en H<sub>2</sub>O:metanol:ácido acético (5:5:2 v/v/v) y posteriormente decolorando con una

solución 10% ácido acético, 30% etanol. Las imágenes de los geles fueron tomadas en el equipo *ImageQuant 350* descrito previamente empleando luz blanca.

#### 2.1.1.8. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de las proteínas puras se llevó a cabo midiendo la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro *T70 UV/VIS* (PG Instruments) empleando cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico (Hellma). Además del valor puntual de absorbancia a 280 nm, se tomaron espectros de absorción entre 240-340 nm de cada proteína con el fin de descartar presencia de ácidos nucleicos (valor de absorbancia a 260 nm) y la presencia de agregados proteicos evidenciados por el efecto de dispersión de luz (valor de absorbancia a 340 nm). La concentración de las muestras proteicas puras se calculó empleando el coeficiente de extinción molar de cada proteína calculado en base a su secuencia proteica (ver Tabla 7.1 en la sección Apéndices). En algunos casos también se cuantificaron las proteínas empleando el kit comercial *Qubit® Protein Assay Kit* (Molecular Probes, Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras de proteínas se incubaron con la solución de trabajo, obtenida mezclando la solución amortiguadora y el reactivo fluorescente proporcionados en dicho kit, en los tubos específicos del kit y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente los tubos con las muestras proteicas y los estándares provistos con el kit tratados en paralelo se midieron en un fluorómetro *Qubit® 2.0* (Molecular Probes, Life Technologies). La concentración proteica de las muestras problema se determinó por comparación con los estándares.

#### 2.1.1.9. Extracción de lípidos

La extracción de lípidos se realizó mediante un método basado la técnica descrita por Folch (Folch et al., 1957) con adaptaciones. Brevemente, 2 mL de cada muestra se homogenizaron vigorosamente en tubos de vidrio con 10 mL de solución de Folch (cloroformo:metanol en relación 2:1 v/v) y se filtraron por gravedad sobre tubos de vidrio conteniendo 500  $\mu$ L de NaCl 0.5 M para favorecer la separación de la fases orgánica y acuosa. La completa separación de fases se logró mediante centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos en una centrifuga modelo *UV* (International Equipment Centrifuge), empleando el Rotor 279. La fase superior o acuosa se descartó delicadamente por aspiración, mientras que la fase orgánica o inferior fue transferida a un matraz de fondo redondo y secada completamente bajo corriente de  $N_2$  (g). Los

lípidos obtenidos se disolvieron en cloroformo, se transfirieron a viales de vidrio color caramelo y se gasearon con  $N_2$  (g) para prevenir su oxidación, siendo conservados a  $-20^\circ C$  hasta su posterior uso. Para evitar contaminaciones, todo el material de vidrio utilizado para la extracción lipídica fue lavado con solución de Folch previo a su uso.

#### 2.1.1.10. Análisis de lípidos por cromatografía en capa fina

Los lípidos extraídos empleando la técnica descrita en el ítem 2.1.1.9 fueron analizados mediante cromatografía de capa fina (TLC), siguiendo un protocolo descrito previamente para el análisis de los lípidos nativos de la proteína EgAgB (Obal et al., 2012). Para ello, se utilizaron las placas de TLC de gel de sílice *TLC Silica gel 60* (Merck) de 20 x 20 cm pre-activadas a  $100^\circ C$  durante 30 minutos. Una vez que la placa se enfrió, los lípidos disueltos en cloroformo se sembraron cuidadosamente utilizando una microjeringa de 10  $\mu L$  (Hamilton Company) a una distancia de 1 cm del borde inferior de la placa. La resolución de los lípidos se realizó empleando la técnica de doble desarrollo, que consistió en una primera instancia en dejar ascender la mezcla de solventes para resolver los lípidos polares hasta la mitad de la placa, permitiendo que los lípidos polares se separen, mientras que los lípidos neutros migran con el frente de corrida en la parte superior. En una segunda instancia, se dejó ascender la mezcla de solventes para resolver los lípidos neutros a través de la placa seca hasta una distancia de 1 cm del borde superior de la placa. En este caso los lípidos polares separados en la primera mitad de la placa no migran, mientras que en la otra mitad de la placa se logra la resolución de los lípidos neutros. La mezcla de solventes utilizada para la resolución de los lípidos polares fue acetato de metilo:isopropanol:cloroformo:metanol:KCl 0.25% (25:25:25:10:9, v/v/v/v/v), mientras que la resolución de los lípidos neutros se llevó a cabo utilizando hexano:éter etílico:ácido acético (80:20:1, v/v/v). En otros casos, los lípidos neutros y polares fueron analizados en placas por separado. Para una mejor resolución de los lípidos se utilizaron dos cubas de TLC, cada una saturada con la mezcla de solventes correspondiente a lípidos polares o neutros durante 30 minutos previos a la cromatografía. La detección de las especies lipídicas se realizó colocando la placa en una cuba saturada con vapores de yodo o mediante pulverización de las placas con  $CuSO_4$  8 % (m/v) en  $H_3PO_4$  acuoso 10% (v/v) a  $140^\circ C$ . La identificación de las distintas especies se basó en la comparación con una mezcla de estándares puros y/o con un extracto de lípidos totales obtenido de hígado de rata, corridos en paralelo. Las imágenes de las placas fueron digitalizadas mediante un escáner convencional.

## 2.1.2. Subclonado de las subunidades de EgAgB en el plásmido pET-28b

Las secuencias de ADN codificante para las subunidades de EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 clonadas en el plásmido pGEX-4T-1 (GE Healthcare Life Sciences), fueron generosamente donadas por el Dr. Arnaldo Zaha (Universidad Federal de Río Grande del Sur [UFRGS], Porto Alegre, Brasil). Debido a que en nuestro laboratorio no se contaba con los materiales para llevar a cabo la purificación de las subunidades recombinantes empleando este sistema de clonado, inicialmente se procedió a subclonar el ADN codificante al sistema pET (Novagen), de amplio manejo en el laboratorio. Particularmente, se eligió el plásmido pET-28b (ver Figura 7.2 en la sección Apéndices), debido a que presenta una secuencia N-terminal al sitio de clonado que codifica para una cola de seis histidinas, que permite la purificación de las proteínas recombinantes por afinidad con metales quelados y luego puede ser eliminada mediante tratamiento con proteasas específicas. A continuación se describirán los materiales y métodos específicos para llevar a cabo el subclonado de las subunidades de EgAgB en pET-28b.

### 2.1.2.1. Diseño de *primers* específicos para las subunidades de EgAgB

Se diseñaron *primers* para amplificar las secuencias de EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de las secuencias clonadas en el plásmido pGEX4T por el grupo del Dr. Zaha (Fernández et al., 1996; Rott et al., 2000; Chemale et al., 2001). Se agregaron las secuencias correspondientes a las regiones de reconocimiento de las enzimas de restricción NdeI y BamHI, con el fin de obtener fragmentos con sitios de restricción que permitan insertarlos en el plásmido pET-28b empleando dichas enzimas. Se verificó que los *primers* no tuvieran capacidad de formar dímeros de *primers* ni estructuras de tipo horquilla. Los *primers forward* (F) y *reverse* (R) diseñados fueron adquiridos a Sigma Aldrich Corporation y su secuencia fue la siguiente:

AgB8/1F: 5' AAGCATATGGTGGTGGTTACTCAGGCTGATG 3'  
 AgB8/1R: 5' TATGGATCCCTATTCACCTTCAGCAATCAACCC 3'  
 AgB8/2F: 5' CTACATATGGGCCGTCGTTCAAGCTAAAGATGA 3'  
 AgB8/2R: 5' GCGGATCCTTACTTTGAATCATCATCTTTTTCTTCCAC 3'  
 AgB8/3F: 5' GTCCATATGGATGATGATGATGATGAAGTGACA 3'  
 AgB8/3R: 5' AATGGATCCCTACTCATCCTCTTTAACCAACTT 3'

### 2.1.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa para amplificar los genes de EgAgB

Con los *primers* diseñados como se describió en el ítem 2.1.2.1, se procedió a la puesta a punto de la PCR para amplificar los genes de las tres subunidades de EgAgB. Para ello se ensayaron distintas temperaturas de hibridización de los *primers* al ADN molde y distintas concentraciones de  $MgSO_4$  con el fin de obtener el la mayor eficiencia posible. Finalmente, las PCR se realizaron en un volumen final de 50  $\mu$ L conteniendo 2-20 ng de plásmido pGEX-4T-1 conteniendo las construcciones de cada subunidad como ADN molde, 0.3 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dNTPs, Invitrogen, Life Technologies), 0.5  $\mu$ M  $MgSO_4$ , 0.3  $\mu$ M de cada *primer* y 1 unidad de ADN polimerasa de alta fidelidad *Platinum® Pfx* (Invitrogen, Life Technologies) en la solución de reacción de la enzima, adicionada con una solución potenciadora, ambas provistas por el fabricante. Las condiciones de la PCR fueron un paso inicial de desnaturalización (94°C, 2 minutos), seguido de 35 ciclos con los siguientes pasos: desnaturalización (94°C, 30 segundos), hibridización (64°C, 30 segundos) y extensión (68°C, 1 minuto); y finalmente un último paso de extensión (68°C, 5 minutos). Los productos de PCR obtenidos fueron analizados en geles de agarosa al 1.5% (m/v) y posteriormente extraídos, purificados y cuantificados como se describió en los ítems 2.1.1.2, 2.1.1.3 y 2.1.1.4, respectivamente. Finalmente fueron conservados a -20°C hasta su posterior uso.

### 2.1.2.3. Preparación de los fragmentos de EgAgB para subclonar

Para facilitar el subclonado de los productos de PCR de las subunidades de EgAgB en el plásmido pET-28b, se realizó un paso intermedio de subclonado de estos productos en el plásmido pGEMT-Easy (Promega). Se utilizó este paso intermedio debido a que el corte con las enzimas de restricción es menos eficiente cuando el sitio de restricción está en el extremo de la molécula lineal de ADN, mientras que mejora ampliamente cuando los fragmentos de PCR están incluidos en un plásmido, lo que permite obtener los insertos cortados adecuadamente con las enzimas de restricción para su subclonado final en el plásmido de expresión. El plásmido pGEMT-Easy es un plásmido lineal, dado que posee un nucleótido de timina (T) en sus extremos 3', lo que disminuye la capacidad de religación del mismo y permite el subclonado de productos de PCR que contienen el nucleótido adenina en sus extremos (agregado por defecto por varias ADN polimerasas). En el caso de los fragmentos de PCR de EgAgB fue necesario adicionar estos extremos de adenina, dado que la ADN polimerasa utilizada

para la PCR no la agrega por defecto. Para ello, se comenzó utilizando el producto de PCR obtenido para la subunidad EgAgB8/1. Para el agregado de adenina se realizó un procedimiento conocido como *A-tailing*, para lo cual se utilizó un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ , conteniendo 5  $\mu\text{L}$  del producto de PCR, 0.2 mM de desoxiadenosina trifosfato (dATP, Invitrogen, Life Technologies), 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$  y 5 unidades de ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Invitrogen, Life Technologies). Esta mezcla de reacción se incubó durante 30 minutos a 70°C, siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se procedió a ligar este producto al plásmido pGEMT-Easy, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ , se emplearon 2  $\mu\text{L}$  del producto de PCR tratado con dATP, 50  $\mu\text{g}$  del plásmido pGEMT-Easy y 3 unidades de la ADN ligasa T4, en la solución de ligación provista por el kit. La mezcla de ligación fue incubada durante toda la noche a 4°C y los productos de ligación fueron posteriormente utilizados para transformar bacterias competentes preparadas como se describió en el ítem 2.1.1.5. Se utilizaron bacterias de *E. coli* de la cepa XL-1 Blue (gentilmente cedidas por la Dra. Casalangué, Universidad Nacional de Mar del Plata), que fueron transformadas siguiendo el protocolo de transformación de bacterias detallado en el ítem 2.1.1.6, empleando placas de LB-Agar conteniendo el antibiótico ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Sigma-Aldrich Corporation), isopropil  $\alpha$ -D-tiogalactósido (IPTG) 0.5 mM y 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-Gal) 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ambos de Promega. Este medio permite seleccionar aquellas bacterias que adquirieron el plásmido con el inserto de interés de las que tienen el plásmido sin inserto, mediante la selección blanco/azul de las colonias obtenidas. Las colonias azules corresponden a las células transformadas con el plásmido sin inserto, dado que pueden expresar la subunidad  $\alpha$  de la enzima  $\beta$ -galactosidasa mediante inducción con IPTG, y por lo tanto generar una enzima funcional capaz de hidrolizar al reactivo cromóforo X-Gal. Por el contrario, las colonias blancas corresponden a las células transformadas con el plásmido que sí contiene el inserto de interés, puesto que este interrumpe al gen de la subunidad  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidasa, y dado que las bacterias *E. coli* XL-1 Blue empleadas no expresan esta subunidad, no pueden hidrolizar al X-Gal, presentando un color blanco. De esta forma, se seleccionaron varias colonias de color blanco, de las cuales se extrajeron los plásmidos como se describió en el ítem 2.1.1.1, y se verificaron mediante digestión con enzimas de restricción específicas. Aquellos plásmidos que presentaron inserto fueron cortados de forma secuencial, en una primera instancia con la enzima BamHI (Promega) para linealizar el plásmido, y en una segunda instancia con la enzima NdeI (Promega) para liberar el fragmento digerido. El plásmido linealizado con la enzima BamHI, fue

extraído y purificado de geles de agarosa al 0.75% (m/v), como se describió en el ítem 2.1.1.3, previo a ser tratado con la enzima NdeI. Para ambas digestiones se utilizaron 100-500 ng de plásmido, 6 unidades de la enzima correspondiente (BamHI o NdeI), 2  $\mu$ L de la solución de reacción 10X recomendada por el fabricante (solución E para BamHI y solución D para NdeI) y 4  $\mu$ g de seroalbúmina bovina (BSA) acetilada provista por el kit, en un volumen final de 20  $\mu$ L, incubando por tres horas a 37°C. El fragmento digerido, correspondiente a la subunidad EgAgB8/1 fue finalmente analizado en geles de agarosa al 1.5% (m/v), extraído, purificado y cuantificado como se describió en los ítems 2.1.1.2, 2.1.1.3 y 2.1.1.4, respectivamente, y conservado a -20°C hasta su posterior uso.

#### 2.1.2.4. Preparación del plásmido pET-28b para subclonar

Dado que en el laboratorio se contaba con el plásmido pET-28b clonado con un inserto de ADN codificante para otra proteína, se emplearon las enzimas de restricción NdeI y BamHI para liberar este inserto, y subclonar los insertos correspondientes a EgAgB (que contenían los mismos sitios de restricción). El plásmido fue obtenido a partir de cultivos bacterianos que expresaban dicha construcción, siguiendo el protocolo de obtención de plásmidos bacterianos descrito en el ítem 2.1.1.1. Posteriormente, el plásmido fue digerido empleando 250 ng de plásmido, 6 unidades de NdeI, 12 unidades de BamHI, 2  $\mu$ L de la solución de reacción 10X recomendada por el fabricante (solución D) y 4  $\mu$ g de BSA acetilada provista por el kit, en un volumen total de 20  $\mu$ L. Las digestiones se incubaron durante tres horas a 37°C y posteriormente fueron analizadas en geles de agarosa al 1% (m/v), preparados como se describió en ítem 2.1.1.2. El plásmido digerido fue extraído y purificado como se describió en el ítem 2.1.1.3. Posteriormente, el plásmido sin inserto fue sometido a una reacción de desfosforilación enzimática, para disminuir las posibilidades de religación del mismo al ser tratado posteriormente con la ADN ligasa. Para la reacción de desfosforilación se agregó la enzima ADN fosfatasa alcalina (Promega) a una concentración de 0.01 unidades de enzima por pmol de extremos libres de ADN, que se incubaron durante 15 minutos a 37°C y 15 minutos a 56°C, repitiendo el protocolo dos veces, según instrucciones del fabricante. El plásmido sin inserto y desfosforilado fue nuevamente extraído, purificado y cuantificado como se describió en los ítems 2.1.1.3 y 2.1.1.4, y conservado a -20°C hasta su posterior uso.

### 2.1.2.5. Ligación de EgAgB8/1 en el plásmido pET-28b

Una vez que se obtuvo el ADN codificante para la subunidad EgAgB8/1 digerido (descrito en el ítem 2.1.2.3) y el plásmido pET-28b digerido y desfosforilado (descrito en el ítem 2.1.2.4), se procedió a la ligación de ambos. Para ello, se ensayaron las relaciones molares inserto:vector 3:1 y 1:1. Para determinar la cantidad de inserto a utilizar (ng), se empleó la siguiente ecuación:

Ecuación [1]

$$\text{ng de inserto} = \frac{\text{ng vector} \times \text{tamaño del inserto (kb)}}{\text{tamaño del vector (kb)}} \times \text{relación molar inserto:vector}$$

Para la reacción de ligación se emplearon 0.2 unidades de la enzima de ligación ADN ligasa T4 (Invitrogen, Life Technologies), 100 ng de plásmido pET-28b, 12 ng de inserto (en el caso de la relación 3:1) o 4 ng de inserto (en el caso de la relación 1:1), en la solución de ligación provista con la enzima. La mezcla de ligación se incubó durante toda la noche a 4°C y los productos de ligación fueron posteriormente utilizados para transformar bacterias competentes preparadas como se describió en el ítem 2.1.1.5. Se utilizaron bacterias de *E. coli* de la cepa XL-1 Blue que fueron transformadas siguiendo el protocolo de transformación de bacterias detallado en el ítem 2.1.1.6, empleando placas de LB-Agar conteniendo el antibiótico kanamicina a 30 µg/mL (Gibco, Life Technologies). De esta transformación, se obtuvo una única colonia en la placa correspondiente a la relación inserto:vector 1:1. De esta colonia se realizó un cultivo líquido y se extrajo el ADN plasmídico, como se describió en el ítem 2.1.1.1. Este plásmido fue analizado mediante digestión con las enzimas de restricción NdeI y BamHI (empleando el mismo protocolo descrito para el plásmido pET-28b en el ítem 2.1.2.4), mediante PCR con los *primers* específicos para la subunidad EgAgB8/1 (empleando el protocolo descrito en el ítem 2.1.2.2), y posteriormente verificado por secuenciación utilizando el servicio de la empresa Macrogen.

Finalmente, el plásmido pET-28b conteniendo el inserto de EgAgB8/1 fue empleado para transformar bacterias competentes *E. coli* de la cepa de expresión BL21 (DE3) (Novagen), preparadas de acuerdo al protocolo descrito en el ítem 2.1.1.5, empleando el protocolo de transformación de bacterias descrito en el ítem 2.1.1.6. La correcta transformación de las bacterias BL21 (DE3) se verificó mediante

PCR con los *primers* específicos para la subunidad EgAgB8/1, empleando como ADN molde el *pellet* obtenido de los cultivos líquidos de la bacterias, hervidos durante 5 minutos, y siguiendo el protocolo de PCR descrito en el ítem 2.1.2.2. Las bacterias transformadas fueron conservadas en medio LB conteniendo Glicerol 20% a -80°C hasta su posterior uso.

#### 2.1.2.6. Análisis de la expresión de EgAgB8/1 en las bacterias transformadas

Las bacterias transformadas obtenidas como se describió en el ítem 2.1.2.5 fueron analizadas para verificar la expresión de la proteína EgAgB8/1. Para estos ensayos se crecieron las bacterias transformadas con la construcción pET-28b-EgAgB8/1 en medio LB con kanamicina 30 µg/mL 37°C durante toda la noche. A continuación se efectuó una dilución del pre-inóculo (1/6) y se dejó a 37°C con agitación. Al llegar a la fase exponencial de crecimiento se indujo la expresión de la proteína recombinante por adición de IPTG 0.4 mM durante 2 horas. Los cultivos fueron centrifugados a 4500 rpm durante 12 minutos empleando el rotor y la centrifuga *Avanti J-E* descritos previamente, para obtener los *pellets* celulares. Para comparación, se utilizaron en paralelo controles de bacterias sin inducir. Los *pellets* obtenidos fueron resuspendidos en solución Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, KCl 100 mM y chequeados por SDS-PAGE al 15% (m/v), como se describió en el ítem 2.1.1.7. Asimismo, se ensayaron otras condiciones de temperatura (16, 30°C) y concentraciones de IPTG (0.1 y 1.0 mM), con la finalidad de mejorar la expresión de la proteína EgAgB8/1. Como no fue posible obtener buenos resultados en las condiciones ensayadas, se transformó la cepa de expresión BL21-(DE3)-pLysS (Novagen), ya que permite mejorar la expresión a partir de plásmidos que puedan resultar tóxicos para la bacteria (Pan & Malcolm, 2000). Para ello se utilizó el protocolo descrito para la transformación de bacterias (ítem 2.1.1.6) y las bacterias transformadas se evaluaron del mismo modo como fue descrito anteriormente para las de la cepa BL21 (DE3), empleando distintas temperaturas y concentraciones de IPTG. Debido a que no fue posible obtener buenos resultados en la expresión de la proteína EgAgB8/1 en ninguna de las condiciones ensayadas, no se prosiguió con el subclonado de las subunidades EgAgB8/2 y EgAgB8/3 en el plásmido pET-28b.

### 2.1.3. Análisis de la expresión y purificación de las subunidades de EgAgB a partir del plásmido pGEX-4T-1

Debido a que la expresión en el plásmido pET-28b no proporcionó buenos resultados en cuanto a la expresión de la subunidad EgAgB8/1, se decidió cambiar la estrategia experimental y expresar las subunidades en el sistema pGEX-4T-1 (ver Figura 7.1 en la sección Apéndices). En este sistema las proteínas se expresan como proteínas de fusión a la proteína Glutación S-Transferasa (GST). Este sistema ha permitido mejorar solubilidad de algunas proteínas recombinantes y permite la purificación mediante afinidad empleando glutatión (Harper & Speicher, 2011). Asimismo, la GST puede ser eliminada posteriormente mediante tratamiento con proteasas específicas. A continuación se describirán los materiales y métodos específicos para la purificación de las subunidades de EgAgB expresadas a partir de pGEX-4T-1.

#### 2.1.3.1. Análisis de la expresión de las subunidades de EgAgB

Como se comentó al inicio de la sección 2.1.2, los plásmidos conteniendo las subunidades clonadas de EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 fueron gentilmente donados por el Dr. Zaha. Las secuencias de las subunidades de EgAgB clonadas en estos plásmidos fueron verificadas por secuenciación, empleando el servicio de la empresa Macrogen (Corea). Una vez verificadas, se transformaron bacterias competentes, preparadas como se describió en el ítem 2.1.1.5 y transformadas siguiendo el protocolo descrito en el ítem 2.1.1.6. Se utilizaron las cepas de *E. coli* XL-1 Blue, para mantenimiento y amplificación del plásmido, y de la cepa BL21 (DE3), para la expresión de las proteínas de fusión. Se comenzó evaluando las condiciones óptimas para la expresión de las proteínas. Para ello se procedió como se describió en el ítem 2.1.2.6 para el análisis de la expresión de EgAgB8/1 a partir del plásmido pET-28b, con la diferencia de que en este caso los cultivos de las bacterias fueron incubados con medio LB conteniendo ampicilina 100 µg/mL, debido a la resistencia que presenta el plásmido pGEX-4T-1. Dado que la expresión de las proteínas en estas condiciones fue muy baja, se ensayaron distintas concentraciones de IPTG (0.1, 0.4 y 2.0 mM) y también se transformaron las cepas de expresión *E. coli* BL21 (Novagen) y BL21-CodonPlus-RIL (gentilmente donadas por el Dr. Zaha, UFRGS), para mejorar la expresión de las proteínas de fusión. Una vez analizadas estas variables, se determinó

que la cepa BL21-CodonPlus-RIL fue la más adecuada para la expresión de las proteínas de fusión y se procedió a la puesta a punto de la purificación de las mismas.

#### 2.1.3.2. Purificación de las subunidades de EgAgB

La optimización del protocolo de purificación de las subunidades de EgAgB fue llevada a cabo durante una estadía de un mes en el Laboratorio de Biología Molecular de Cestodos (Centro de Biotecnología, UFRGS, Porto Alegre, Brasil) bajo la supervisión de los Dres. Arnaldo Zaha, Henrique Ferreira y Karina Monteiro. La etapa fundamental de la purificación que se logró poner a punto durante esta estadía fue la obtención de cantidades adecuadas de proteína de fusión soluble, dado que en ensayos preliminares gran parte de la proteína precipitaba, dificultando su purificación. Para la purificación de las subunidades recombinantes EgAgB8/1, EgAgB8/2 o EgAgB8/3, se partió de un pre-inóculo de bacterias *E. coli* BL21 Codon Plus-RIL transformadas con las distintas construcciones de pGEX-4T-1 crecidas en 20 mL de medio 2TY (triptona 16 g/L, extracto de levadura 10 g/L y NaCl 5 g/L) adicionado con los antibióticos ampicilina 100 µg/mL, cloranfenicol 34 µg/mL y tetraciclina 12 µg/mL (Sigma-Aldrich Corporation) durante toda la noche a 37°C con agitación. Este pre-inóculo se diluyó 1/100 en matraces *Erlenmeyer* de 1L conteniendo 100 mL de medio 2TY con ampicilina 100 µg/mL cada uno y se dejaron creciendo a 37°C con agitación. Al llegar a la fase exponencial de crecimiento (absorbancia a 600 nm cercana a 1), se indujo la expresión de la proteína recombinante por adición de IPTG 0.1 mM durante 3 horas a 37°C con agitación fuerte (250 rpm). Fue fundamental para la correcta solubilidad de la proteína el uso de un volumen de medio de forma tal de no superar el 10% del volumen total del frasco y mantener el cultivo con agitación fuerte, para permitir una correcta oxigenación del mismo. A continuación los cultivos fueron centrifugados a 7000 rpm durante 10 minutos a 4°C en centrifuga *Avanti J-E* empleando el rotor de ángulo fijo *JLA-16.250* con sus correspondientes tubos, para obtener los *pellets* celulares. Estos *pellets* fueron resuspendidos en 50 mL de solución fosfato salino, conteniendo  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM, KCl 2.7 mM, NaCl 137 mM (PBS) por litro de cultivo original. Las bacterias fueron lisadas por ultrasonido empleando un sonicador de punta *S-450* (Branson) con una micropunta chata a un valor de potencia entre 3 y 4 y un ciclo constante durante 30 segundos, con intervalos de 1 minuto, manteniendo las muestras constantemente en hielo. Este paso fue repetido entre 6 y 7 veces, de acuerdo a la clarificación del *pellet*. Luego se agregó TritónX100 a una concentración 1% y se incubó durante 30 minutos a temperatura

ambiente con agitación, para mejorar la solubilidad de las proteínas. Los restos de pared celular y material insoluble fueron separados mediante centrifugación a 10000 rpm durante 30 minutos a 4°C, empleando la centrifuga *Avanti J-E* y el rotor de ángulo fijo *JA-25.50* con sus correspondientes tubos. A continuación se separó el sobrenadante y se aplicó en una columna de gravedad *Poly-Prep® Chromatography Columns* (Bio-Rad) previamente preparada conteniendo 2 mL de resina *Gluthathione Sepharose 4B* (GE Healthcare Life Sciences) equilibrada en solución PBS. Esta resina contiene glutatión, uniéndose entonces a la proteína de fusión a través de la GST, separándola del resto de las proteínas celulares. Para cada subunidad se empleó una columna de glutatión independiente. Una vez que se aplicó todo el sobrenadante, la columna fue lavada con dos volúmenes de PBS y posteriormente fue tratada con trombina purificada de plasma humano (Sigma-Aldrich Corporation), empleando 50 unidades de enzima diluidas en 1 mL de PBS por cada mL de resina a tratar. La resina en contacto con la trombina fue incubada durante toda la noche a temperatura ambiente, con la finalidad de separar la correspondiente subunidad de EgAgB de la GST mediante proteólisis específica. Luego de la elución las fracciones que correspondían a las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/2 o EgAgB8/3 se verificaron por SDS-PAGE, se colectaron y conservaron a 4°C hasta su tratamiento para remover los lípidos de *E. coli* que hubieran unido. Las columnas de glutatión fueron regeneradas eluyendo la GST con glutatión reducido (Sigma-Aldrich Corporation), para posteriormente emplearlas en otras purificaciones.

#### 2.1.4. Remoción lipídica de las subunidades de EgAgB mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa

La remoción de los lípidos unidos a las subunidades recombinantes EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 (purificadas como se describió en el ítem 2.1.3) se realizó empleando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC, por sus siglas en inglés), tomando como base la metodología descrita por Meenan (Meenan et al., 2011). Para ello se utilizó un equipo de HPLC *Detector UV-Vis L4200/Intelligent Pump L6200* (Merck-Hitachi). Como fase estacionaria se utilizó una columna analítica (250mm × 4.6mm) de sílica que contiene grupos octilo unidos, denominada C8 (Vydac, Grace). Como fase móvil se utilizó un gradiente empleando distintos porcentajes de Solución A, compuesta por 0.1% ácido trifluoroacético (TFA, Uvasol, Merck) en H<sub>2</sub>O bidestilada, y Solución B, compuesta por 0,1% TFA en

acetonitrilo (calidad HPLC, JT Baker). Ambas soluciones fueron filtradas empleando membranas de 0.22  $\mu\text{m}$  y degaseadas por ultrasonido en un sonicador de baño modelo 5210 (Branson) durante 30 minutos previo a su utilización. Se conectó la columna al equipo de HPLC y se equilibró con 2 volúmenes de columna empleando 90% de Solución A y 10% de Solución B. Se inyectó la muestra de proteína conteniendo TFA 0.1% y se le aplicaron los siguientes gradientes lineales: 10-30% Solución B en 5 minutos, 30-70% Solución B en 13 minutos, 70-100% Solución B en dos minutos y 100% de Solución B durante 5 minutos, utilizando en todos los casos un flujo de 1 mL/min. Se monitoreó la absorbancia a 280 nm y se recolectaron los picos correspondientes a las proteínas, que fueron verificados mediante SDS-PAGE, siguiendo el protocolo descrito en el ítem 2.1.1.7. Para las muestras conteniendo acetonitrilo se agregó solución de sacarosa saturada conjuntamente con la solución de siembra para darles mayor densidad. Las muestras correspondientes a las proteínas se liofilizaron durante toda la noche en un liofilizador *Sentry 5SL* (VirTis) para eliminar el acetonitrilo y posteriormente fueron reconstituidas en PBS. Para verificar la remoción de los lípidos se realizó una extracción lipídica de las muestras de partida (sin tratar) y luego del tratamiento por RP-HPLC, siguiendo el protocolo descrito en el ítem 2.1.1.9. La presencia de lípidos en los extractos obtenidos se analizó mediante TLC, tal como se describió en el ítem 2.1.1.10. Las proteínas deslipidizadas fueron cuantificadas como se detalló en el ítem 2.1.1.8, alicuotadas en fracciones de 50 a 500  $\mu\text{L}$  y conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso.

#### 2.1.5. Estudio estructural de las subunidades obtenidas por dicroísmo circular

El análisis estructural de las subunidades de EgAgB libres de lípidos obtenidas como se describió en los ítems 2.1.3 y 2.1.4, se realizó mediante CD, empleando un espectropolarímetro *Jasco J-810* (Jasco Corporation), en el Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (Universidad de Buenos Aires). Se tomaron los espectros en el UV lejano (195-250 nm) con una sensibilidad estándar, a una velocidad de 20 nm/min con un tiempo de respuesta de 1 segundo, en una cubeta rectangular de cuarzo de 1 mm de paso óptico (Starna). Se tomaron y promediaron tres espectros en total para cada subunidad por duplicado. Se empleó una concentración de 30  $\mu\text{M}$  en PBS para cada proteína, las medidas fueron realizadas a  $25^{\circ}\text{C}$ . La elipticidad molar  $[\theta]$  ( $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ ) fue calculada como se describió en Schmid (Schmid, 1997). Los espectros se graficaron empleando el programa *SigmaPlot*. El análisis de la estructura secundaria de las subunidades se llevó a cabo mediante la deconvolución de los

espectros empleando el programa k2d (<http://kal-el.ugr.es/k2d/k2d.html>). Estos datos fueron obtenidos y analizados en colaboración con la Dra. Gisela Franchini (INIBIOLP).

## **2.2. Análisis de la capacidad de oligomerización de las subunidades de EgAgB libres de lípidos**

En esta sección se describen los materiales y métodos empleados para llevar a cabo el segundo objetivo de este trabajo, es decir el análisis de la capacidad de las subunidades recombinantes de EgAgB de formar oligómeros. Para este objetivo se emplearon las técnicas de exclusión molecular y el entrecruzamiento las subunidades de EgAgB empleando carbodiimidas, tal como se describirá a continuación.

### **2.2.1. Estudios utilizando cromatografía de exclusión molecular**

Para analizar la capacidad de oligomerización de las subunidades de EgAgB libres de lípidos se realizaron ensayos utilizando cromatografía de exclusión molecular, de forma similar a lo descrito para las subunidades recombinantes sin deslipidizar (Monteiro et al., 2007). Para ello, se utilizó un equipo de cromatografía líquida de separación rápida de proteínas (FPLC por sus siglas en inglés) *Åkta Purifier FPLC System* (GE Healthcare Life Sciences). Brevemente, se inyectaron 100  $\mu\text{L}$  de EgAgB8/1 (214  $\mu\text{M}$ ), EgAgB8/2 (320  $\mu\text{M}$ ) o EgAgB8/3 (324  $\mu\text{M}$ ), en una columna *Superdex 200 HR 10/30* (GE Healthcare Life Sciences) equilibrada en PBS. Esta columna permite el fraccionamiento de proteínas en un rango de 10-600 kDa. La corrida se realizó a un flujo de 0.5 mL/min y los perfiles de elución se siguieron mediante absorbancia a 280 y 215 nm (dado que algunas de las subunidades presentan muy bajos valores de absorbancia a 280 nm). Para la calibración de la columna se inyectaron 150  $\mu\text{L}$  de una mezcla conteniendo citocromo c (12.4 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y seroalbúmina bovina (66 kDa) a 1 mg/mL cada una, por duplicado. Estas proteínas fueron adquiridas a Sigma-Aldrich Corporation. Los perfiles de elución se visualizaron en el programa *UNICORN 5.x* (GE Healthcare Life Sciences) provisto con el equipo y posteriormente se exportaron y graficaron empleando el programa *SigmaPlot*. La estimación de los pesos moleculares de las subunidades de EgAgB se realizó como fue descrito por Uversky (Uversky, 1993).

### 2.2.2. Experimentos de entrecruzamiento con carbodiimidias

Con el fin de verificar la oligomerización de las subunidades de EgAgB libres de lípidos se realizaron ensayos de entrecruzamiento empleando el agente de entrecruzamiento 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). Para estos ensayos se utilizó una solución 100 mM de EDC (Sigma-Aldrich Corporation) en H<sub>2</sub>O, preparada previo al momento de usar. Las mezclas de reacción se prepararon utilizando un volumen final de 100  $\mu$ L, empleando 30  $\mu$ M finales de cada subunidad en PBS y concentraciones finales de EDC, de 0.01, 0.1, 1, 5, 10 y 20 mM. Estas mezclas se incubaron a 25°C durante 30 minutos con agitación. Los controles sin agregado de EDC fueron llevados a cabo empleando el mismo tratamiento en forma paralela. Asimismo, con fines comparativos se realizaron ensayos en condiciones similares, empleando concentraciones 30  $\mu$ M de las subunidades sin deslipidizar, así como el EgAgB nativo purificado a partir de líquido hidático (ver purificación en el ítem 2.5.1.4), y concentraciones finales de 5, 10 y 20 mM de EDC. Otros controles de entrecruzamiento fueron llevados a cabo empleando la proteína de unión a lípidos ABA-1-A1 de *Ascaris suum* (generosamente donada por la Dra. Gisela Franchini, INIBIOLP) en presencia y ausencia de lípidos. Luego de los 25 min se agregó solución de siembra, las muestras se hirvieron durante 3-5 minutos y se analizaron mediante SDS-PAGE al 15% (m/v), tal como se describió en el ítem 2.1.1.7.

El revelado de las bandas proteicas en los geles de SDS-PAGE se realizó mediante tinción con nitrato de plata con el fin de mejorar la detección de las proteínas, siguiendo la técnica descrita por Blum (Blum et al., 1987). Para ello, los geles se dejaron en una solución de fijación que contiene metanol:H<sub>2</sub>O:ácido acético (25:19:6 v/v/v) adicionada con 50  $\mu$ L de formaldehído 40% (v/v) por cada 100 mL de solución durante toda la noche. Los geles se lavaron tres veces con etanol 50% durante 30 minutos y se incubaron durante 1 minuto con una solución de tiosulfato de sodio 0.02% (m/v). Luego de realizar tres lavados rápidos con H<sub>2</sub>O bidestilada, los geles se tiñeron durante 20 minutos con una solución de nitrato de plata 0.2% (m/v) a la que se le adicionó 75  $\mu$ L de formaldehído 40% (v/v) por cada 100 mL de solución. Posteriormente, se realizaron tres lavados rápidos con H<sub>2</sub>O bidestilada y se revelaron las bandas empleando una solución de carbonato de sodio 6%, adicionada con 2.5 mL de tiosulfato de sodio 0.02% (m/v) y 50  $\mu$ L de formaldehído 40% (v/v) por cada 100 mL de solución. Los geles se mantuvieron en esta solución hasta la aparición de las primeras bandas oscuras, momento al que se incubaron en la solución de fijación

durante 10 minutos para detener el revelado. Luego se conservaron en metanol 30% hasta la obtención de las imágenes correspondientes empleando el equipo *ImageQuant 350*, tal como se describió previamente.

### **2.3. Caracterización de las propiedades de unión de las subunidades de EgAgB a ligandos lipídicos**

En esta sección se describen los materiales y métodos empleados para llevar a cabo el tercer objetivo de este trabajo, es decir la caracterización de las propiedades de unión de las subunidades de EgAgB libres de lípidos. Para ello se emplearon técnicas basadas en el uso de la fluorescencia, utilizando la fluorescencia intrínseca de las proteínas, así como también empleando distintos análogos lipídicos fluorescentes. Los ensayos descritos a continuación fueron realizados en un espectrofluorómetro *Fluorolog-3* (Horiba-Yvon) y los datos fueron visualizados empleando el programa *FluorEssence™* provisto con el equipo. De forma alternativa también se utilizó el equipo *SIM AMINCO* (SLM Instruments) y los datos fueron visualizados con el programa *Olis GlobalWorks* provisto con el equipo.

#### **2.3.1. Análisis de la unión de lípidos a las subunidades de EgAgB empleando fluorescencia intrínseca**

El análisis de la capacidad de unión de las subunidades de EgAgB empleando fluorescencia intrínseca se realizó solamente con la subunidad EgAgB8/2, dado que esta subunidad es la única que posee un único triptófano (Trp16) que podría potencialmente ser sensible a la unión del ligando. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 295 nm a fin de excitar selectivamente dicho triptófano, y se registró el espectro de emisión entre 310 y 400 nm. Para estos ensayos se utilizó una cubeta de fluorescencia de cuarzo de paso óptico de 1 cm (Hellma) conteniendo 2 mL de solución amortiguadora Tris 40 mM, NaCl 100 mM, pH=7,4 (TBS) a 25°C. Se midió el espectro de emisión del TBS como blanco, y posteriormente se agregó EgAgB8/2 a una concentración final de 5  $\mu$ M. Se midió el espectro de emisión de la proteína sola y posteriormente se le agregaron concentraciones crecientes de ácido oleico en etanol, con un tiempo de incubación de 3 minutos antes de tomar nuevamente cada espectro. El agregado de ácido oleico se realizó de forma de no superar el 1% de concentración final de etanol en la cubeta ni el valor de la concentración micelar crítica (6  $\mu$ M según

Richieri et al., 1992). Alternativamente, se realizó el mismo ensayo empleando 2  $\mu\text{M}$  de EgAgB8/2 con agregados sucesivos de colesterol disuelto en DMSO, utilizando como control los mismos agregados de DMSO solo. Los datos de los espectros se graficaron utilizando el programa *SigmaPlot*. Dado que los espectros no mostraron cambios con los agregados de ácido oleico o colesterol, no fue posible determinar la constante de disociación de ninguno de estos ligandos empleando esta técnica.

### 2.3.2. Análisis de la unión de análogos fluorescentes de lípidos a las subunidades de EgAgB

Dado que el análisis mediante fluorescencia intrínseca no brindó buenos resultados, se realizaron ensayos empleando análogos fluorescentes de distintos lípidos, con el fin de caracterizar la unión a estos ligandos. Cuando estos análogos lipídicos se unen a una proteína que une lípidos, su espectro de emisión de fluorescencia se modifica debido al entorno hidrofóbico que le brinda la proteína, haciendo posible seguir esta unión (Lakowicz, 2007). Asimismo, empleando estas sondas es posible realizar ensayos de desplazamiento empleando lípidos naturales, tal como se describirá a continuación.

#### 2.3.2.1. Análisis de la unión de dehidroergosterol (DHE)

El análisis de la unión de dehidroergosterol (DHE) a las subunidades de EgAgB se realizó registrando los cambios en la emisión de fluorescencia de esta sonda tras el agregado de proteína, empleando un método basado en el análisis de la unión de DHE a otras LBPs (Falomir Lockhart, 2009). Para ello se utilizó una longitud de onda de excitación de 325 nm y se midió la emisión de fluorescencia tomando un espectro de emisión entre 350-515 nm. Se utilizó una cubeta de fluorescencia conteniendo 2 mL de TBS a 25°C, y primero se midió el espectro de emisión del TBS como blanco. Posteriormente se midió el espectro de emisión de la sonda fluorescente DHE (Sigma-Aldrich Corporation) a una concentración final de 0.5  $\mu\text{M}$  en TBS (a partir de un *stock* original de 680  $\mu\text{M}$ , cuya concentración se determinó mediante medida de la absorbancia a 325 nm, empleando el coeficiente de extinción molar del DHE en etanol ( $\epsilon=10550 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Luego se realizó el agregado de la subunidad de interés (EgAgB8/1, EgAgB8/2 o EgAgB8/3) con un tiempo de incubación de 3 minutos antes

de tomar nuevamente cada espectro. Los datos de los espectros se exportaron y graficaron empleando el programa *SigmaPlot*.

#### 2.3.2.2. Análisis de la unión de ácido 11-(dansilamino)undecanoico (DAUDA)

El análisis de la unión de ácido 11-(dansilamino)undecanoico (DAUDA) a las subunidades de EgAgB se realizó registrando los cambios en la emisión de fluorescencia de esta sonda tras el agregado de proteína, empleando un método basado en el análisis de la unión de DAUDA a otras LBPs (McDermott et al., 2001). Para ello se utilizó una longitud de onda de excitación de 345 nm y se midió la emisión de fluorescencia tomando un espectro de emisión entre 365-665 nm. Para estos ensayos se utilizó una cubeta de fluorescencia conteniendo 2 mL de TBS a 25°C, se midió el espectro de emisión del TBS como blanco y posteriormente se agregó la sonda fluorescente DAUDA (Molecular Probes, Life Technologies) a una concentración final de 0.5  $\mu\text{M}$  a partir de un *stock* original a 880  $\mu\text{M}$ . Se tomó el espectro de emisión de la sonda sola en TBS y luego se realizó el agregado de la subunidad de interés (EgAgB8/1, EgAgB8/2 o EgAgB8/3) con un tiempo de incubación de 3 minutos antes de tomar nuevamente cada espectro. Los datos de los espectros se exportaron y graficaron empleando el programa *SigmaPlot*.

#### 2.3.2.3. Análisis de la unión de antroiloxi-derivados de ácidos grasos (AOFA) y determinación de la constante de disociación ( $K_d$ ) de la interacción

El análisis de la unión de antroiloxi-derivados de ácidos grasos (AOFA) a las subunidades de EgAgB se realizó registrando los cambios en la emisión de fluorescencia de esta sonda tras el agregado de proteína, empleando un método basado en el análisis de la unión de AOFA a otras LBPs (Córscico et al., 2004; Falomir-Lockhart et al., 2006; Porfido et al., 2012). Como sonda se empleó el derivado fluorescente ácido 12-(9-antroiloxi)-esteárico (12-AS), utilizando una longitud de onda de excitación de 383 nm y registrando la emisión de fluorescencia entre 400-500 nm. Al igual que en los ensayos anteriormente descritos, primero se midieron los espectros de emisión 25°C de 2 mL del TBS (blanco) y de una solución 0.5  $\mu\text{M}$  de la sonda fluorescente 12-AS (Molecular Probes, Life Technologies). La concentración de 12-AS se determinó en base a la medida de la absorbancia a 361 nm, empleando el coeficiente de extinción molar del 12-AS en metanol ( $\epsilon=8000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Posteriormente se agregaron concentraciones crecientes de EgAgB8/1, EgAgB8/2 o EgAgB8/3 con un

tiempo de incubación de 3 minutos antes de tomar nuevamente cada espectro, hasta que los espectros no mostraron cambios importantes, es decir hasta llegar a saturación. Los datos de los espectros se exportaron y graficaron empleando el programa *SigmaPlot*. La curva para determinar la constante de disociación ( $K_d$ ) de la interacción se realizó graficando los valores de intensidad de fluorescencia a 440 nm versus la concentración de proteína. Los datos fueron corregidos por dilución considerando los cambios en el volumen final tras cada agregado de proteína. Se utilizó el mismo programa para obtener el mejor ajuste a los datos experimentales y calcular los correspondientes valores de  $K_d$ . Estos valores se expresaron como el promedio de tres medidas independientes  $\pm$  el desvío estándar (SD) para cada subunidad de EgAgB.

## **2.4. Análisis de la capacidad de las subunidades de EgAgB de transferir ácidos grasos hacia membranas fosfolipídicas**

En esta sección se describen los materiales y métodos empleados para llevar a cabo el cuarto objetivo de este trabajo, es decir analizar la capacidad de las subunidades de EgAgB de transferir ligandos hacia vesículas fosfolipídicas. Para ello se analizó la capacidad de las subunidades de EgAgB de transferir la sonda fluorescente 12-AS hacia membranas fosfolipídicas artificiales, empleando una técnica de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET por sus siglas en inglés). Para estos ensayos se utilizaron las subunidades EgAgB8/2 y EgAgB8/3 como representantes de los dos subgrupos de la familia del EgAgB más distantes en cuanto a sus secuencias proteicas.

### **2.4.1. Preparación de vesículas unilamelares pequeñas (SUVs)**

Las vesículas unilamelares pequeñas (SUVs) se prepararon mediante una técnica basada en protocolos descritos previamente (Huang & Thompson, 1974; Storch & Kleinfeld, 1986). Se prepararon SUVs de distinta composición, empleando los fosfolípidos naturales fosfatidilcolina de huevo (PC), fosfatidilserina de cerebro porcino (PS), y cardiolipina de corazón bovino (CL); y el derivado fluorescente 1-Oleoil-2-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]hexanoil]-sn-Glicero-3-Fosfatidilcolina (NBD-PC), todos ellos adquiridos de Avanti Polar Lipids. La composición de las vesículas estándar fue 90 % molar de PC y 10 % molar de NBD-PC (PC/NBD-PC),

mientras que para aumentar la carga neta negativa en la superficie de las SUVs se agregó 25 % molar de PS o CL, y se completó con 65 % molar de PC y 10 % molar de NBD-PC (PS/NBD-PC y CL/NBD-PC, respectivamente). Los fosfolípidos puros disueltos en cloroformo se mezclaron de acuerdo a la concentración final y al tipo de vesículas, el solvente se evaporó bajo corriente de  $N_2$  (g) y los lípidos se secaron completamente por liofilización en un equipo *Sentry 5SL* (VirTis). Posteriormente se hidrataron en TBS para formar las vesículas multilamelares. En el caso de aquellas vesículas que contienen CL se utilizó la solución TBS adicionada con EDTA 1 mM. La obtención de las SUVs se logró mediante aplicación de ultrasonido en un sonicador de punta *S-450* (Branson) empleando una micropunta cónica a una potencia de entre 3 y 4 y con un ciclo de trabajo de 70%. La mezcla de lípidos fue sonicada en estas condiciones durante 45 minutos a 4°C bajo corriente de  $N_2$  (g). Posteriormente las SUVs fueron separadas mediante ultracentrifugación a 50000 rpm durante 45 minutos en ultracentrífuga *Optima LE-80K* (Beckman Coulter) empleando el rotor *70.1Ti* con sus respectivos tubos. Las vesículas así obtenidas se transfirieron a viales color caramelo y se gasearon bajo corriente de  $N_2$  (g) para evitar la oxidación de los lípidos. La concentración final de fosfolípidos en las SUVs se determinó empleando un ensayo de cuantificación de fósforo inorgánico según la técnica descrita por Gomori, que determina la formación de un complejo fosfomolibdico que al reducirse brinda un compuesto coloreado estimable colorimétricamente (Gomori, 1942). Para ello las muestras (entre 5 y 15  $\mu$ L) y los distintos volúmenes de  $NaH_2PO_4$  1 mM utilizado como estándar (entre 0 y 40  $\mu$ L) se mezclaron con 30  $\mu$ L de  $Mg(NO_3)_2$  al 10 % (m/v) en 95% de etanol y se dejó carbonizando durante toda la noche a 140°C. Luego de la carbonización se agregaron 400  $\mu$ L de HCl 0.5 N, se agitó vigorosamente y los tubos fueron incubados durante 30 minutos en baño de agua hirviendo. A continuación se agregaron 930  $\mu$ L de una solución de ácido molibdico, preparada con 0.42% molibdato de amonio en 1 N  $H_2SO_4$ ; y ácido ascórbico 10% (m/v) en relación 6:1 (v/v). Las muestras fueron incubadas durante 1 hora a 37°C y finalmente se midió la absorbancia de cada tubo a 820 nm en un espectrofotómetro *T70 UV/VIS* (PG Instruments) en cubetas de vidrio de 1 cm de paso óptico (Hellma). La determinación de la concentración de fósforo en los fosfolípidos se realizó por comparación con la concentración de fósforo inorgánico empleando la curva estándar. En el caso de aquellas SUVs que contienen CL la concentración de fosfolípidos se corrigió de acuerdo a la presencia de dos grupos fosfato por molécula de CL. Las SUVs son inestables y pueden conservarse solamente por períodos cortos de tiempo. En este

trabajo se prepararon y conservaron a 4°C durante como máximo siete días antes de ser utilizadas.

#### 2.4.2. Determinación del coeficiente de partición de 12-AS entre las subunidades de EgAgB y SUVs

El coeficiente de partición ( $K_p$ ) de la sonda 12-AS entre las subunidades de EgAgB y las SUVs se determinó siguiendo un método descrito por Massey (Massey et al., 1997), basado en la existencia de FRET entre el 12-AS y el grupo NBD. Brevemente, en este ensayo se parte de un complejo proteína-AOFA y se agregan concentraciones crecientes de SUVs conteniendo NBD-PC. El grupo NBD actúa como aceptor de la fluorescencia del grupo antroilo, por lo que a medida que el AOFA se transfiere de la proteína a las SUVs, la fluorescencia del 12-AS disminuye, haciendo posible estimar el  $K_p$  de la sonda entre la proteína y las vesículas. En este caso, el  $K_p$  del 12-AS entre el EgAgB y las SUVs se definió de acuerdo a la siguiente ecuación:

Ecuación [2]

$$K_p = \frac{[12AS_{EgAgB}]}{[EgAgB]} \times \frac{[SUV]}{[12AS_{SUV}]}$$

Donde  $[12AS_{EgAgB}]$  y  $[12AS_{SUV}]$  son las concentraciones de 12-AS unido a EgAgB y a las SUVs, respectivamente; y  $[EgAgB]$  y  $[SUV]$  son las concentraciones de la proteína y de las vesículas. Para estos ensayos se utilizó una longitud de onda de excitación de 383 nm y se registró la emisión de fluorescencia del 12-AS tomando un espectro de emisión entre 400 y 500 nm. En una cubeta de fluorescencia conteniendo 2 mL de TBS a 25°C, se midió el espectro de emisión del TBS como blanco y luego se agregó la sonda fluorescente 12-AS (0.5  $\mu$ M). Posteriormente se agregó EgAgB8/2 o EgAgB8/3, manteniendo una relación proteína:ligando de 15:1. En estas condiciones al menos el 95% de la sonda se encuentra unido a la proteína de acuerdo al valor de  $K_d$  determinado en el ítem 2.3.2.3. A continuación se agregaron concentraciones crecientes de SUVs de PC/NBD-PC, preparadas como se describió en el ítem 2.4.1, con un tiempo de incubación de 3 minutos previo a medir nuevamente cada espectro. La intensidad de fluorescencia del 12-AS a 440 nm disminuyó tras los sucesivos agregados de SUVs conteniendo NBD-PC, debido al fenómeno de FRET explicado anteriormente. Se agregaron SUVs hasta llegar a saturación, es decir hasta lograr que

la fluorescencia del 12-AS caiga completamente y no presente variaciones tras los sucesivos agregados. El decaimiento de la fluorescencia del 12-AS se relacionó con el  $K_p$  de acuerdo a la siguiente ecuación:

Ecuación [3]

$$F_{rel} = \frac{a \times K_p}{K_p + \frac{[SUV]}{[EgAgB]}} - b \times \frac{[SUV]}{[EgAgB]}$$

Donde  $F_{rel}$  es la relación entre la fluorescencia inicial del complejo 12AS-EgAgB en ausencia de SUVs y la fluorescencia del complejo para cada relación SUV:EgAgB,  $[SUV]$  y  $[EgAgB]$  son las concentraciones molares de las SUVs y el EgAgB, respectivamente; y los valores “a” y “b” son los parámetros de ajuste de la ecuación, de acuerdo a De Gerónimo (De Gerónimo et al., 2010). Los datos de los espectros se exportaron y graficaron empleando *Microsoft Excel* (Microsoft Office) y el ajuste aplicando la ecuación 3 se realizó empleando el módulo *Solver* de dicho programa. Los valores de  $K_p$  se expresaron como el promedio de duplicados independientes  $\pm$  SD. El valor de  $K_p$  obtenido permitió establecer la relación de SUVs:EgAgB, de modo de asegurar la transferencia unidireccional del ligando desde la proteína hacia las vesículas en los ensayos de transferencia de ligandos descritos a continuación.

#### 2.4.3. Transferencia de 12-AS desde las subunidades de EgAgB hacia SUVs

Como se comentó al inicio de esta sección, la capacidad de las subunidades de EgAgB de transferir el análogo fluorescente 12-AS hacia SUVs se realizó mediante la técnica de FRET, siguiendo un protocolo descrito previamente para otras LBPs (Storch & Bass, 1990; McDermott et al., 2002; Falomir Lockhart et al., 2009; Porfido et al., 2012). Brevemente, la transferencia de 12-AS desde las proteínas hacia las SUVs se analizó utilizando un módulo de mezclado rápido que permite medir la caída de fluorescencia de 12-AS en el tiempo, inmediatamente después del agregado de las SUVs conteniendo NBD/PC. Para estos ensayos se utilizó un módulo de mezclado rápido o *stopped flow RX2000* (Applied Photophysics) adosado al espectrofluorómetro *Fluorolog-3*. En una de las jeringas del equipo se cargó el complejo 12AS-EgAgB, en una relación molar proteína:ligando de 15:1, incubados previamente durante 10 minutos para alcanzar el equilibrio. Esta relación proteína:ligando se utilizó para asegurar que al menos el 95% del ligando se encuentre unido a la proteína, tal como

se explicó en el ítem 2.4.2. En la otra jeringa se cargaron las SUVs de PC/NBD-PC preparadas como se describió en el ítem 2.4.1. La cantidad de SUVs empleada varió de acuerdo a las distintas relaciones molares SUVs:EgAgB empleadas (10:1, 20:1 y 40:1), que se eligieron según el valor obtenido de  $K_p$ , como se explicó en el ítem 2.4.2. Con la finalidad de aumentar la carga neta negativa en la superficie de las SUVs, de forma alternativa se utilizaron vesículas de PS/NBD-PC y CL/NBD-PC (ver ítem 2.4.1). Todas las diluciones fueron realizadas en TBS y los ensayos se llevaron a cabo a 25°C. Una vez cargadas ambas jeringas, se realizó la mezcla con el disparador del *stopped flow*, el cual permite iniciar la medida en el espectrofluorómetro en el momento exacto en el que se realiza la mezcla en la cubeta (tiempo 0). De este modo, se registraron las intensidades de fluorescencia a 440 nm con una longitud de onda de excitación de 383 nm durante 60 segundos. Como se explicó previamente, cuando el 12-AS es transferido a las SUVs conteniendo el fluoróforo NBD, la fluorescencia del 12-AS cae debido al fenómeno de FRET, por lo cual se registra una caída en la intensidad de fluorescencia del 12-AS en el tiempo. Esta caída de fluorescencia en el tiempo se describió mediante una curva de caída exponencial, de acuerdo a la siguiente ecuación:

Ecuación [4]

$$F(t) = a \times e^{(-kt)} + c$$

Dónde “a” y “c” son los parámetros de ajuste y k se interpreta como el valor de la velocidad de transferencia ( $s^{-1}$ ). El control de decaimiento de la sonda en el tiempo (control de fotoblanqueo o *photobleaching*) se realizó empleando el mismo protocolo pero sin agregado de SUVs en la segunda jeringa (empleando solo TBS). El ajuste de los datos experimentales aplicando la ecuación 4 se llevó a cabo empleando el programa *SigmaPlot*. Cada valor puntual de velocidad de transferencia se obtuvo realizando 5 réplicas de las curvas de caída exponencial para cada condición SUV:EgAgB. A su vez, los valores de velocidad de transferencia reportados corresponden al valor promedio de tres determinaciones independientes  $\pm$  SD. El análisis estadístico de las velocidades de transferencia obtenidas se realizó mediante el análisis de varianzas (ANOVA), seguido del test de Tukey para comparar los valores obtenidos en todas las condiciones, empleando el programa *Graphpad Prism*.

## **2.5. Análisis de la capacidad del EgAgB nativo de unirse a monocitos y macrófagos: contribución de los componentes proteicos y lipídicos**

En esta sección se describen los materiales y métodos empleados para llevar a cabo el quinto y último objetivo de este trabajo, es decir analizar la capacidad de las subunidades de EgAgB libres de lípidos de interaccionar con monocitos y macrófagos, así como la participación de los lípidos del EgAgB nativo en esta interacción. Para ello se utilizó una técnica basada en citometría de flujo, empleando un equipo *FACSCallibur* (BD Biosciences), visualizando los datos en el programa *CELLQuest* provisto con el equipo y analizando los datos empleando el programa *FlowJo*. Estos experimentos fueron realizados en la Cátedra de Inmunología (Instituto de Higiene, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay) bajo la supervisión de la Dra. Ana María Ferreira (co-directora de este trabajo) y en colaboración con la Lic. Maite Folle, estudiante de Maestría en el área Ciencias Biológicas de la Dra. Ferreira.

### **2.5.1. Preparación de suspensiones de monocitos y macrófagos**

#### **2.5.1.1. Mantenimiento de la línea celular de pre-monocitos humanos THP-1**

Las células de la línea celular de pre-monocitos humanos THP-1 (ATCC, American Type Culture Collection) crecen en suspensión y son cultivadas a 37°C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> utilizando medio RPMI 1640 suplementado con L-glutamina 2 mM, bicarbonato de sodio 1.5 g/L, Hepes 10 mM, ácido pirúvico 1.0 mM, antibiótico compuesto (penicilina, streptomina, anfotericina) y 10 % de suero fetal bovino fetal (SFB, GIBCO), según el protocolo descrito por ATCC. Todos los componentes del medio de cultivo descritos, con excepción del SFB, fueron obtenidos de Sigma Aldrich Corporation. El medio fue preparado en material estéril con agua libre de pirógenos (Herix) y esterilizado mediante filtración en cabina de flujo laminar vertical. Los cultivos siempre fueron manipulados en cabina de flujo laminar vertical y fueron mantenidos a una concentración entre 0.3-0.5 x 10<sup>6</sup> células/mL y subcultivados cada 48 horas en medio fresco para evitar que la concentración de las células supere el valor de 1 x 10<sup>6</sup> células/mL. Todo el material plástico de cultivo empleado para el mantenimiento de las células fue adquirido a Nunclon, Thermo Fisher Scientific o Greiner Bio One.

### 2.5.1.2. Diferenciación de monocitos THP-1 a macrófagos

Para la diferenciación de los monocitos THP-1 a macrófagos las células se dispensaron en placas de cultivo de 48 pozos (Greiner Bio One) a una concentración de  $0.75 \times 10^6$  células/pozo y fueron cultivadas 72 horas a 37°C en 5% CO<sub>2</sub> con medio completo suplementado con 75 ng/mL de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, Sigma-Aldrich Corporation). En estas condiciones las células se adhieren a la placa, creciendo en forma de monocapa, y no sufren más divisiones, por lo que la cantidad de células por pozo se mantiene constante. Transcurridas las 72 horas los macrófagos fueron empleados para los ensayos de citometría descritos más adelante. Para ello, los macrófagos se despegaron agregando a cada pozo 500 µL de PBS conteniendo EDTA 1 mM a 4°C. Esta solución fue diez veces aspirada y dispensada con una pipeta P1000 en cada pozo para despegar las células, tratando de producir el menor daño posible a las mismas. Este proceso fue repetido por lo menos dos veces y el despegado de los macrófagos se confirmó observando la placa al microscopio óptico. Los macrófagos obtenidos fueron mantenidos en frío y utilizados inmediatamente en los ensayos de interacción con las subunidades de EgAgB que se describirán más adelante.

### 2.5.1.3. Obtención de células inflamatorias de ratón mediante lavados peritoneales

La obtención de células inflamatorias de ratón se llevó a cabo a través de un método de lavado peritoneal. Para ello se utilizaron ratones adultos de la cepa C57BL/6 que fueron mantenidos en el bioterio del Instituto de Higiene (Universidad de la República, Uruguay) y manipulados por el personal habilitado de dicho bioterio. Para la obtención de los macrófagos los ratones fueron inyectados intraperitonealmente con 100 µL de adyuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich Corporation), con el fin de lograr un mayor reclutamiento de células inflamatorias en la cavidad peritoneal. Luego de 48 horas, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, de acuerdo con el protocolo acreditado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA, Universidad de la República, Uruguay) y se realizó el lavado peritoneal empleando 15 mL de PBS conteniendo EDTA 2 mM y SFB 2%. Este procedimiento fue realizado en su totalidad por la Dra. Ferreira, quien posee las acreditaciones de la CHEA para la manipulación de los animales. Las células obtenidas se controlaron por citometría de flujo, y se mantuvieron en frío hasta ser utilizadas inmediatamente en los ensayos de interacción con las subunidades de EgAgB descritos más adelante.

## 2.5.2. Preparación del EgAgB nativo y otros ligandos lipídicos de interés

### 2.5.2.1. Purificación de EgAgB nativo a partir de líquido hidático

El EgAgB nativo fue purificado a partir de líquido hidático extraído mediante punción aséptica de quistes hidáticos fértiles y no fértiles obtenidos de frigoríficos locales. El líquido hidático así obtenido fue conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso, con el agregado de EDTA 5 mM y 2,6 di-tert-butil-4-metilfenol 20  $\mu\text{M}$  (BHT, Sigma-Aldrich Corporation) para evitar la oxidación de los lípidos. Para purificar el EgAgB se partió de 2 L de líquido hidático proveniente de distintos quistes que fueron clarificados mediante centrifugación a 7800 rpm durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  en centrifuga *Sorvall RC 6 Plus* (Thermo Fisher Scientific), empleando el rotor *F10-6x500y* con sus correspondientes frascos. A continuación el líquido hidático se fraccionó mediante cromatografía de intercambio iónico en un equipo *FPLC System* (Pharmacia Biotech) con el fin de obtener una fracción enriquecida en las proteínas parasitarias y eliminar la seroalbúmina bovina y las inmunoglobulinas del hospedador presentes en el líquido hidático. Para ello, se empleó la resina aniónica *Q-Sepharose* (GE Healthcare Life Sciences) empaquetada en una columna de 40 mL de lecho y equilibrada en una solución amortiguadora fosfato 20 mM, NaCl 0.2 M, EDTA 5 mM, BHT 20  $\mu\text{M}$ , pH 7.2. El líquido hidático se aplicó en esta columna a un flujo de 1 mL/min durante toda la noche y posteriormente la columna fue lavada con dos volúmenes de la solución amortiguadora de equilibrio. La fracción retenida se eluyó de la columna aumentando la fuerza iónica de la solución amortiguadora utilizando fosfato 20 mM, NaCl 0.45 M, EDTA 5 mM, BHT 20  $\mu\text{M}$ , pH 7.2 a un flujo de 1 mL/min, siguiendo la absorbancia a 280 nm. A esta fracción la llamaremos fracción Q-S+, y como se comentó anteriormente contiene principalmente a las proteínas parasitarias, entre ellas al EgAgB. La fracción Q-S+ se concentró en un equipo *SpeedVac Concentrator* (Savant, Thermo Fisher Scientific) y se le intercambié la solución amortiguadora por PBS, EDTA 5 mM, BHT 20  $\mu\text{M}$  empleando una columna de desalado PD10 (Amersham Biosciences). Para obtener el EgAgB de la fracción Q-S+ se preparó un gradiente de densidad empleando KBr aplicando una metodología basada en la obtención de lipoproteínas plasmáticas (Bejta et al., 2007). Para ello, se agregó KBr a una concentración de 0.49 g/mL a 5 mL de la fracción Q-S+, y se transfirió a un tubo de ultracentrífuga adecuado de 25 mL. En la parte superior del tubo se agregó una solución NaCl 0.15 M, KBr 0.05 g/mL, de forma cuidadosa para evitar que se mezcle con la solución inferior. Estas muestras se ultracentrifugaron a una velocidad de 55000

rpm durante 4 horas a 4°C en una ultracentrífuga *L7-65* (Beckman Coulter), empleando el rotor *70Ti*. Una vez transcurrido este tiempo, la fracción de EgAgB apareció como una banda de color amarillo (debido a la presencia de lípidos en el EgAgB), posicionada en el tubo de acuerdo a su densidad, mientras que el resto de las proteínas precipitaron. Se aspiró esta banda, se transfirió a un tubo de vidrio y el KBr se eliminó utilizando una columna de desalado PD10 equilibrada en la solución amortiguadora PBS, EDTA 5 mM, BHT 20 µM empleando una columna de desalado PD10. La fracción de EgAgB purificada fue gaseada bajo corriente de N<sub>2</sub> (g) para evitar la oxidación de los lípidos y conservada a 4°C hasta su posterior uso. La determinación de la concentración de EgAgB obtenida se llevó a cabo como se describió en el ítem 2.1.1.8 empleando el coeficiente de extinción molar determinado por González (González et al., 1996)

#### 2.5.2.2. Tratamiento de EgAgB nativo con fosfolipasa D

El EgAgB nativo obtenido como se describió en el ítem 2.5.2.1 fue tratado con fosfolipasa D (PLD), enzima que hidroliza la fosfatidilcolina, con el fin de modificar la fosfatidilcolina presente en el EgAgB y evaluar su participación en la unión del EgAgB a las células. Para ello, las muestras de EgAgB fueron incubadas con PLD (Calbiochem) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se utilizaron 10 unidades de PLD por mg de EgAgB en una solución amortiguadora Tris-HCl 30 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, NaCl 100 mM, pH 8.0 y se incubó durante 24 horas a 37°C. Posteriormente, la PLD fue removida ultracentrifugando las muestras como se describió en el ítem 2.5.1.4. Para ello se utilizó 1 mL de EgAgB tratado con PLD (EgAgB-PLD), al que se le agregó KBr 0.49 g/mL y una solución superior de NaCl 0.15 M, KBr 0.05 g/mL, en tubos de ultracentrífuga de 5 mL. Las muestras se ultracentrifugaron a 55000 rpm durante 4 horas a 4°C, empleando la ultracentrífuga *Sorvall MX120* (Thermo Fisher Scientific) y el rotor oscilante *S52-ST*. Como control se utilizó una muestra de EgAgB a la que se le aplicó el mismo tratamiento que a las muestras EgAgB-PLD, pero sin agregado de PLD (EgAgB control). Finalmente, la eficiencia del tratamiento con PLD se analizó realizando la extracción de lípidos del EgAgB control y del EgAgB-PLD, tal como se describió en el ítem 2.1.1.9 y analizando las fracciones lipídicas obtenidas mediante TLC, siguiendo la metodología descrita en el ítem 2.1.1.10.

### 2.5.2.3. Marcación de subunidades de EgAgB y EgAgB nativo con biotina

Para marcar las subunidades de EgAgB y el EgAgB nativo purificados como se describió en los ítems 2.1.3.2 y 2.5.2.1 respectivamente, se utilizó N-Hidroxisuccinimida-Biotina (NHS-Biotina) adquirida de Pierce, Thermo Fisher Scientific, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó una concentración de proteína de 1 mg/mL en una solución amortiguadora  $\text{NaHCO}_3$  0.1 M, pH 9.0 a la que se le agregó NHS-Biotina (1 mg/mL en DMSO) en cantidad equimolar de acuerdo a la cantidad de moles de lisina que se marcaron (aproximadamente 6 moles de lisina). Las muestras se incubaron durante 4 horas a temperatura ambiente con agitación y en oscuridad. A continuación se intercambió la solución amortiguadora a PBS mediante diálisis durante toda la noche. Para utilizar como control también se marcó la proteína ovoalbúmina (OVA, Sigma-Aldrich Corporation), empleando las mismas condiciones que para el EgAgB nativo o las subunidades de EgAgB.

El marcado con NHS-Biotina se evaluó en un ensayo empleando placas de ELISA de 96 pozos (Nunclon, Thermo Fisher Scientific), en las que se adsorbieron diluciones seriadas de las proteínas marcadas, partiendo de una concentración 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  empleando 100  $\mu\text{L}/\text{pozo}$  y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, la placa fue bloqueada con solución PBS, Tween 0.05%, SFB 0.05% durante 1 hora a temperatura ambiente e incubada con estreptavidina conjugada a peroxidasa (Sigma-Aldrich Corporation) empleando 100  $\mu\text{L}/\text{pozo}$  de una dilución 1/20000 durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda. El revelado se llevó a cabo utilizando una solución conteniendo el reactivo 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB, Fluka) a una concentración 0.1 mg/mL adicionado con  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.03% en una solución amortiguadora fosfato/citrato, pH 5.0. La reacción se detuvo luego de 15-30 minutos con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 N y se midió la absorbancia a 450 nm corrigiendo a 560 nm en lector para placas de 96 pozos *Labsystems Multiskan* (Thermo Fisher Scientific).

### 2.5.2.4. Purificación de lipoproteínas plasmáticas: HDL y LDL

Las lipoproteínas plasmáticas HDL y LDL fueron purificadas a partir de plasma humano de donantes voluntarios sanos empleando un método de ultracentrifugación basado en el descrito por Bejta (Bejta et al., 2007). El plasma fue obtenido a partir de muestras de sangre fresca, adicionada con EDTA 10 mM como anticoagulante, incubada a 4°C durante 1 hora y centrifugada a 2000 rpm durante 8 minutos en una centrifuga *Sigma 3.18K* (Sigma), empleando el rotor *N°11133*. A continuación se

realizó un gradiente de densidad, tal como se describió en el ítem 2.5.2.1 para la obtención de EgAgB. Brevemente, a 5 mL de plasma se le agregó KBr a una concentración final de 0.49 g/mL y se utilizó NaCl 0.15 M, KBr 0.05 g/mL para completar el volumen a 25 mL. Las muestras se ultracentrifugaron a una velocidad de 55000 rpm durante 4 horas a 4°C, tal como se describió previamente. Luego de la ultracentrifugación, la banda correspondiente a la LDL (banda superior de color naranja) y la banda correspondiente a la HDL (banda inferior de color amarillo) fueron aspiradas cuidadosamente y transferidas a tubos de vidrio. Para la purificación de la HDL se realizó una segunda ultracentrifugación, para lo cual a la fracción obtenida inicialmente se le agregó KBr hasta saturación, se completó el tubo con la solución de NaCl 0.15 M, KBr 0.05 g/mL y se ultracentrifugó a 55000 rpm durante 4 horas a 4°C. El KBr de las fracciones de LDL y HDL purificadas se eliminó mediante diálisis en solución amortiguadora PBS, EDTA 5 mM, BHT 20 µM durante 24 horas. Las fracciones de LDL y HDL así obtenidas, fueron transferidas a tubos de vidrio color caramelo, gaseadas bajo corriente de N<sub>2</sub> (g) para evitar la oxidación de los lípidos y conservadas a 4°C hasta su posterior uso.

#### 2.5.2.5. Preparación de vesículas unilamelares grandes (LUVs)

Para la preparación de las vesículas unilamelares grandes (LUVs) se utilizaron los fosfolípidos naturales PC y PS preparando dos tipos de vesículas distintas: 100 % de PC y PC/PS (50:50 molar). Para la obtención de las vesículas, los fosfolípidos puros disueltos en cloroformo se mezclaron de acuerdo a la concentración final, se secaron completamente bajo corriente de N<sub>2</sub> (g) y se hidrataron en TBS para formar las vesículas multilamelares. A continuación, esta suspensión fue extruida empleando un filtro de policarbonato 0,1 µm en un equipo *Avanti Mini-Extruder* (Avanti Polar Lipids), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las LUVs obtenidas fueron conservadas a 4°C en frascos color caramelo y gaseadas bajo corriente de N<sub>2</sub> (g) para evitar la oxidación de los lípidos, hasta su posterior uso.

#### 2.5.3. Análisis de la interacción de las subunidades de EgAgB con monocitos y macrófagos

El análisis de la interacción de las subunidades de EgAgB libres de lípidos con monocitos y macrófagos y su comparación con la interacción del EgAgB nativo se

realizó mediante citometría de flujo, empleando un anticuerpo monoclonal contra la subunidad EgAgB8/1 y marcando las subunidades de EgAgB libres de lípidos con biotina, como se describirá a continuación.

#### 2.5.3.1. Análisis de la interacción de EgAgB nativo y EgAgB8/1 con monocitos y macrófagos THP-1 empleando un anticuerpo monoclonal anti-EgAgB8/1

Para estos ensayos se utilizaron monocitos o macrófagos THP-1 preparados como se describió en los ítems 2.5.1.1 y 2.5.1.2, respectivamente; siguiendo un protocolo basado en trabajos anteriores (Ramos, 2008), con algunas modificaciones. En el caso de los monocitos las células se contaron directamente a partir de los frascos de cultivo originales empleando una cámara de Neubauer y se distribuyeron en una placa de 96 pozos de fondo cónico, utilizando  $0.5 \times 10^6$  células en un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  por pozo. En el caso de los macrófagos se partió de  $0.75 \times 10^6$  células originalmente diferenciadas y recogidas como se detalló en el ítem 2.5.1.2, que fueron transferidas a una placa en las mismas condiciones que los monocitos. Esta diferencia en el número de células se debe a que aproximadamente la tercera parte de los macrófagos THP-1 se pierden debido al proceso de despegado de los mismos de la placa donde se diferencian inicialmente (ver ítem 2.5.1.2). La placa fue centrifugada a 1000 rpm a 4°C en una centrifuga *Sigma 3. 18K* empleando el rotor de placas *N° 11222* para decantar las células y posteriormente se agregó a cada pozo EgAgB nativo (1, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) o EgAgB8/1 (10, 20, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en PBS conteniendo SFB 1% y  $\text{NaN}_3$  0.1% (PBS/SFB/ $\text{NaN}_3$ ) durante 1 hora a 4°C. El agregado de azida de sodio y la incubación a 4°C se realizó para evitar la internalización de las proteínas, estas condiciones fueron mantenidas durante todo el procedimiento. Luego de esta incubación las células se lavaron dos veces con 150  $\mu\text{L}$  de PBS/SFB/ $\text{NaN}_3$ , centrifugando la placa para decantar las células luego de cada lavado como se detalló previamente y se incubaron con 100  $\mu\text{L}$  de una solución 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de un anticuerpo monoclonal anti-EgAgB8/1 (Mo-EB7), generosamente donado por el Dr. Gualberto González (Cátedra de Inmunología, Universidad de la República), obtenido como se describió en González et al., 1996. Las células fueron incubadas con el anticuerpo Mo-EB7 durante 45 minutos a 4°C, lavadas como se detalló anteriormente y posteriormente incubadas con un anticuerpo anti-IgG/IgM de ratón conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC, BD Biosciences), en una dilución 1/50 durante 45 minutos a 4°C. Para estos ensayos se realizaron varios controles de unión inespecífica. En una primera instancia se utilizaron algunos pozos a los que se les agregó únicamente PBS/SFB/ $\text{NaN}_3$  en lugar de EgAgB.

Estos pozos fueron posteriormente incubados con el anticuerpo Mo-EB7 y anti-IgG/IgM-FITC en las condiciones descritas previamente. Otros pozos fueron tratados con EgAgB o EgAgB8/1 a la mayor concentración y posteriormente fueron incubados únicamente con anti-IgG/IgM-FITC o alternativamente fueron incubados con un anticuerpo IgG1 kappa de ratón (BD Biosciences), como isotipo control para el anticuerpo Mo-EB7 y luego con el anti-IgG/IgM-FITC, empleando las condiciones descritas previamente. Finalmente, las células fueron lavadas dos veces, resuspendidas en 500  $\mu$ L de PBS y analizadas mediante citometría de flujo. Los valores de voltaje de los distintos detectores del citómetro fueron ajustados para cada tipo celular (monocitos o macrófagos) y se mantuvieron constantes en todos los experimentos. Se definió el área correspondiente a las células vivas en el gráfico dispersión lateral (SSC) versus dispersión frontal (FSC) y se contaron entre 5000 y 10000 células vivas por experimento. Todas las condiciones analizadas por experimento individual fueron realizadas por duplicado. La unión del EgAgB a las células se expresó como el índice de unión de cada muestra, calculado como el cociente entre la intensidad de fluorescencia de cada muestra y la intensidad de fluorescencia del control con PBS (sin EgAgB). El índice de unión se expresó como el valor promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  el error estándar (SEM). Las diferencias significativas del índice de unión obtenido para cada muestra de EgAgB en relación al índice de unión del control con PBS se analizaron empleando el test t tomando como valor hipotético 1, empleando el programa *Graphpad Prism*. Asimismo, el análisis estadístico de todos los datos se realizó mediante ANOVA, seguido del test de Tukey, empleando el mismo programa.

#### 2.5.3.2. Análisis de la interacción de las subunidades de EgAgB marcadas con biotina a monocitos y macrófagos THP-1

Para analizar la capacidad de las otras subunidades de unirse a los monocitos y macrófagos se emplearon las subunidades marcadas con biotina, obtenidas como se describió en el ítem 2.5.2.3. Para estos ensayos se emplearon monocitos y macrófagos THP-1 distribuidos en placas de 96 pozos de fondo cónico, en un volumen final de 100  $\mu$ L por pozo, tal como se detalló en el ítem 2.5.3.1. Las células fueron tratadas con las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 marcadas con biotina (50 y 100  $\mu$ g/mL) durante 1 hora a 4°C en PBS/SFB/NaN<sub>3</sub>. Posteriormente fueron lavadas dos veces como se detalló en el ítem 2.5.3.1 e incubadas con estreptavidina conjugada a FITC (BD Biosciences) en una dilución 1/800, durante 45 minutos a 4°C.

Se realizaron varios controles de unión; por un lado algunos pozos no se incubaron con las subunidades y se mantuvieron con PBS/SFB/NaN<sub>3</sub> hasta el agregado de estreptavidina-FITC, como control de la unión directa del conjugado. Para controlar el pegado de la estreptavidina-FITC a las células ocasionado por la incubación de una proteína marcada con biotina en similar concentración, que pudiera resultar de la unión inespecífica de cualquier proteína marcada con biotina, los monocitos se incubaron en paralelo con OVA marcada a biotina. Alternativamente, los macrófagos fueron incubados con IgG de conejo conjugada a biotina comercial (BD Biosciences), dado que ésta no debería presentar unión a las células humanas. Finalmente, las células fueron lavadas dos veces, resuspendidas en 500 µL de PBS y analizadas mediante citometría de flujo usando las condiciones descritas en el ítem 2.5.3.1. La unión de las subunidades de EgAgB a las células se expresó como el índice de unión de cada muestra, calculado como se detalló en el ítem 2.5.3.1. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante ANOVA, seguido del test de Dunnett para la comparación con el control (OVA o IgG marcadas), empleando el programa *GraphPad Prism*.

#### 2.5.3.3. Análisis de la interacción de las subunidades de EgAgB y EgAgB nativo marcados con biotina a macrófagos primarios de ratón

Para estos ensayos se emplearon macrófagos primarios de ratón, obtenidos como se describió en el ítem 2.5.1.3. En este caso, se utilizaron  $1.0 \times 10^6$  células/pozo, dado que aproximadamente la mitad corresponden a otras células inflamatorias que no son macrófagos. Las células fueron tratadas con EgAgB8/2, EgAgB8/3 o EgAgB nativo marcados con biotina (20, 50 y 100 µg/mL) en PBS/SFB/NaN<sub>3</sub> durante 1 hora a 4°C. Posteriormente las células fueron lavadas dos veces como se detalló en el ítem 2.5.3.1 e incubadas con estreptavidina-FITC (1/800) durante 45 minutos a 4°C. Conjuntamente las células fueron incubadas con un anticuerpo anti-F4/80 de ratón conjugado a ficoeritrina (anti-F4/80-FE, Isotipo IgG2a kappa, eBioscience) en una dilución 1/80. El F4/80 es una proteína de membrana característica de los macrófagos de ratón (Gordon et al., 2011), por lo que este anticuerpo se utilizó para marcarlos específicamente dentro de la población de células inflamatorias obtenidas en el lavado peritoneal. Como control de unión inespecífica se utilizaron algunos pozos tratados únicamente con PBS/SFB/NaN<sub>3</sub> y otros tratados con OVA marcada con biotina. Como la emisión de fluorescencia del FITC y FE no se resuelve bien en los canales de detección del citómetro (es decir que la emisión del FITC se detecta en el canal de detección de la FE), resultó necesario realizar controles adicionales de las medidas

para la corrección de estas interferencias. Para ello se prepararon células marcadas con cada uno de los conjugados fluorescentes por separado; se preparó una mezcla de todas células tratadas con las distintas muestras y se marcaron únicamente con estreptavidina-FITC (marcado simple para FITC) o con anti-F4/80-FE (marcado simple para FE). Estos marcados simples permiten determinar la emisión del FITC que contamina el canal de la FE y viceversa, empleando un muestreo de todas las células. Empleando el programa *FlowJo*, es posible introducir correcciones en la lectura para eliminar estas interferencias, lo que se conoce como compensación. Además, se preparó un control del marcado con el anticuerpo anti-F4/80-FE, empleando un anticuerpo del mismo isotipo y especie que el anticuerpo anti-F4/80 (IgG2a kappa) conjugado a FE (Biolegend). Finalmente las células se lavaron dos veces, se resuspendieron en 500  $\mu$ L de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo. Los valores del voltaje de los distintos detectores del citómetro fueron ajustados para estas células y se mantuvieron constantes en todos los experimentos. El análisis de la unión de las proteínas marcadas con biotina se realizó sobre los macrófagos, definidos como F4/80 positivos; y sobre los linfocitos, definidos de acuerdo a sus valores SSC y FSC. La unión de las subunidades de EgAgB a las células se expresó como el índice de unión de cada muestra, calculado como se detalló en el ítem 2.5.3.1. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante ANOVA, seguido del test de Dunnett para la comparación con el control (OVA marcada con biotina), empleando el programa *GraphPad Prism*.

#### 2.5.4. Análisis de la contribución de la fosfatidilcolina presente en el EgAgB nativo en la interacción con monocitos y macrófagos THP-1

Con el fin de profundizar en la caracterización del EgAgB a los monocitos y macrófagos se evaluó la participación de los lípidos presentes en la partícula nativa en la interacción. Dado que en la mayoría de las partículas lipoproteicas descritas los fosfolípidos se encuentran en la parte superficial de las moléculas debido a su comportamiento anfipático, es posible suponer que la fosfatidilcolina (fosfolípido más abundante en el EgAgB nativo) sea el lípido más expuesto y por lo tanto pueda participar de la interacción. Para evaluar esta posibilidad se utilizó EgAgB nativo tratado con fosfolipasa D (EgAgB-PLD) con la finalidad de analizar su capacidad de unión y compararla con la del EgAgB nativo. Asimismo, también se realizaron ensayos de competencia empleando vesículas fosfolipídicas artificiales de distinta composición.

Para los ensayos descritos a continuación se empleó tanto el anticuerpo Mo-EB7, así como también el EgAgB marcado con biotina.

#### 2.5.4.1. Análisis y comparación de la capacidad de unión de EgAgB nativo y tratado con fosfolipasa D a monocitos y macrófagos THP-1.

Para estos ensayos se emplearon monocitos y macrófagos THP-1 distribuidos en placas de 96 pozos de fondo cónico, en un volumen final de 100  $\mu$ L por pozo, tal como se detalló en el ítem 2.5.3.1. Estas células fueron incubadas con EgAgB control o con EgAgB-PLD, obtenidos como se describió en el ítem 2.5.2.2, a una concentración 10  $\mu$ g/mL en PBS/SFB/ $\text{NaN}_3$  durante 1 hora a 4°C. Posteriormente las células se lavaron, y la unión del EgAgB control o del EgAgB-PLD se reveló empleando el anticuerpo Mo-EB7, seguido del conjugado anti-IgG/IgM-FITC, siguiendo el protocolo descrito en el ítem 2.5.3.1. Al finalizar el revelado, las células se resuspendieron en 500  $\mu$ L de PBS y analizaron mediante citometría de flujo. La unión del EgAgB control o del EgAgB-PLD se expresó como porcentaje de unión tomando con 100% el valor del índice de unión obtenido para el EgAgB nativo a una concentración 10  $\mu$ g/mL (calculado como se indicó en el ítem 2.5.3.1). El porcentaje de unión del EgAgB control o del EgAgB-PLD se expresó como el valor promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  SEM. Las diferencias estadísticas entre los porcentajes de unión obtenidos para el EgAgB control y para el EgAgB-PLD se analizaron mediante ANOVA, seguido del test de Dunnett para la comparación de la unión del EgAgB Ctrl y el EgAgB-PLD con la del EgAgB nativo, empleando el programa *GraphPad Prism*.

#### 2.5.4.2. Ensayos de competencia empleando vesículas de fosfatidilcolina y fosfatidilcolina/fosfatidilserina

Para estos ensayos se utilizaron las LUVs de fosfatidilcolina (PC) y fosfatidilcolina/fosfatidilserina (PC/PS) preparadas como se describió en el ítem 2.5.2.5. En los ensayos se emplearon monocitos distribuidos en placas de 96 pozos de fondo cónico, en un volumen final de 100  $\mu$ L por pozo, tal como se detalló en el ítem 2.5.3.1. Las células fueron pre-incubadas con las LUVs de PC o de PC/PS a una concentración 500  $\mu$ g/mL en PBS/SFB/ $\text{NaN}_3$  durante 30 minutos a 4°C. A continuación se lavaron una vez como se describió en el ítem 2.5.3.1 y se incubaron con el EgAgB nativo marcado con biotina, obtenido como se describió en el ítem 2.5.2.3, a una concentración de 100  $\mu$ g/mL en PBS/SFB/ $\text{NaN}_3$  durante 1 hora a 4°C. El revelado de

la unión se realizó empleando estreptavidina-FITC, siguiendo el protocolo descrito en el ítem 2.5.3.3. Al finalizar el revelado, las células se resuspendieron en 500  $\mu$ L de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo. La unión del EgAgB a las células pre-incubadas con LUVs de PC o PC/PS se expresó como el índice de unión de cada muestra, calculado como se describió en el ítem 2.5.3.1. Las diferencias estadísticas entre los índices de unión a las células incubadas con LUVs de PC o de PC/PS se analizaron mediante ANOVA, seguido del test de Dunnett para la comparación con la unión del EgAgB nativo en ausencia de LUVs (pre-incubadas con PBS/SFB/ $\text{NaN}_3$ ), empleando el programa *GraphPad Prism*.

#### 2.5.5. Ensayos de competencia empleando lipoproteínas plasmáticas

Con el fin de evaluar si es posible que el EgAgB nativo comparta receptores celulares con otras lipoproteínas plasmáticas, se realizaron ensayos de competencia entre el EgAgB nativo y las lipoproteínas plasmáticas LDL y HDL. Para estos ensayos se utilizaron LDL y HDL preparadas como se describió en el ítem 2.5.2.4. En los ensayos se emplearon monocitos distribuidos en placas de 96 pozos de fondo cónico, en un volumen final de 100  $\mu$ L por pozo, tal como se detalló en el ítem 2.5.3.1. Las células fueron pre-incubadas con LDL o HDL a una concentración 500  $\mu$ g/mL en PBS/SFB/ $\text{NaN}_3$  durante 30 minutos a 4°C. A continuación se lavaron una vez como se describió en el ítem 2.5.3.1 y se incubaron con el EgAgB nativo marcado con biotina, obtenido como se describió en el ítem 2.5.2.3, a una concentración de 100  $\mu$ g/mL en PBS/SFB/ $\text{NaN}_3$  durante 1 hora a 4°C. El revelado de la unión se realizó empleando estreptavidina-FITC, siguiendo el protocolo descrito en el ítem 2.5.3.3. Al finalizar el revelado, las células se resuspendieron en 500  $\mu$ L de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo. La unión del EgAgB a las células pre-incubadas con las lipoproteínas se expresó como el índice de unión de cada muestra, calculado como se describió en el ítem 2.5.3.1. Las diferencias estadísticas entre los índices de unión a las células pre-incubadas con HDL o LDL se analizaron mediante ANOVA, seguido del test de Dunnett para la comparación con la unión del EgAgB nativo en ausencia de lipoproteínas, empleando el programa *GraphPad Prism*.

## **RESULTADOS**

En este capítulo se describen los resultados obtenidos en el transcurso de este trabajo, divididos en varias secciones, ordenados según el objetivo específico originalmente planteado.

### **3.1. Obtención de las subunidades recombinantes de EgAgB libres de lípidos**

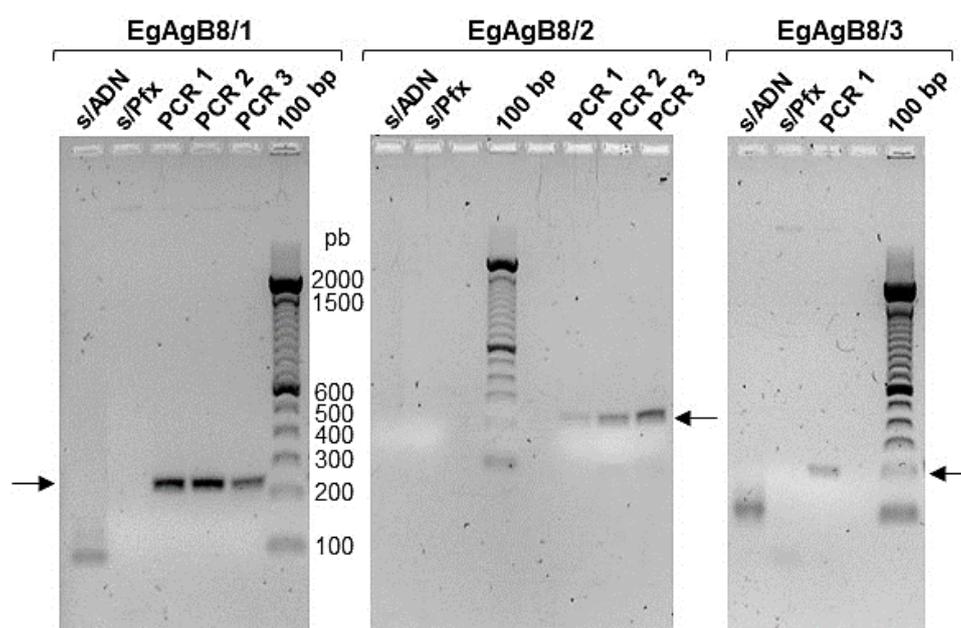
Las subunidades recombinantes de EgAgB han resultado una herramienta de gran utilidad a la hora de analizar aspectos relacionados a la estructura y la función del EgAgB (Monteiro et al., 2008). Sin embargo, cuando se pretende analizar sus propiedades bioquímicas y biológicas, debe considerarse que es probable que estas subunidades recombinantes se encuentren asociadas a lípidos de la bacteria, ya que se trata de proteínas con capacidad de formar partículas lipoproteicas conteniendo una gran variedad de lípidos (Obal et al., 2012). Es por esto que para analizar apropiadamente la capacidad de oligomerizar y de unir ligandos lipídicos de las subunidades de EgAgB, resulta de suma importancia contar con un método eficaz para extraerles los lípidos. Así el ajuste de un procedimiento para deslipidizar las subunidades recombinantes del EgAgB constituyó el primer objetivo de esta tesis. Para ello se trabajó con las subunidades recombinantes EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3. A continuación se describen los resultados obtenidos en relación a la preparación de estas subunidades y su deslipidización.

#### **3.1.1. Subclonado de las subunidades de EgAgB en el plásmido pET-28b**

Con la finalidad de obtener las subunidades de EgAgB haciendo uso de las herramientas disponibles en el laboratorio y de contar con un método de purificación sencillo, se decidió subclonar las subunidades de EgAgB en el plásmido pET-28b. La elección de este plásmido se debió a que permite la purificación de las proteínas recombinantes empleando una columna de afinidad con metales quelados, ya que codifica para una secuencia de seis histidinas en la región N-terminal de la proteína clonada. Como paso inicial para lograr esto se diseñaron *primers* específicos para amplificar los segmentos de ADN que codifican para las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 mediante PCR (ver ítem 2.1.2.1), usando como ADN molde los plásmidos pGEX4-T-1 conteniendo estas secuencias, verificados por secuenciación

(ver Figura 7.3 en la sección Apéndices). A estos *primers* se les añadieron las secuencias de corte de las enzimas de restricción NdeI y BamHI, para subclonar las secuencias de EgAgB empleando estas enzimas en el sitio de clonado múltiple del plásmido pET28-b (ver Figura 7.2 en la sección Apéndices).

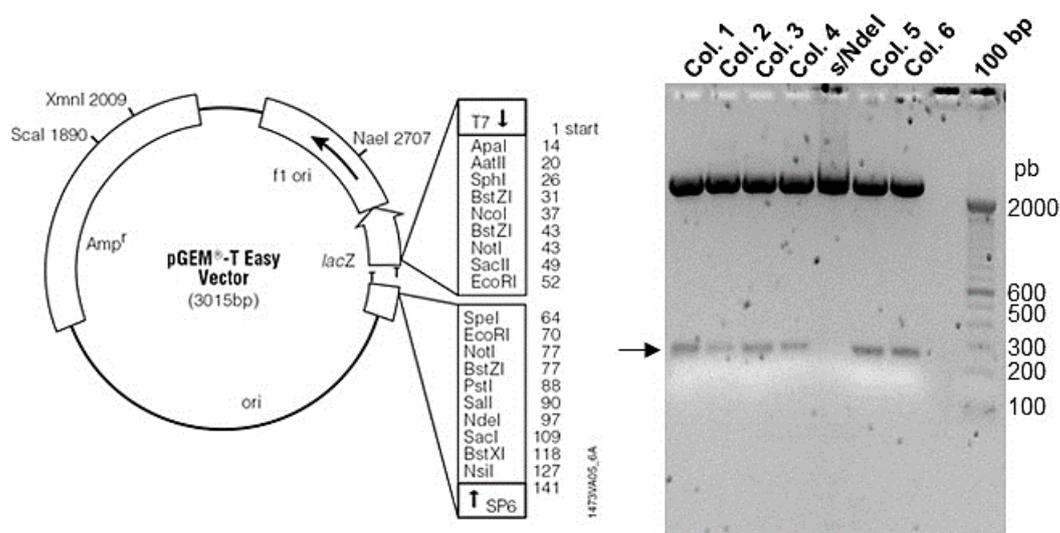
Con estos *primers* se pusieron a punto las condiciones de temperatura y concentración de MgSO<sub>4</sub> para cada PCR. En la Figura 3.1 se muestran los fragmentos obtenidos para las PCRs de los genes correspondientes a EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 empleando las condiciones de PCR descritas en el ítem 2.1.2.2. Como puede observarse en la figura, en cada caso se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 200 pares de bases (pb), lo cual concuerda con el tamaño de las secuencias de ADN que codifican para el péptido maduro de las distintas subunidades de EgAgB (Fernández et al., 1996; Rott et al., 2000; Chemale et al., 2001), ingresadas en el banco de datos de genes *GenBank* con los número de acceso AF143813 (EgAgB8/1), U15001 (EgAgB8/2) y AF361934 (EgAgB8/3).



**Figura 3.1. Obtención de los fragmentos de ADN codificantes para las subunidades de EgAgB mediante PCR con *primers* específicos.** Los fragmentos de PCR obtenidos para las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 fueron analizados en geles de agarosa al 1.5% (m/v) teñidos con SYBR-Safe y observados mediante luz ultravioleta (UV). En los carriles se indican las muestras analizadas; los controles sin agregado de ADN molde (s/ADN), sin agregado de enzima Pfx Polimerasa (s/Pfx) y a las distintas PCRs llevadas a cabo en cada caso. Se utilizó un marcador para fragmentos pequeños de ADN (100 bp), se indican los tamaños de las bandas de mayor importancia. Se marca con las flechas la posición de los fragmentos de PCR obtenidos.

Debido a que la PCR para el gen que codifica para EgAgB8/1 fue la que dio mejores resultados, inicialmente se decidió proseguir con este gen para subclonar en el plásmido

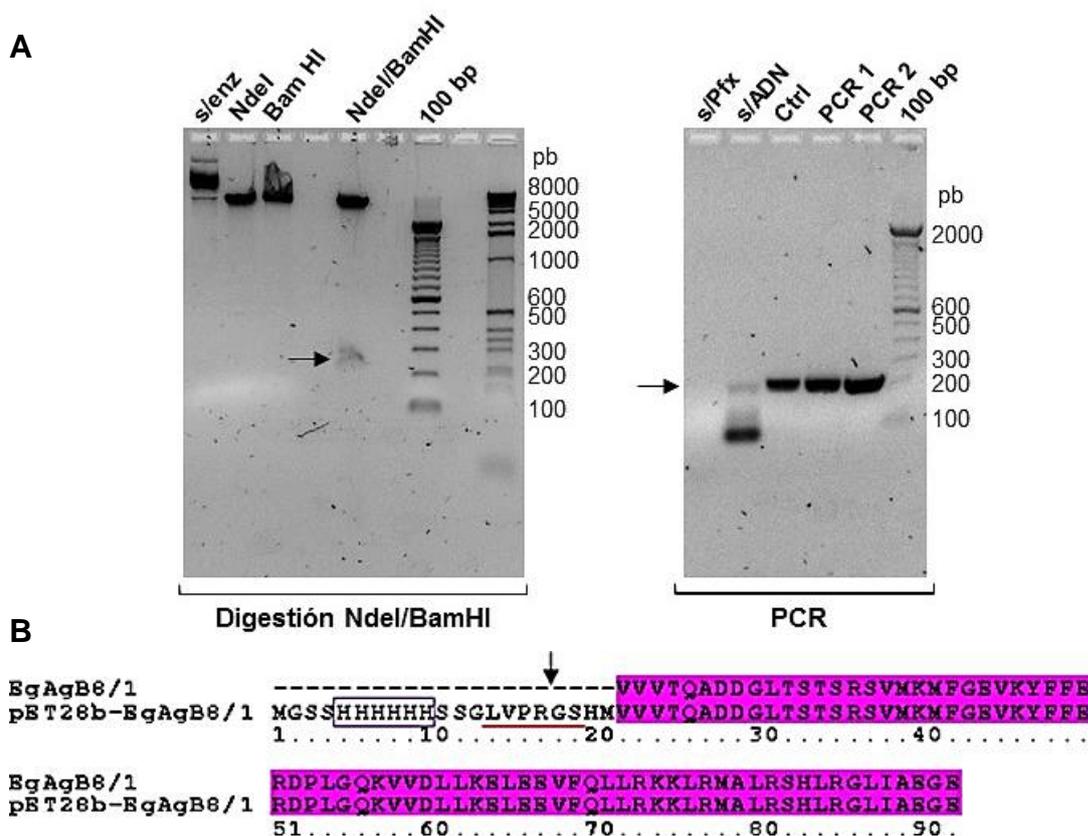
pET-28b. Para ello, se realizó un paso intermedio de subclonado en el plásmido pGEMT-Easy, con el fin lograr un corte más eficiente del producto de PCR con las enzimas NdeI y BamHI. Luego de este procedimiento se obtuvieron varias colonias de color blanco, tal como se describió en el ítem 2.1.2.3. Dado que el clonado en el plásmido pGEMT-Easy no es direccional, ya que se realiza mediante el apareamiento A-T, y que este plásmido posee en su secuencia un sitio NdeI (ver Figura 3.2), se realizó una digestión únicamente con esta enzima para verificar la orientación del fragmento clonado. Al ser digerido solo con NdeI, si el inserto fue clonado en una de las orientaciones liberaría un fragmento de un tamaño aproximado de aproximadamente 250 pb (correspondientes al inserto de EgAgB/1 más 30 pb hasta el sitio de corte de NdeI en el plásmido), mientras que si fue clonado en la otra orientación, solo se liberaría un fragmento de unos 30 pb, correspondiente a la porción que quedaría ubicada entre los dos sitios de NdeI. En la Figura 3.2 se observa que todas las colonias verificadas liberaron un inserto con un tamaño de aproximadamente 250 pb.



**Figura 3.2. Chequeo de colonias transformadas con la construcción pGEMT-EgAgB8/1.** Los plásmidos aislados y purificados de los cultivos bacterianos fueron digeridos con la enzima NdeI, analizados en gels de agarosa al 1.0% (m/v) teñidos con SYBR-Safe y observados mediante UV. Se indican los carriles sembrados con el control sin enzima (s/NdeI) y con las distintas colonias analizadas (Col.1 a Col.6). Se utilizó un marcador para fragmentos pequeños de ADN (100 bp), se indican los tamaños de las bandas de mayor importancia. Se marca con la flecha la posición de las bandas correspondientes al inserto de EgAgB8/1 liberado. A la izquierda se muestra el mapa representativo del plásmido pGEMT-Easy (tomado del manual de Promega).

Para asegurar el correcto corte del fragmento, se realizó una digestión secuencial primeramente con la enzima BamHI para linealizar el plásmido, y una vez linealizado, se purificó y posteriormente se trató con la enzima NdeI para finalmente liberar el inserto correspondiente a EgAgB8/1. El inserto digerido con estas enzimas fue luego ligado en

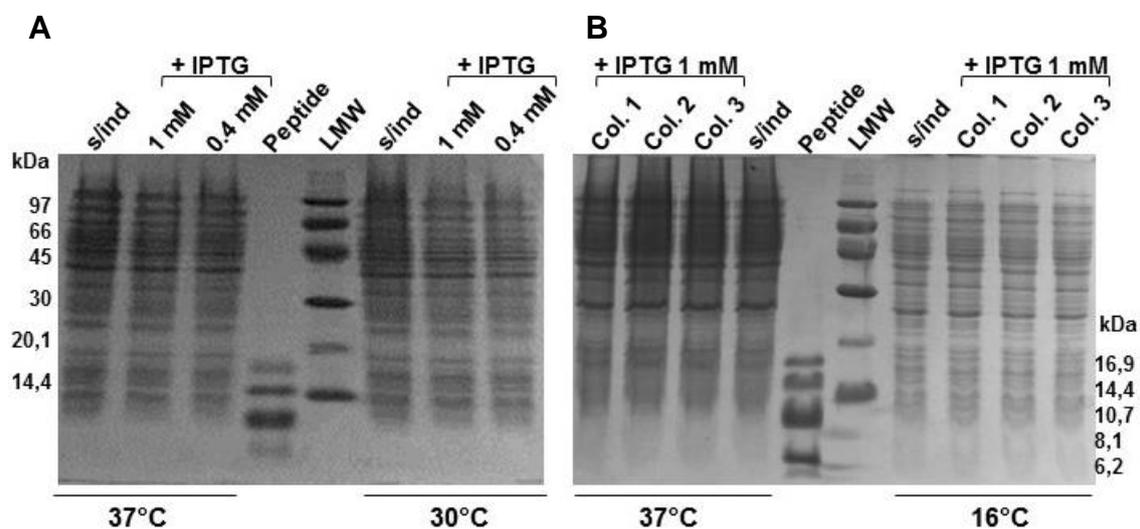
el plásmido pET-28b digerido como se describió en el ítem 2.1.2.5. Con esta ligación se transformaron bacterias de *E. coli* de la cepa XL-1 Blue, y se obtuvo una única colonia, de la cual se aisló el ADN plasmídico y se verificó mediante digestión enzimática, PCR y secuenciación nucleotídica, como se observa en la Figura 3.3.



**Figura 3.3. Chequeo de la colonia obtenida luego de transformación con la construcción pET28b-EgAgB8/1.** El plásmido aislado y purificado a partir de la colonia obtenida luego de la transformación con la ligación pET28b-EgAgB8/1 fue analizado mediante digestión con las enzimas de clonado, PCR y secuenciación. **(A)** Las digestiones del plásmido con NdeI/BamHI y las PCR con los *primers* específicos para EgAgB8/1 se analizaron en geles de agarosa al 1.5% (m/v) teñidos con SYBR-Safe y observados mediante UV. En el caso del análisis de la digestión con NdeI/BamHI en los carriles del gel se sembraron el plásmido sin enzima (s/enz), el plásmido tratado únicamente con una de las enzimas (NdeI o BamHI) o doble digerido (NdeI/BamHI). En el análisis por PCR, las muestras sembradas en los carriles fueron el control sin Pfx Polimerasa (s/Pfx), el control sin ADN molde (s/ADN), el control positivo empleando el plásmido pGEX-4T-1 (Ctrl) y los productos de las distintas PCRs llevadas a cabo. Se utilizaron marcadores de ADN (100bp y 1kb), se indican los tamaños de las bandas de mayor importancia. Las flechas indican la posición de los fragmentos correspondientes a EgAgB8/1. **(B)** Se muestra el alineamiento de la secuencia proteica obtenida mediante la traducción *in silico* de la secuencia de ADN de la construcción pET28b-EgAgB8/1 verificada mediante secuenciación nucleotídica (ver Figura 7.4 en la sección Apéndices). La línea pET28b-EgAgB8/1 corresponde al secuenciado del plásmido purificado a partir de la colonia obtenida luego de la transformación con la ligación pET28b-EgAgB8/1, mientras que la línea EgAgB8/1 corresponde al secuenciado del plásmido original pGEX-4T-1, ambas concordantes con la secuencia proteica del EgAgB8/1 reportada en el GenBank (N° AAD38373). La traducción *in silico* se realizó empleando el programa Biology Workbench y la alineación de las secuencias se realizó mediante la herramienta ClustalW de dicho programa. Se marca en fondo violeta la secuencia de la proteína EgAgB8/1 expresada en la bacteria, en el recuadro se indican las seis histidinas aportadas por el plásmido pET28b, así como la región de reconocimiento (en rojo) y corte proteolítico de la trombina (flecha).

Los controles mostraron que el clonado del fragmento correspondiente a EgAgB8/1 en el plásmido pET28-b fue correcto. En el panel A de la Figura 3.3 se observa que cuando el plásmido fue doble digerido con las enzimas NdeI y BamHI, apareció una banda entre 200 y 300 pb, indicando que se liberó un inserto del tamaño esperado. Asimismo, se observa que los *primers* específicos para la subunidad EgAgB8/1 amplificaron un fragmento del mismo tamaño que el fragmento obtenido empleando como ADN molde el plásmido pGEX-4T-1-EgAgB8/1 (control positivo). Asimismo, en el panel B de la Figura 3.3 se observa que la traducción *in silico* a partir de la secuencia de ADN del plásmido pET28b-EgAgB8/1 aislado de la colonia transformante obtenida mediante secuenciación, dio como resultado una secuencia idéntica a la de la subunidad EgAgB8/1 con el correspondiente agregado del segmento de seis histidinas, seguido de la secuencia de reconocimiento de la trombina presentes en el plásmido pET28-b. La secuencia nucleotídica del plásmido pET28b-EgAgB8/1 verificada mediante secuenciación se muestra en la Figura 7.4 de la sección Apéndices.

Una vez verificado que el fragmento de EgAgB8/1 fue correctamente clonado en el plásmido pET28b se transformaron distintas bacterias de expresión y se analizó la expresión de la proteína EgAgB8/1, tal como se detalló en el ítem 2.1.2.6. Además de distintas cepas de expresión, se ensayaron distintas temperaturas (16, 30 y 37°C) y concentraciones de IPTG (0.4 y 1.0 mM), como se resume en la Figura 3.4.

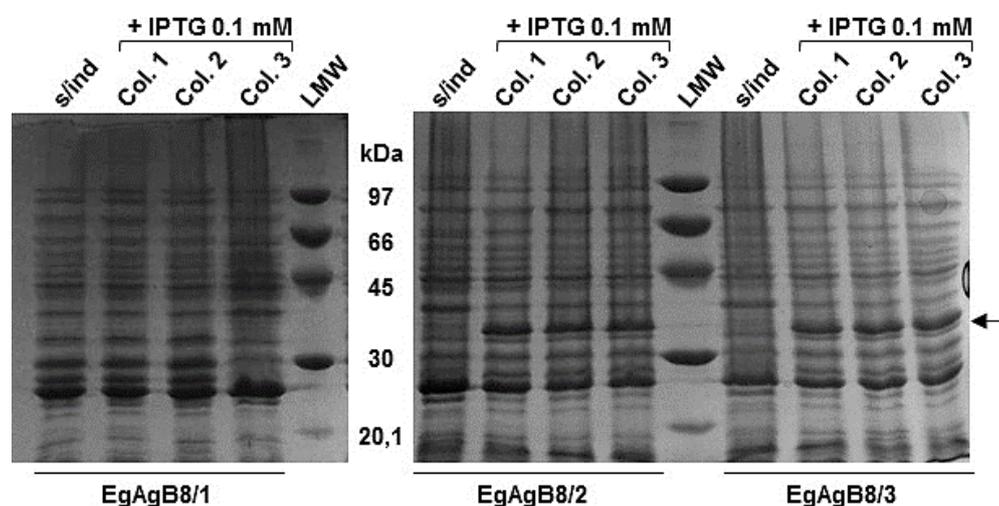


**Figura 3.4. Análisis de la expresión de EgAgB8/1 en las bacterias transformadas.** La expresión de la proteína EgAgB8/1 en las cepas de expresión transformadas con la construcción pET-28b-EgAgB8/1 fue analizada mediante SDS-PAGE. **(A)** Los lisados de una colonia de *E. coli* de la cepa BL21-(DE3) sin inducir (s/ind) y bajo inducción con IPTG (0.4 y 1 mM) a 37°C y 30°C fueron analizados mediante SDS-PAGE 15% (m/v) y teñidos con azul de *Coomassie*. **(B)** Los lisados de distintas colonias de *E. coli* de la cepa BL21-(DE3)-pLysS sin inducir (s/ind) y bajo inducción con IPTG 1 mM a 37°C y 16°C (Col. 1 a 3) fueron analizados mediante SDS-PAGE 20% (m/v) y teñidos con azul de *Coomassie*. En ambos casos se emplearon marcadores de peso molecular (*Peptide* y *LMW*) cuyos pesos moleculares se indican en la figura.

En todos los casos ensayados la correcta transformación de las distintas bacterias de expresión fue confirmada realizando PCR con los *primers* específicos para EgAgB8/1 empleando directamente el lisado de las bacterias como ADN molde (técnica de *Colony PCR*). El análisis de la expresión se realizó únicamente en aquellas colonias que fueron correctamente transformadas con el plásmido pET28b-EgAgB8/1. En el panel A de la Figura 3.4 se observa que en la cepa de expresión BL21-(DE3) no fue posible observar inducción de la expresión de EgAgB8/1 (~ 8 kDa), dado que no se observaron diferencias entre el perfil de proteínas del lisado de las bacterias no inducidas y el de las bacterias inducidas, ya sea empleando 0.4 o 1.0 mM de IPTG y una temperatura de 30 o 37°C. Debido en este sistema de expresión también se recomienda el uso de la cepa de *E. coli* BL21-(DE3)-pLysS para aumentar la estabilidad de los plásmidos y así mejorar la expresión de las proteínas recombinantes (Pan & Malcolm, 2000), se realizaron ensayos empleando esta cepa a distintas temperaturas. Como se observa en el panel B de la Figura 3.4, tampoco fue posible observar inducción de ninguna proteína de 8 kDa en los lisados de bacterias inducidas con IPTG (1.0 mM), tanto a 37°C como a 16°C. Esto indicaría que la subunidad EgAgB8/1 no se expresa correctamente, que lo hace en cantidades muy pequeñas que no se detectan por este método, o bien que resulta tóxica para la bacteria y por lo tanto es degradada. Se consultó a varios investigadores con experiencia en la expresión de las subunidades recombinantes de EgAgB y se encontró que otros grupos también habían tenido inconvenientes a la hora de expresar distintas subunidades de EgAgB en el sistema pET. Particularmente, en el grupo de la Dra. Mara Rosenzvit (Departamento de Microbiología, Universidad de Buenos Aires) se clonaron las subunidades EgAgB8/2 y EgAgB8/4 en el plásmido pET22, un plásmido similar al plásmido pET28, en el que la proteína también se codifica con una secuencia de seis histidinas para facilitar su purificación. Empleando este sistema los investigadores obtuvieron un rendimiento muy bajo de las subunidades EgAgB8/2 y EgAgB8/4, tan solo 50 µg por litro de cultivo bacteriano (Kamenetzky, 2007). Debido a este motivo y a las dificultades encontradas a la hora de expresar la proteína EgAgB8/1, se decidió no continuar con el subclonado de las subunidades EgAgB8/2 y EgAgB8/3 en el plásmido pET28b, y emplear el sistema pGEX en el que las mismas estaban originalmente clonadas, como se detallará en el siguiente ítem. En el sistema pGEX las proteínas se expresan como proteínas de fusión a Glutación S-Transferasa (GST), lo cual puede mejorar los problemas de toxicidad y/o solubilidad para proteínas hidrofóbicas (Harper & Speicher, 2011), como podría ser el caso de las subunidades recombinantes de EgAgB.

### 3.1.2. Análisis de la expresión y purificación de las subunidades de EgAgB a partir del plásmido pGEX-4T-1

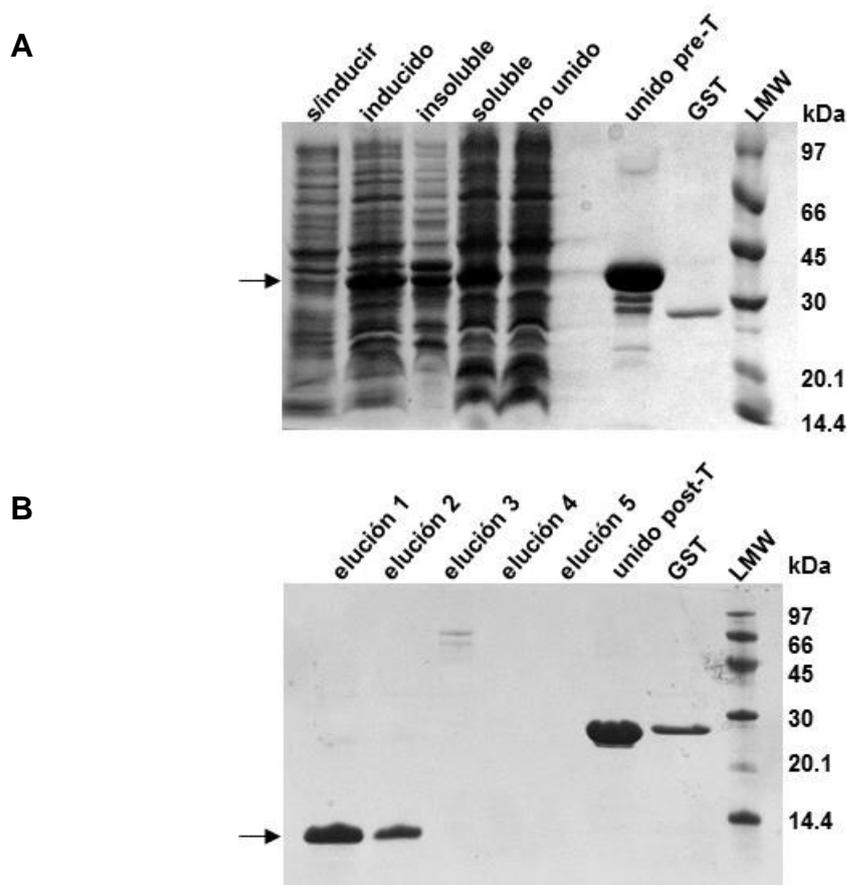
Como se comentó en el ítem anterior, el clonado en el sistema pET no mostró buenos resultados a la hora de la expresión de las subunidades de EgAgB. Por este motivo se decidió cambiar la estrategia experimental y obtener las subunidades usando el sistema de expresión pGEX empleado originalmente (Fernández et al., 1996; Rott et al., 2000; Monteiro et al., 2007). Para ello, los plásmidos pGEX4T1-EgAgB8/1, pGEX4T1-EgAgB8/2 y pGEX4T1-EgAgB8/3 fueron verificados por secuenciación previo a su uso (ver Apéndice 7.1) y luego se emplearon para transformar distintas cepas de expresión y analizar la expresión de las proteínas de fusión mediante inducción con IPTG. Las proteínas de fusión tienen un peso molecular aproximado de 34 kDa, dado que la GST tiene un peso de 26 kDa y las subunidades de EgAgB de aproximadamente 8 kDa. En las distintas cepas de *E. coli* analizadas los mejores resultados se obtuvieron con la cepa de expresión BL21 Codon Plus-RIL, por lo cual se decidió trabajar con esta cepa. En la Figura 3.5 se muestran los resultados de la inducción en estas bacterias empleando 0.1 mM de IPTG a 37°C.



**Figura 3.5. Análisis de la expresión de las subunidades de EgAgB en las bacterias transformadas.** La expresión de las subunidades de EgAgB en la bacteria de *E. coli* de la cepa BL21 Codon Plus-RIL transformadas con los plásmidos pGEX-4T-1 con los distintos insertos fue analizada mediante SDS-PAGE 15% (m/v) seguido de tinción con azul de Coomassie. En los carriles se sembraron los lisados de bacterias sin inducir (s/ind) y de distintas colonias bajo inducción con IPTG 0.1 mM a 37°C (colonias 1 a 3). Se empleó el marcador de peso molecular LMW, cuyos pesos moleculares se indican en la figura. Se marca con la flecha la posición de la banda correspondiente a la proteína de fusión inducida (34 kDa).

En la Figura 3.5 se observa que en todos los lisados de las bacterias inducidas aparece una banda de ~ 34 kDa que no aparece en los controles sin inducir, indicando que las proteínas de fusión se expresan correctamente. Si bien la banda correspondiente a 34 kDa se induce en todos los casos, puede observarse que las proteínas de fusión EgAgB8/2-GST y EgAgB8/3-GST presentaron mejores niveles de expresión que la proteína EgAgB8/1-GST. Por este motivo se comenzó a ajustar las condiciones para la purificación de la proteína EgAgB8/3-GST. Durante la puesta a punto de la purificación se constató que gran parte de la proteína producida se encontró en la fracción insoluble luego de la lisis de las bacterias. Para corregir esta situación, y teniendo en cuenta que en algunos casos la precipitación de las proteínas puede deberse a una alta velocidad de síntesis que impediría el correcto plegamiento de las mismas, se realizaron ensayos tendientes a moderar la síntesis proteica, empleando temperaturas de inducción más bajas (16°C), sin lograr mejores resultados. Por otro lado, también se ensayaron distintos métodos para producir la lisis de las bacterias. Se aumentaron los ciclos de lisis por ultrasonido, se ensayó la lisis empleando lisozima (a 1 mg/mL) en combinación con una solución de sacarosa 10% o con una solución hipotónica y finalmente se intentó recuperar la proteína insoluble usando concentraciones crecientes de urea. Si bien empleando urea 6 M se logró recuperar una buena parte de la proteína precipitada, no fue posible renaturalizarla correctamente mediante diálisis para proseguir con la purificación de la misma, paso que resulta fundamental para purificarla por afinidad empleando una columna de glutatión. Por otro lado, se intentó realizar la purificación empleando únicamente la fracción soluble obtenida inicialmente, pero en este caso se obtuvieron tan sólo 200 µg de proteína de fusión EgAgB8/3-GST por litro de cultivo bacteriano, resultando un rendimiento muy bajo para llevar a cabo los ensayos propuestos en el presente trabajo. Se consultó a varios investigadores con experiencia en la expresión de las subunidades recombinantes de EgAgB fusionadas a GST, particularmente se mantuvo un contacto fluido con el grupo del Dr. Arnaldo Zaha en Brasil. Dado que este grupo había logrado expresar estas subunidades con éxito, para poder conocer a fondo la metodología que han desarrollado realicé una pasantía en su laboratorio, donde se logró mejorar ampliamente los rendimientos proteicos obtenidos. El protocolo completo de obtención y purificación de las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/2 o EgAgB8/3 se detalló en el ítem 2.1.3.2 de la sección Materiales y Métodos. Luego de la puesta a punto en el laboratorio del Dr. Zaha, fue posible reproducir estos resultados en nuestro laboratorio. En todos los casos, para obtener una correcta expresión de la proteína de fusión soluble, fue fundamental mantener el cultivo bacteriano bien oxigenado, empleando volúmenes menores de

cultivo y manteniéndolo constantemente en agitación fuerte. A modo de ejemplo, se muestran los distintos pasos de la purificación de la subunidad EgAgB8/1 en la Figura 3.6. Resultados similares fueron obtenidos para EgAgB8/2 y EgAgB8/3 (ver Figura 7.5 de la sección Apéndices).



**Figura 3.6. Purificación de EgAgB8/1.** Análisis mediante SDS-PAGE de los productos obtenidos a lo largo de los distintos pasos en la purificación de la proteína EgAgB8/1. **(A)** La obtención y purificación de la proteína de fusión EgAgB8/1-GST se siguió mediante SDS-PAGE 12.5 % (m/v) y tinción con azul de *Coomassie*. En los carriles del gel se sembraron los lisados de bacterias sin inducir e inducidas, las fracciones insoluble y soluble luego de la lisis de las bacterias inducidas y las fracciones no unida y unida a la columna de glutatión previo al tratamiento con trombina (unido pre-T). Ésta última corresponde al análisis directo de la resina con agregado de solución siembra y hervido durante 5 minutos. Se indica con la flecha la posición de la banda correspondiente a la proteína EgAgB8/1-GST (34 kDa). **(B)** La obtención de la subunidad EgAgB8/1 se realizó mediante tratamiento de la fracción unida a la columna de glutatión con trombina y posterior elución de proteína. Estos pasos se verificaron mediante SDS-PAGE 15% (m/v) seguidos de tinción con azul de *Coomassie*. Las líneas corresponden a las distintas eluciones de EgAgB8/1 y a la fracción que se mantuvo unida a la columna luego del tratamiento con trombina (unido post-T). Se indica con la flecha la posición de la banda correspondiente a la proteína EgAgB8/1. En ambos casos se corrió en paralelo la proteína GST (26 kDa) y el marcador de peso molecular *LMW*, cuyos pesos moleculares se indican en la figura.

En el panel A de la Figura 3.6 se observan los distintos pasos para la obtención de la proteína de fusión EgAgB8/1-GST. Como se muestra en la figura, aparece una clara banda de ~ 34 kDa al comparar los lisados de las bacterias no inducidas e inducidas

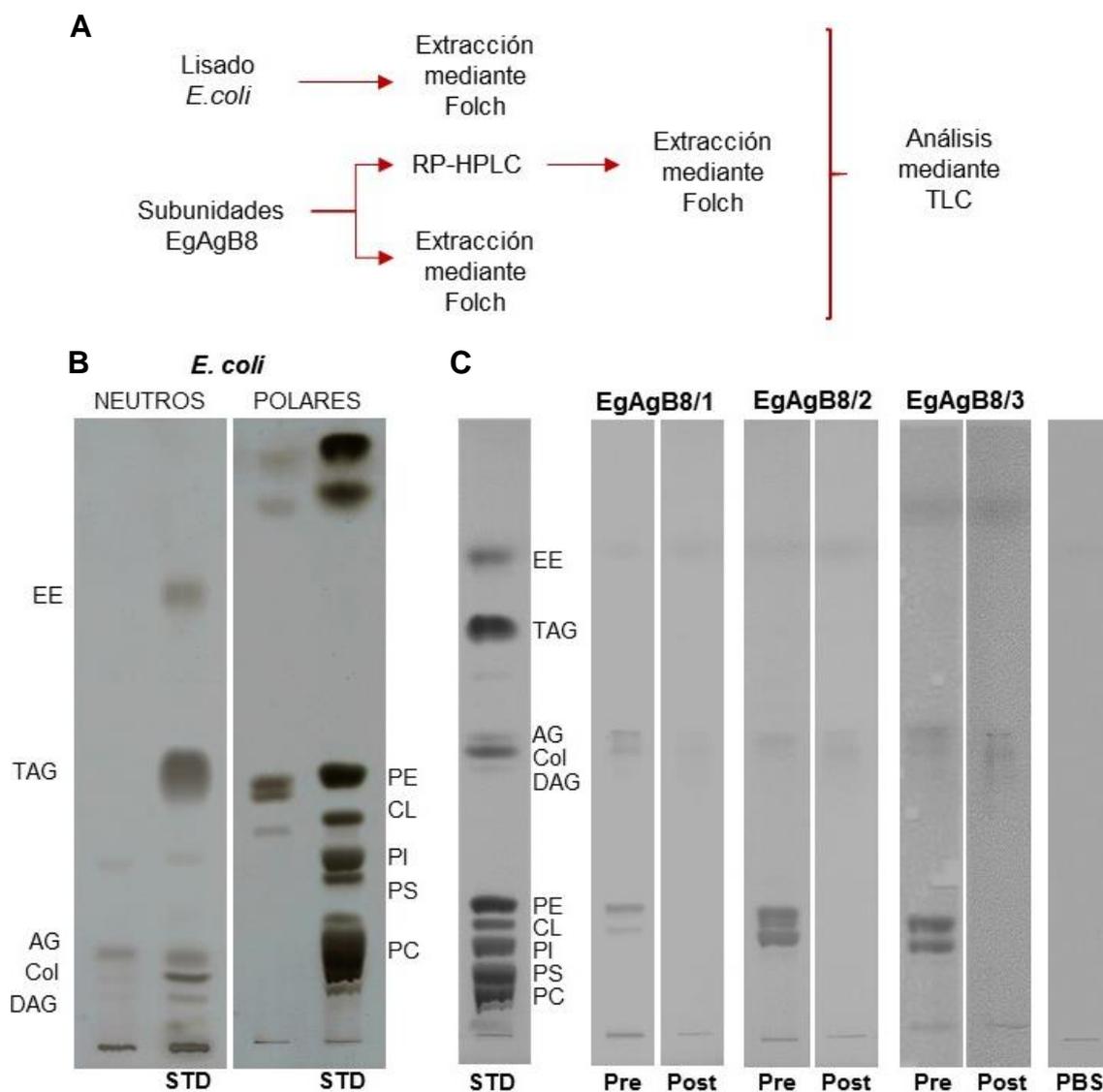
con 0.1 mM de IPTG a 37°C durante 3 horas. Las bacterias inducidas se lisaron mediante ultrasonido y el material soluble se separó del insoluble mediante centrifugación. En este paso se observa que una buena parte de la proteína de fusión se mantuvo en la fracción soluble, fracción que fue sometida a una cromatografía de afinidad empleando una columna de glutatión. Para verificar que la proteína de fusión se unió a la columna de glutatión se tomó una alícuota de la resina luego de su incubación con la fracción soluble y se analizó directamente por SDS-PAGE. Como se puede apreciar en el panel A de la Figura 3.6, la proteína de fusión se encontró en la fracción unida a la columna, mientras que la amplia mayoría de las proteínas no se unieron a la misma y se encontraron en la fracción no retenida. Para la obtención final de la subunidad recombinante se tomó ventaja de la presencia del sitio de corte para la trombina presente en el plásmido pGEX4-T-1 (ver Figura 7.1 de la sección Apéndices). Esto permite realizar una elución selectiva de la proteína recombinante luego de incubar la columna de glutatión con trombina, mientras que la GST se mantiene unida a la columna. En el panel B de la Figura 3.6 se muestran los resultados de los distintos pasos para la obtención final de la subunidad EgAgB8/1. Luego del tratamiento de la columna con trombina, en las dos primeras fracciones se eluyó una banda menor a 14 kDa (de acuerdo al marcador de peso molecular empleado), correspondiente al EgAgB8/1, tal como se observa en la figura. Por otro lado, la fracción retenida en la columna luego de la proteólisis con trombina se analizó tomando una alícuota de la resina y de acuerdo con su tamaño correspondió a la GST, ya que presentó un peso molecular aparente de 26 kDa, claramente menor que el de la proteína de fusión (34 kDa). Como se indicó anteriormente, la purificación de las subunidades EgAgB8/2 y EgAgB8/3 se realizó del mismo modo y los resultados obtenidos fueron similares (se ilustran en el ítem 7.4 de la sección Apéndices). Los rendimientos para cada proteína fueron distintos, siendo siempre menores en el caso de EgAgB8/1. Los valores promedio obtenidos de las distintas purificaciones llevadas a cabo en este trabajo fueron 7.2, 15.4 y 22.4 mg de proteína por litro de cultivo, para EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3, respectivamente. Una vez obtenidas las distintas subunidades de EgAgB se procedió a poner a punto el método de remoción de los ligandos hidrofóbicos que la proteína podría unir en el citoplasma de *E. coli*, como se detallará a continuación.

### 3.1.3. Remoción lipídica de las subunidades de EgAgB mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa

Como se comentó al inicio de la sección 3.1, para llevar a cabo los distintos experimentos propuestos en este trabajo era imprescindible obtener las proteínas en su forma *apo*, es decir libres de lípidos. Como es de esperar para las LBPs, cuando son expresadas en el citoplasma de cualquier célula son potencialmente capaces de unir los ligandos hidrofóbicos allí presentes, aun cuando no resulten los ligandos que unirían normalmente en su entorno natural. Por ello, es necesario contar con un método que permita remover estos ligandos de forma adecuada. En el caso de las subunidades de EgAgB, se había utilizado anteriormente un método basado en el uso de una matriz hidrofóbica, conocida como *Lipidex* (Chemale et al., 2005). Sin embargo, por la experiencia de nuestro grupo, esta resina no resulta adecuada para remover en su totalidad los lípidos asociados a otras proteínas que de unión a lípidos, particularmente de aquellas proteínas pertenecientes a organismos parásitos. Por este motivo, en este trabajo se utilizó un método más drástico empleando cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC), siguiendo una técnica descrita para otras LBPs de parásitos (Meenan et al., 2011). Mediante este método es posible separar las proteínas y los lípidos, de acuerdo a su capacidad diferencial de interactuar con una cadena hidrocarbonada hidrofóbica unida a la columna de HPLC empleada. En este caso se utilizó una columna C8 y como fase móvil se utilizó un gradiente de H<sub>2</sub>O y acetonitrilo. Las proteínas se sembraron en presencia de TFA con el fin de desensamblar su estructura y permitir así que los lípidos que se encontraban unidos a la proteína interactúen diferencialmente con la columna de acuerdo a su hidrofobicidad. El gradiente se inició con 10% de acetonitrilo y ascendió hasta 100% de acetonitrilo en 25 minutos, siguiendo los pasos descritos en el ítem 2.1.4. En el caso de las proteínas EgAgB8/2 y EgAgB8/3, ambas eluyeron a un gradiente cercano al 70% de acetonitrilo, mientras que la proteína EgAgB8/1 eluyó a un gradiente mayor, cercano al 95% de acetonitrilo, indicando que EgAgB8/1 posee un componente de hidrofobicidad mayor que EgAgB8/2 y EgAgB8/3. El acetonitrilo se eliminó de las muestras mediante liofilización y las proteínas se resuspendieron en PBS para su replegamiento. Luego de este paso, todas las proteínas fueron centrifugadas para eliminar cualquier resto de proteína insoluble. Nuevamente, la proteína EgAgB8/1 mostró diferencias respecto a EgAgB8/2 y EgAgB8/3, debido a que en todas las purificaciones realizadas siempre se obtuvo una mayor cantidad de proteína insoluble o precipitada, que no pudo ser

recuperada, disminuyendo así la cantidad de proteína final obtenida. Este comportamiento puede estar relacionado con la naturaleza más hidrofóbica del EgAgB8/1, hecho observado según los resultados descritos arriba. Para verificar la eficiencia de este método en la remoción de los lípidos, una alícuota de cada subunidad obtenida (1.3 mg de EgAgB8/1, 9.0 mg de EgAgB8/2 y 3.5 mg de EgAgB8/3) fue dividida en dos partes iguales, y una de ellas sometida al tratamiento mediante RP-HPLC. Los lípidos de ambas fracciones fueron extraídos y analizados mediante TLC, como se describió en la sección de materiales y métodos (ver ítems 2.1.1.9 y 2.1.1.10, respectivamente). También se analizaron las especies lipídicas mayoritarias presentes en el lisado de bacterias *E. coli* BL21 Codon Plus RIL, con el fin de establecer el espectro de lípidos que podrían estar unidos a las subunidades recombinantes de EgAgB. Un esquema de esta estrategia experimental se muestra en el panel A de la Figura 3.7. En el panel B de la Figura 3.7 se observa que entre los lípidos neutros de estas bacterias se ubican principalmente los ácidos grasos y los diacilglicéridos, mientras que en el caso de los lípidos polares las especies mayoritarias son la fosfatidiletanolamina (PE) y la cardiolipina (CL), en concordancia con datos previos sobre la composición fosfolipídica de *E. coli* (Ames, 1968). Es esperable, por lo tanto, que los lípidos que puedan unirse a las subunidades de EgAgB purificadas a partir de estas bacterias se encuentren entre estas especies. Efectivamente, al analizar los lípidos extraídos de las subunidades recombinantes EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 (Pre) se encontró que estas tenían unidos principalmente los fosfolípidos PE y CL, mientras que contenían cantidades minoritarias de lípidos neutros, como se observa en el panel C de la Figura 3.7. Asimismo se observa en la figura que las muestras tratadas mediante RP-HPLC (Post) no contenían PE y CL, indicando que este método resultó efectivo en la remoción de los fosfolípidos unidos a las proteínas recombinantes.

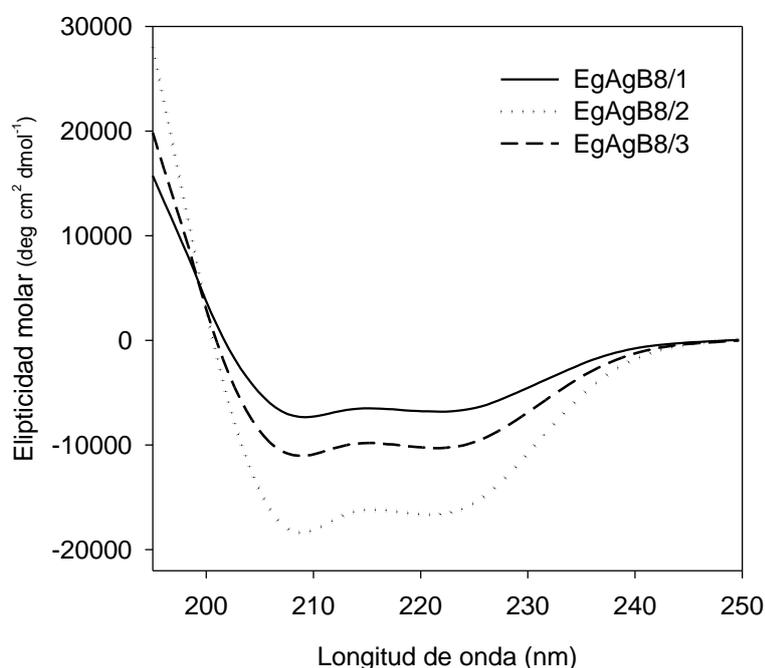
Una vez que se obtuvieron las subunidades recombinantes de EgAgB libres de lípidos se, analizó su estructura secundaria por dicroísmo circular (CD), tal como se detalla más adelante en esta sección.



**Figura 3.7. Remoción de los lípidos unidos a las subunidades de EgAgB8 recombinantes mediante RP-HPLC.** (A) Esquema de la estrategia experimental utilizada para este análisis. Se partió de 1.3 mg de EgAgB8/1, 9.0 mg de EgAgB8/2 y 3.5 mg de EgAgB8/3, que fueron divididos en dos fracciones iguales. Una de las alícuotas fue sometida a RP-HPLC sobre una columna C8 utilizando un gradiente de TFA:acetronitrilo para la elución. Los lípidos presentes en las fracciones eluidas, en paralelo con las subunidades sin tratar y un lisado de *E. coli*, fueron extraídos utilizando la técnica de Folch y analizados por TLC y revelando las placas por carbonización con 8 % CuSO<sub>4</sub> (m/v) en 10% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (v/v). (B) TLC de lípidos polares y lípidos neutros mostrando las clases lipídicas presentes en un lisado de bacterias *E. coli* de la cepa BL21 Codon Plus (C) TLC mostrando los lípidos presentes en las proteínas recombinantes antes de su tratamiento por RP-HPLC y luego del mismo (Pre y Post, respectivamente). Se muestra además el análisis por TLC de un control del arrastre de lípidos durante todo el procedimiento, que se obtuvo realizando la extracción lipídica sobre la solución de PBS que se empleó para obtener las subunidades de EgAgB. En todos los casos, las especies lipídicas se identificaron por comparación con un estándar corrido en paralelo (STD), cuyas siglas se indican a continuación. PC: fosfatidilcolina, PS: fosfatidilserina, PI: fosfatidilinositol, CL: cardiolipina, PE: fosfatidiletanolamina, DAG: diacilglicéridos, Col: colesterol, AG: ácidos grasos, TAG: triacilglicéridos, EE: ésteres de esteroides.

### 3.1.4. Estudio estructural de las subunidades obtenidas por dicroísmo circular

Con la finalidad de evaluar el plegamiento de las subunidades de EgAgB luego del método de purificación, se midieron los espectros de las proteínas mediante CD en el UV lejano (195-250 nm). Como se muestra en la Figura 3.8, en todos los casos se observó un espectro típico de proteínas con alto contenido de  $\alpha$ -hélices, con un doble mínimo a las longitudes de onda 208 y 222 nm, de forma similar a lo reportado previamente (González-Sapienza & Cachau, 2003; Monteiro et al., 2007). Este resultado concuerda con la estructura de  $\alpha$ -helicoidal propuesta para las subunidades de EgAgB, indicando que las distintas subunidades presentaron una estructura correcta luego de completar el proceso de purificación realizado para su obtención. Mediante la deconvolución de los espectros empleando el programa k2d (Andrade et al., 1993; Merelo et al., 1994), se estimó que el porcentaje de  $\alpha$ -hélices fue de 31%, 66% y 29%, el de hoja- $\beta$  fue de 15%, 5% y 15% y el de *random coil* fue de 54%, 29% y 56% para EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3, respectivamente, de forma similar a lo previamente descrito para las subunidades recombinantes con lípidos (Monteiro et al., 2007).



**Figura 3.8. Análisis por dicroísmo circular de las subunidades de EgAgB libres de lípidos.** Se analizó la estructura de las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 recombinantes libres de lípidos mediante CD en el UV lejano (195-250 nm) a 25°C. Se empleó una concentración de 30  $\mu$ M en PBS para cada proteína. Cada línea representa el espectro promedio de tres mediciones seguidas para cada una de las proteínas, las referencias se indican en la figura. Los espectros son representativos de dos experimentos independientes.

En síntesis, los resultados presentados en esta sección mostraron que la purificación de las subunidades recombinantes de EgAgB como proteínas de fusión a GST fue el método más adecuado para su obtención. Además, la remoción de los ligandos lipídicos de las subunidades recombinantes mediante la técnica de RP-HPLC fue adecuada, ya que se obtuvieron las subunidades libres de lípidos y con la estructura secundaria esperable, de acuerdo con el análisis por CD y los datos reportados para estas subunidades. Las proteínas purificadas mediante este método fueron luego empleadas para llevar a cabo los estudios propuestos en los siguientes objetivos de esta tesis.

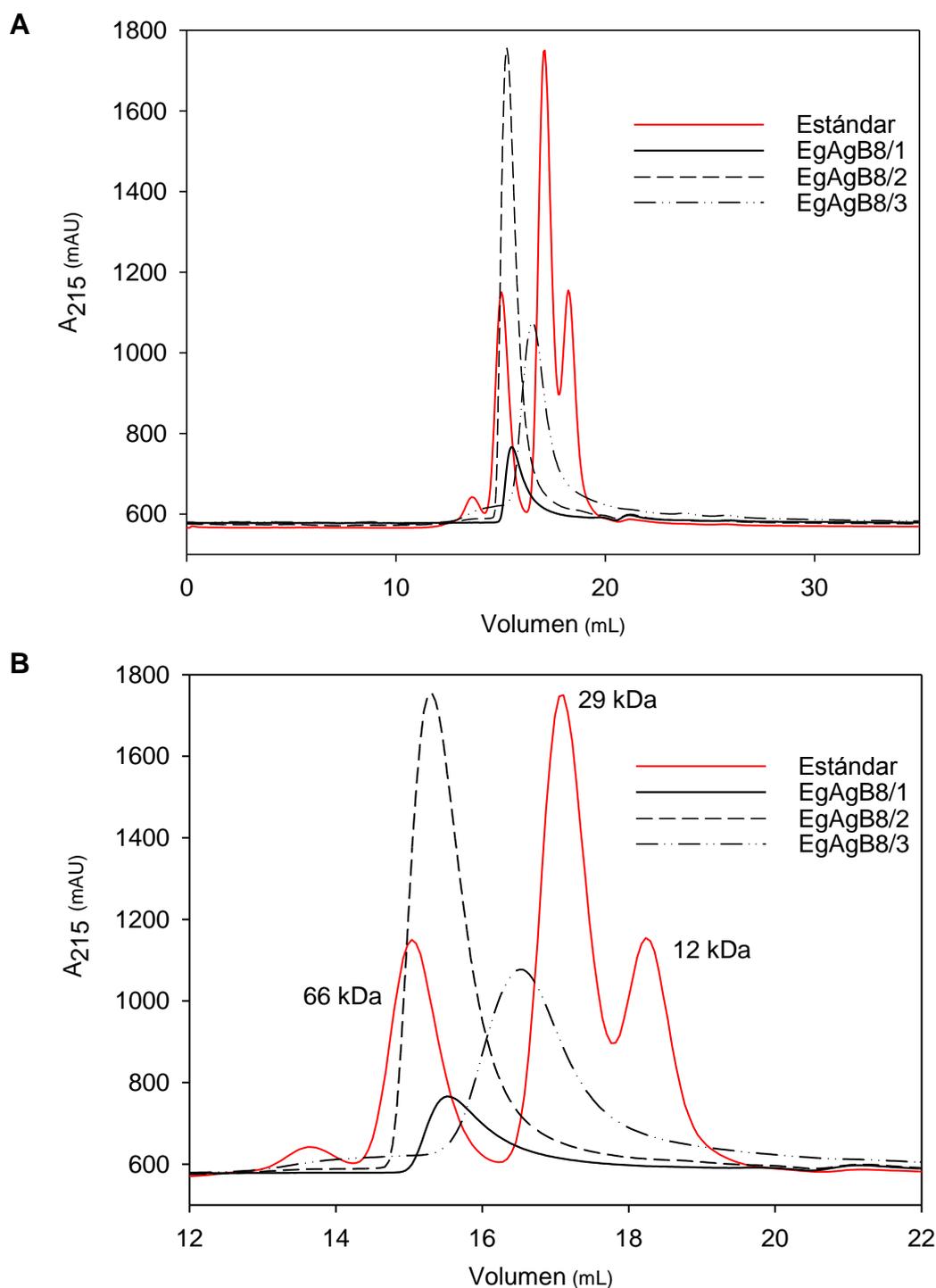
### **3.2. Análisis de la capacidad de oligomerización de las subunidades de EgAgB libres de lípidos**

Estudios previos de las subunidades recombinantes de EgAgB revelaron que éstas no se encuentran en forma monomérica en solución, sino que tienen la capacidad de autoensamblarse formando homo-oligómeros de mayor peso molecular (Monteiro et al., 2007). En dicho trabajo se evidenció la presencia de oligómeros de 120-160 kDa, por lo que se sugirió que la estructura formada por las subunidades recombinantes de EgAgB podría ser similar a la del EgAgB nativo. Sin embargo, en estos estudios no se consideró la contribución de los lípidos unidos a las subunidades recombinantes en el proceso de oligomerización. Ya se mencionó que la partícula de EgAgB nativa une lípidos de varias clases distintas (Obal et al., 2012), y que mediante ensayos *in vitro*, se determinó que algunas subunidades recombinantes, como el EgAgB8/1 y EgAgB8/2, son capaces de unir ácidos grasos (Chemale et al., 2005). Además, en la sección anterior (ver ítem 3.1.3) se puso de manifiesto que las subunidades de EgAgB recombinantes unen principalmente PE y CL en *E. coli*, posiblemente debido a que estos son los lípidos mayoritarios presentes en estas bacterias. Por este motivo resultó de interés analizar si las subunidades recombinantes libres de lípidos tienen capacidad para formar oligómeros. A continuación se describirán los resultados obtenidos en relación a este análisis, que constituyó el segundo objetivo de esta tesis.

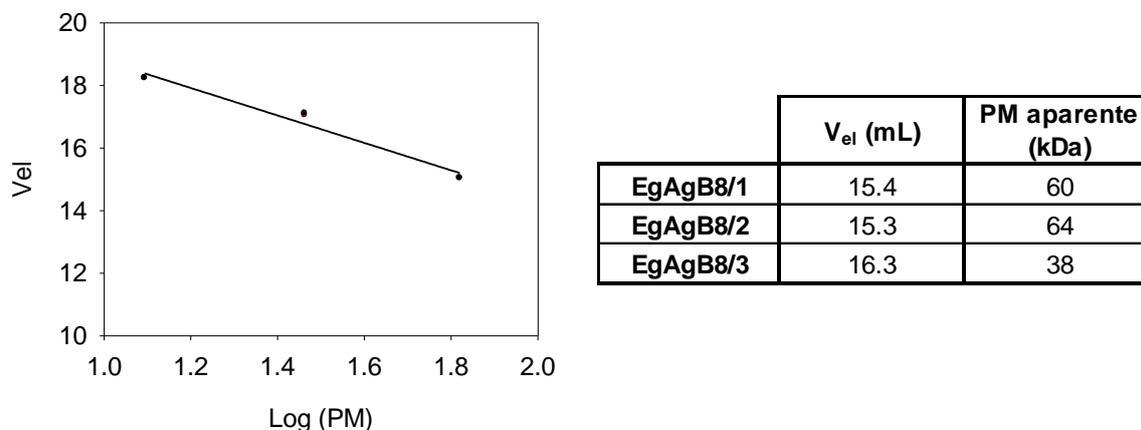
### 3.2.1. Estudios utilizando cromatografía de exclusión molecular

Para analizar la capacidad de oligomerización de las subunidades de EgAgB se inició el estudio empleando cromatografía de exclusión molecular, tal como había sido descrito previamente para las subunidades recombinantes con lípidos (Monteiro et al., 2007). Para ello se empleó una columna *Superdex200* en la que se analizó primeramente un patrón de proteínas comerciales conteniendo BSA (66 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y citocromo c (12 kDa) y posteriormente las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 (ver ítem 2.2.1). Los perfiles de elución se siguieron mediante absorbancia a 280 y 215 nm; los datos obtenidos a 215 nm brindaron mejores resultados para comparar todas las proteínas, dado que las subunidades EgAgB8/1 y EgAgB8/3 no tienen ningún triptófano en su secuencia y por tanto tienen un valor de absorptividad a 280 nm más bajo que el EgAgB8/2 (ver Tabla 7.1 en la sección Apéndices). En la Figura 3.9 se muestran los perfiles de elución de las tres subunidades. En el panel A se observan los perfiles de elución completos, mientras que en el panel B se amplía la zona correspondiente a los picos para su mejor visualización. Como se puede observar, las tres subunidades tuvieron un perfil de elución con un único pico bien definido, siendo muy diferente al perfil de las subunidades con lípidos publicado previamente por Monteiro y colaboradores, dónde se observaron picos más anchos y con presencia de picos secundarios indicando la presencia de poblaciones heterogéneas de oligómeros (Monteiro et al., 2007).

El tamaño de estos oligómeros se estimó calculando el peso molecular aparente de las distintas subunidades de EgAgB de acuerdo a sus volúmenes de elución, realizando una curva de calibración con los volúmenes de elución de las proteínas comerciales utilizadas como estándar, de acuerdo a lo descrito previamente para otras proteínas (Uversky, 1993). Para ello se graficaron los volúmenes de elución obtenidos para la BSA, la anhidrasa carbónica y el citocromo c en cada uno de los duplicados analizados en función del logaritmo de sus pesos moleculares y se ajustaron los datos a una ecuación lineal, como se muestra en la Figura 3.10. Con los valores de este ajuste y de acuerdo a los volúmenes de elución obtenidos para las subunidades de EgAgB se pudo estimar el peso molecular relativo de los oligómeros, obteniendo valores de 60, 64 y 38 kDa para EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3, respectivamente. Nuevamente se encontraron diferencias respecto a los valores estimados para las proteínas con lípidos, ya que Monteiro y colaboradores obtuvieron poblaciones mayoritarias de 125 kDa, 164 kDa y 113 kDa para EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3, respectivamente, además de poblaciones de mayor peso molecular en los tres casos (Monteiro et al., 2007).



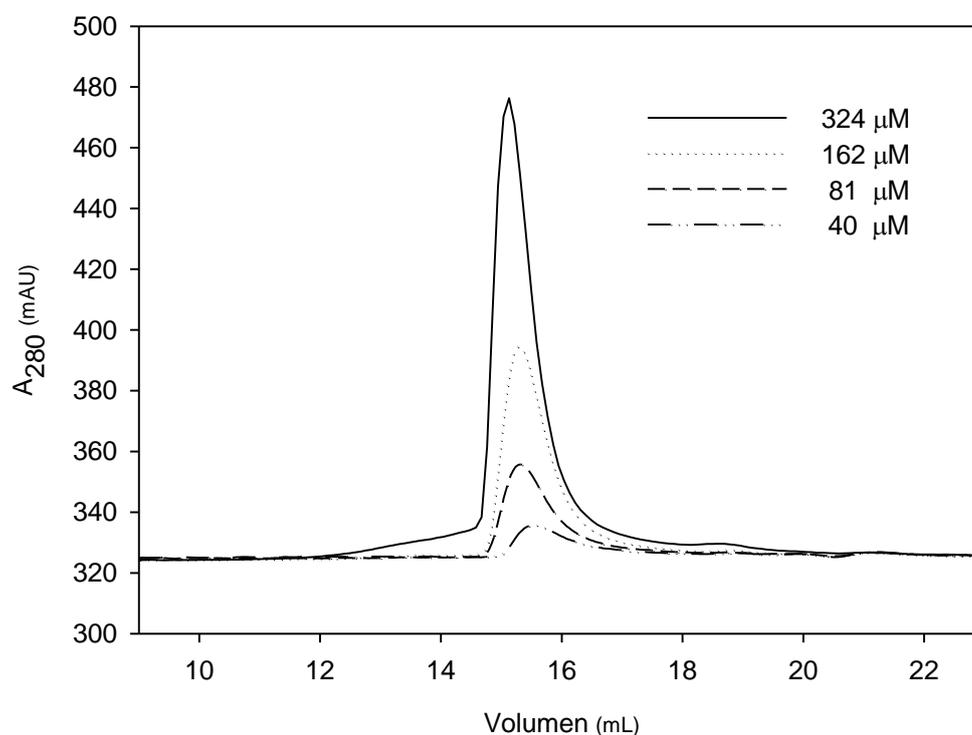
**Figura 3.9. Análisis de las subunidades de EgAgB mediante cromatografía de exclusión molecular.** La oligomerización de las subunidades EgAgB8/1 (214  $\mu$ M), EgAgB8/2 (324  $\mu$ M) y EgAgB8/3 (320  $\mu$ M) se analizó mediante exclusión molecular, empleando como estándar de peso molecular una mezcla de proteínas (1 mg/mL) conteniendo seroalbúmina bovina (66 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y citocromo c (12 kDa) comerciales, cuyo perfil de elución se muestra en rojo. **(A)** Cromatograma completo para las proteínas del patrón y para las subunidades de EgAgB (ver referencias en la figura). **(B)** Sección del cromatograma correspondiente a la zona de resolución de las proteínas (12 y 22 mL). Se indican en la figura los picos correspondientes a los pesos moleculares de las proteínas empleadas como estándar.



**Figura 3.10. Estimación del peso molecular aparente de los oligómeros de EgAgB mediante cromatografía de exclusión molecular.** El peso molecular aparente de los oligómeros de EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 se calculó realizando una curva de calibración de acuerdo al volumen de elución de las proteínas comerciales de tamaño conocido empleadas en la cromatografía de exclusión molecular ( $V_{el}$  versus  $\text{Log}[\text{PM}]$ ). Esta curva se ajustó a una ecuación lineal empleando el programa *SigmaPlot* y con los datos obtenidos mediante este ajuste se calcularon los pesos moleculares aparentes para las distintas subunidades de acuerdo a sus volúmenes de elución.

Este análisis permitió determinar que las subunidades de EgAgB son capaces de establecer interacciones consigo mismas, aún en ausencia de los lípidos que éstas unen, formando homo-oligómeros. Sin embargo, los oligómeros formados por las distintas subunidades en ausencia de los lípidos poseen un tamaño menor al que éstas forman cuando unen los lípidos de la bacteria. Esto podría explicar la existencia de poblaciones heterogéneas al analizar las proteínas conteniendo los lípidos, dado que estas podrían estar uniendo cantidades variables de los mismos y por lo tanto presentar distintos tamaños. Por el contrario, el análisis de las subunidades libres de lípidos no mostró la existencia de poblaciones heterogéneas en cuanto a su tamaño.

Para analizar la estabilidad de estos oligómeros, se realizaron diluciones de las proteínas y se analizaron por exclusión molecular empleando las mismas condiciones. En estos ensayos solo la subunidad EgAgB8/2 pudo ser detectada, dado que como se comentó anteriormente esta subunidad presenta mayor absortividad que EgAgB8/1 y EgAgB8/3. Estos resultados se muestran en la Figura 3.11.

**A****B**

EgAgB8/2 ( $\mu\text{M}$ )	$V_{el}$ (mL)	PM aparente (kDa)
324	15.2	64
162	15.3	62
81	15.3	62
40	15.5	57

**Figura 3.11. Análisis de diluciones de EgAgB8/2 mediante cromatografía de exclusión molecular.** La estabilidad del oligómero de EgAgB8/2 fue analizada mediante exclusión molecular, empleando diluciones seriadas de la proteína (diluciones al medio desde 324 hasta 40  $\mu\text{M}$ ). **(A)** Perfiles de elución de las diluciones de EgAgB8/2 siguiendo la absorbancia a 280 nm. **(B)** Pesos moleculares aparentes estimados de acuerdo a los volúmenes de elución de las distintas diluciones. Los cálculos se realizaron empleando el ajuste que se muestra en la Figura 3.10.

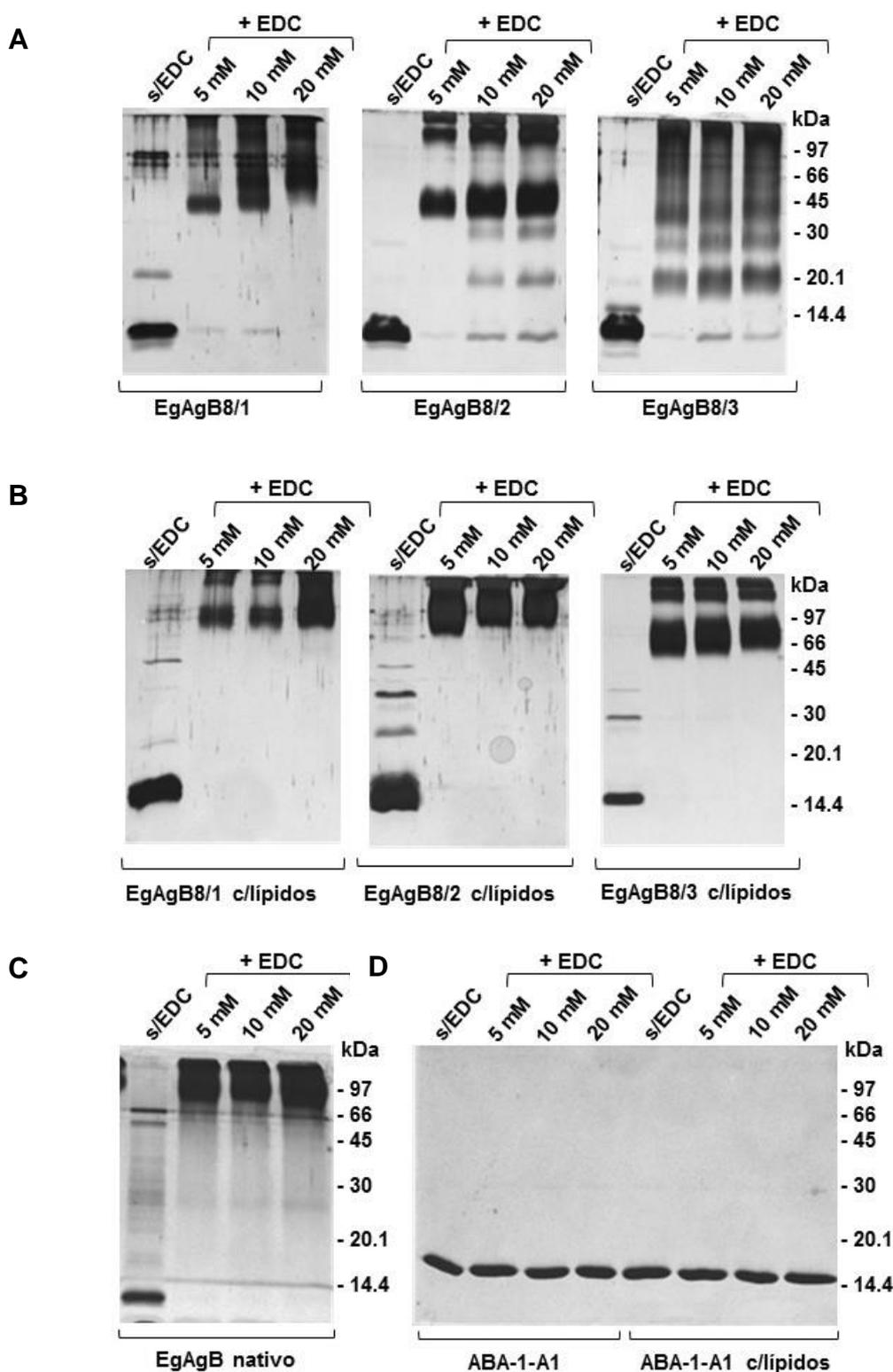
En el panel A de la Figura 3.11 se muestra el cromatograma correspondiente a las distintas diluciones seriadas al medio que se analizaron, yendo desde una concentración de 324  $\mu\text{M}$  de EgAgB8/2 hasta 40  $\mu\text{M}$ . Como se puede observar en la figura, todas las diluciones mostraron un pico único a un volumen de elución de aproximadamente  $15.3 \pm 0.1$  mL, los valores de intensidad a 280 nm variaron de forma concordante a las diluciones realizadas. En el panel B se muestran los valores de los pesos moleculares relativos estimados usando la curva de calibración obtenida para las proteínas comerciales, tal como se explicó anteriormente. A todas las diluciones

ensayadas el peso molecular relativo de los oligómeros de EgAgB8/2 fue aproximadamente  $61 \pm 3$  kDa, lo que sugiere que la oligomerización observada no es producto de un fenómeno de agregación debido a la concentración proteica, si no que ocurre por la existencia de interacciones entre los monómeros, que resultan estables aún en concentraciones más bajas de proteína. De forma comparativa y de acuerdo a los pesos estimados para los oligómeros de las distintas subunidades, el EgAgB8/3 formaría homo-oligómeros de menor tamaño, ya que su peso estimado fue cercano a 40 kDa, mientras que en el caso de EgAgB8/1 y EgAgB8/2 el peso estimado fue cercano a 60 kDa. Con el fin de analizar en mayor detalle el proceso de oligomerización de las subunidades de EgAgB se realizaron ensayos de entrecruzamiento de proteínas empleando agentes entrecruzantes, tal como se describirá a continuación.

### 3.2.2. Experimentos de entrecruzamiento con carbodiimidas

Con el fin de profundizar el análisis de la oligomerización de las subunidades de EgAgB libres de lípidos se realizaron ensayos de entrecruzamiento empleando carbodiimidas, utilizando el agente 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC). El EDC es un agente de entrecruzamiento soluble en agua que activa a los grupos carboxilo para reaccionar de forma espontánea con aminas primarias formando enlaces amida (Nakajima & Ikada, 1995). Se lo conoce como un agente de entrecruzamiento de largo cero (*zero-length*) o de brazo 0.0 Å, debido a que induce la formación del enlace amida sin incorporarse en este enlace, por lo tanto une las moléculas de interés sin ningún tipo de brazo o espaciador. Para ello, es necesario que ambos grupos estén lo suficientemente cerca para que ocurra la unión. Por recomendación del fabricante, primeramente se calculó la cantidad de EDC necesaria de acuerdo a la cantidad de residuos de ácido aspártico, ácido glutámico y lisina para cada subunidad, empleando un exceso 10:1 molar de EDC respecto a los moles de dichos residuos en la concentración de proteína empleada en estos ensayos. Este cálculo arrojó un valor de 4.8, 6.9 y 8.4 mM EDC para las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 respectivamente. Para cubrir este rango y facilitar las preparaciones de las muestras se emplearon concentraciones crecientes de 5, 10 y 20 mM EDC para las subunidades libres de lípidos, siguiendo el protocolo descrito en la sección de materiales y métodos (ver ítem 2.2.2). A fin de comparar los resultados se realizó el ensayo en las mismas condiciones con las subunidades con lípidos (sin el paso de RP-HPLC) y la proteína EgAgB nativa purificada a partir de líquido hidático. Además, como control se utilizó la proteína ABA-1-A1 del parásito *Ascaris suum*, perteneciente a la familia de las

poliproteínas alergénicas de nematodos, caracterizada por comportarse como una proteína monomérica con alto contenido de  $\alpha$ -hélices y con capacidad de unir lípidos (Meenan et al., 2011). Del mismo modo, la proteína ABA-1-A1 se utilizó tanto en ausencia como en presencia de sus ligandos. Los resultados obtenidos mediante este ensayo se muestran en la Figura 3.12. En el panel A se observan los productos de entrecruzamiento obtenidos para cada una de las subunidades de EgAgB libres de lípidos. Como puede observarse, el comportamiento fue distinto para las tres subunidades, en el caso de las subunidades de EgAgB8/1 y EgAgB8/2 libres de lípidos se obtuvieron productos mayoritarios de un tamaño cercano a 45 kDa en comparación con el marcador de peso molecular utilizado, mientras que también se observan productos de mayor tamaño. En el caso de la subunidad EgAgB8/3 libre de lípidos, se observa principalmente un patrón de bandas en escalera más heterogéneo, aunque también se observan productos de mayor tamaño. Los productos de entrecruzamiento obtenidos para las subunidades con lípidos fueron distintos a los mencionados anteriormente, como se observa en el panel B de la Figura 3.12. En este caso se obtuvieron productos de mayor tamaño para todas las proteínas, cercanos a la banda de 97 kDa del marcador molecular empleado para EgAgB8/1 y EgAgB8/2 y más cercano a la banda de 66 kDa en el caso de EgAgB8/3. En todos los casos también aparecen productos de mayor tamaño por encima de estas bandas. Estos productos se asemejan a los obtenidos al analizar el entrecruzamiento del EgAgB nativo, como puede apreciarse en el panel C de la Figura 3.12, donde aparecen productos de un tamaño cercano a 97 kDa, similares a los que se observan para las subunidades EgAgB8/1 y EgAgB8/2. Cabe destacar que en ninguna de las condiciones analizadas la proteína ABA-1-A1 se observó como oligómero, tanto en presencia o ausencia de sus ligandos, como a la concentración más alta de EDC, se encontró siempre en forma de monómero (panel D de la Figura 3.12). Esto sugiere que las subunidades de EgAgB deberían encontrarse interaccionando lo suficientemente cerca como para entrecruzarse en estos ensayos, lo que no ocurriría en el caso de la proteína ABA-1-A1.

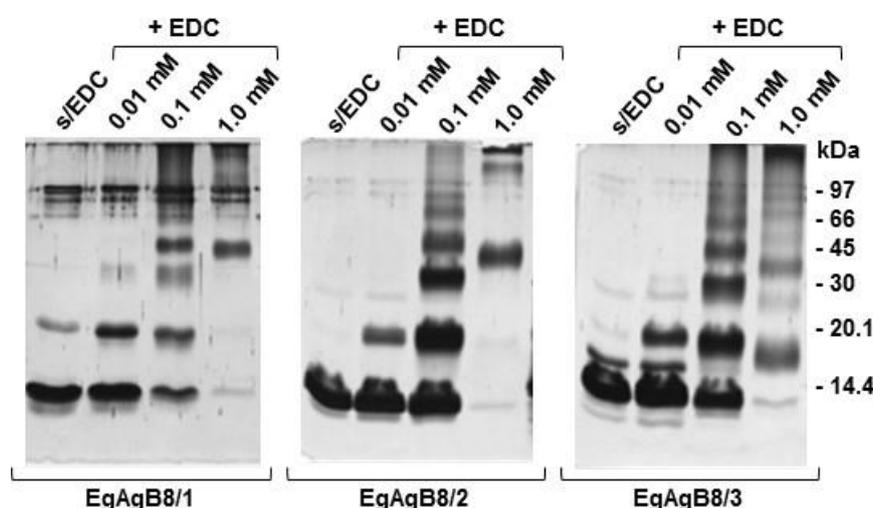


**Figura 3.12. Análisis de la oligomerización del EgAgB mediante entrecruzamiento con EDC.** Los productos de entrecruzamiento se analizaron mediante SDS-PAGE al 15% (m/v) y tinción con nitrato de plata. Las líneas corresponden a la proteína sin tratar (s/EDC) y a las concentraciones de EDC analizadas (5, 10 y 20 mM), empleando 30  $\mu$ M de proteína en cada caso. **(A)** Entrecruzamiento de las subunidades de EgAgB libres de lípidos. **(B)** Entrecruzamiento de las subunidades de EgAgB con lípidos. **(C)** Entrecruzamiento del EgAgB nativo. **(D)** Entrecruzamiento de la proteína ABA-1-A1 (control). Los tamaños del marcador de peso molecular se indican en cada panel (kDa).

Los resultados obtenidos mediante el análisis de entrecruzamiento con EDC apoyan la idea de que las subunidades libres de lípidos son capaces de formar homo-oligómeros de mayor tamaño, y que estos son más pequeños a los que se forman cuando las subunidades están unidas a sus ligandos lipídicos. Esto sugiere que si bien las subunidades son capaces de interaccionar consigo mismas, lo hacen de forma distinta cuando los lípidos se encuentran presentes. La comparación entre las tres subunidades mostró que los oligómeros formados por el EgAgB8/3 libre de lípidos serían más pequeños a los que se forman en el caso de EgAgB8/1 y EgAgB8/2, lo cual coincide con el resultado obtenido empleando cromatografía de exclusión molecular (ver ítem 3.2.1). Asimismo, esta diferencia parecería mantenerse aun cuando la proteína une los lípidos, dado que los productos de EgAgB8/3 con lípidos parecen tener un tamaño menor al de los productos formados por EgAgB8/1 y EgAgB8/2. Al analizar el comportamiento del EgAgB nativo, se pudo observar que los productos de entrecruzamiento obtenidos tuvieron un tamaño similar a los productos obtenidos para las subunidades EgAgB8/1 y EgAgB8/2 con lípidos. Cabe mencionar que un análisis por espectrometría de masas realizado en Uruguay por la Dra. Ana Ferreira y la Lic. Maite Folle (Cátedra de Inmunología, UdelaR) mostró que esta fracción de EgAgB nativo purificada de líquido hidático contiene las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/2, EgAgB8/3 y EgAgB8/4. Si bien no está claro cómo se asocian estas subunidades en la partícula nativa, es decir si las partículas pueden contener diferentes subunidades asociadas entre sí, o si es posible que existan distintas partículas formadas por distintos tipos de homo-oligómeros, estos ensayos mostraron que los productos de entrecruzamiento con EDC tuvieron un comportamiento similar al de las subunidades recombinantes sin deslipidizar, más allá de la composición que puedan presentar.

Con el fin de profundizar el análisis mediante entrecruzamiento, se realizaron ensayos empleando concentraciones menores de EDC para reducir la relación molar entre el EDC y los residuos de lisina, ácido aspártico y ácido glutámico en las subunidades libres de lípidos. Al reducir la cantidad de EDC, la reacción se limitaría a aquellas moléculas que se encuentren más cercanas. Para ello se empleó una concentración de 1.0, 0.1 y 0.01 mM EDC, es decir 5, 50 y 500 veces menos a la empleada en los ensayos anteriores. Los resultados obtenidos en estos ensayos se muestran en la Figura 3.13. A la menor concentración de EDC empleada (0.01 mM) se observan principalmente el monómero y el dímero para todas las subunidades, al aumentar la concentración (0.1 mM) se observan un patrón en escalera con bandas regularmente espaciadas, mientras que en el caso de 1.0 mM de EDC, el resultado se asemeja al obtenido para 5 mM, el monómero disminuye ampliamente y para las

subunidades de EgAgB8/1 y EgAgB8/2 se observa una banda de un peso molecular en el entorno de los 45 kDa, mientras que la subunidad EgAgB8/3 mantiene el patrón heterogéneo de bandas en escalera. Estos resultados sugieren que las subunidades de EgAgB interactúan de forma que permanecen muy próximas entre sí, el primer componente que se favorece al disminuir la concentración de EDC es el dímero, y posteriormente aparecen trímeros, tetrámeros y oligómeros de mayor orden. El hecho de que se mantenga la diferencia entre el comportamiento de EgAgB8/3 respecto a EgAgB8/1 y EgAgB8/2 aún a 1 mM de EDC sugiere que la subunidad EgAgB8/3 es capaz de formar oligómeros más heterogéneos que EgAgB8/1 y EgAgB8/2.



**Figura 3.13. Análisis de la oligomerización del EgAgB mediante entrecruzamiento con EDC.** Los productos de entrecruzamiento se analizaron mediante SDS-PAGE al 15% (m/v) y tinción con nitrato de plata. Las líneas corresponden a las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 sin tratar (s/EDC) y a las distintas concentraciones de EDC utilizadas en este caso (0.01, 0.1 y 1.0 mM). Los tamaños del marcador de peso molecular se indican en la figura (kDa).

Como resumen de los resultados presentados en esta sección, mediante análisis por exclusión molecular y entrecruzamiento químico, se determinó que los lípidos no son indispensables para la oligomerización de las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3, ya que en su ausencia estas subunidades también son capaces formar homo-oligómeros de mayor tamaño. Los datos sugieren que los oligómeros formados por EgAgB8/3 son más heterogéneos y presentan en general un tamaño menor que los formados por las otras subunidades analizadas. La comparación de los productos de entrecruzamiento de las subunidades libres de lípidos y sin deslipidizar mostró que los oligómeros formados por las subunidades con lípidos tienen un tamaño mayor, sugiriendo que estos oligómeros podrían tener una organización estructural diferente debido a la participación de los lípidos durante este proceso.

### 3.3. Caracterización de las propiedades de unión de las subunidades de EgAgB a ligandos lipídicos

Como se comentó en las secciones anteriores, estudios previos de las subunidades recombinantes de EgAgB mostraron que algunas de ellas, en particular EgAgB8/1 y EgAgB8/2, son capaces de unir algunos análogos de ácidos grasos *in vitro* (Chemale et al., 2005). Por otro lado, el análisis de la composición lipídica del EgAgB nativo mostró que ésta presenta una amplia variedad de lípidos, tanto lípidos neutros (ácidos grasos, diacilglicéridos, triacilglicéridos, colesterol y ésteres de esteroides) como lípidos polares (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol y cardiolipina) (Obal et al., 2012). Asimismo, la capacidad de las subunidades recombinantes EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 de unir fosfolípidos quedó demostrada en este trabajo de acuerdo a la caracterización de los lípidos de *E. coli* que unieron durante su síntesis en la bacteria (ver sección 3.1.3). Una vez que se lograron obtener las subunidades recombinantes libres de lípidos, se profundizó el estudio de las propiedades de unión de distintos ligandos lipídicos a las subunidades de EgAgB, lo cual constituyó el tercer objetivo de este trabajo. Para ello se emplearon métodos basados en el uso de técnicas fluorescentes. A continuación se describirán los resultados obtenidos en relación a este objetivo.

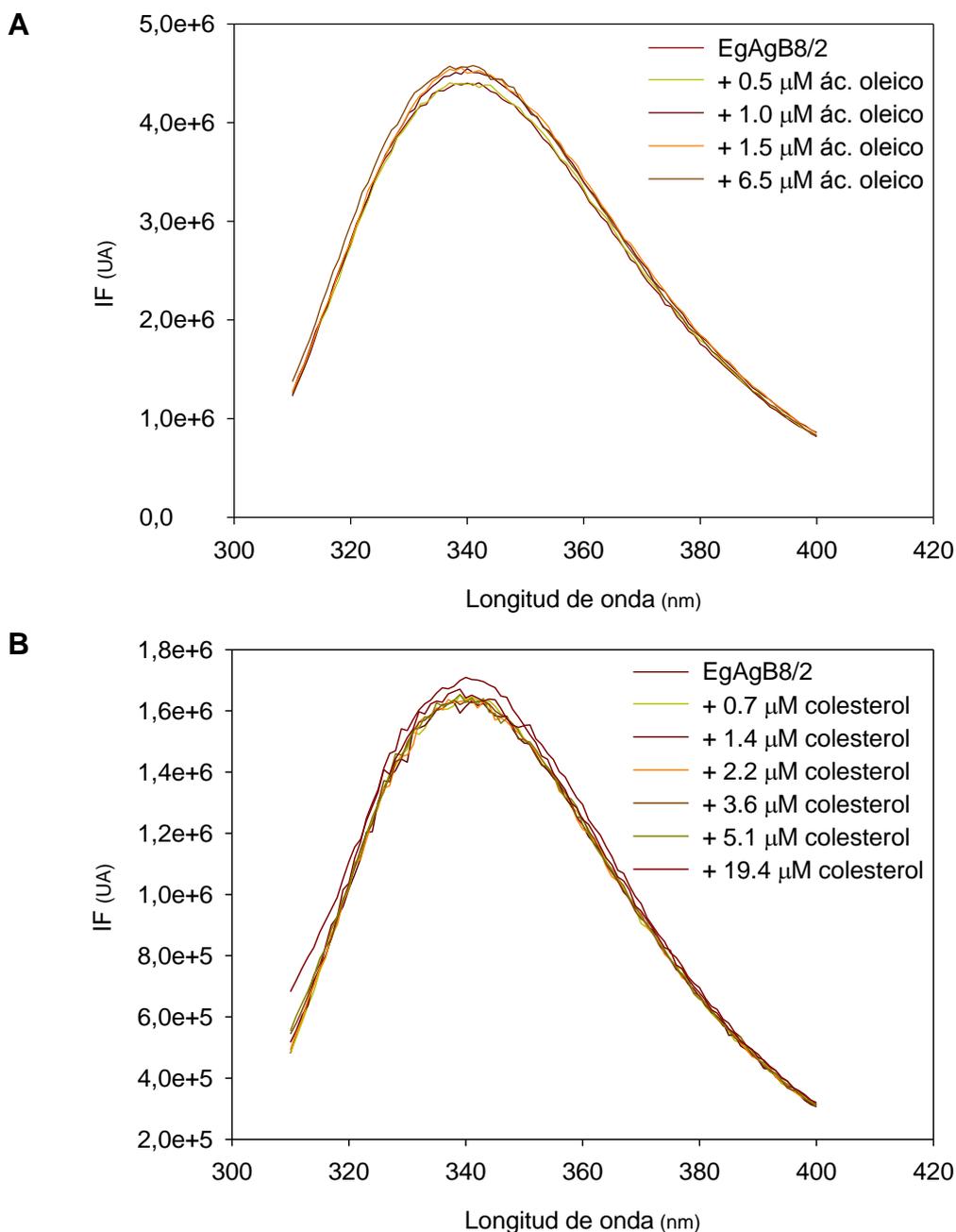
#### 3.3.1. Análisis de la unión de lípidos a las subunidades de EgAgB empleando fluorescencia intrínseca

Como una primera aproximación al análisis de la unión de lípidos a las subunidades de EgAgB se utilizaron las propiedades de fluorescencia intrínseca de las proteínas. La fluorescencia intrínseca de las proteínas se debe principalmente a la presencia de los aminoácidos aromáticos: triptófano, tirosina y en menor medida fenilalanina. Particularmente, debido a que la fluorescencia del triptófano es sensible al entorno polar de la molécula, se ha empleado ampliamente para el análisis de interacciones proteína-proteína, de cambios conformacionales y de unión a diversos ligandos (Lakowicz, 2007). En el caso de las subunidades de EgAgB, la subunidad EgAgB8/2 es la única que presenta un triptófano en su secuencia, por lo que se empleó esta subunidad para analizar los cambios en la fluorescencia intrínseca de la proteína al unirse a distintos ligandos lipídicos. Esta aproximación tiene como ventaja la posibilidad de emplear los lípidos naturales sin necesidad de usar otro tipo de análogos lipídicos. Esta estrategia

fue empleada por Chemale y colaboradores, quienes analizaron la fluorescencia intrínseca de la subunidad EgAgB8/2 deslipidizada con la resina hidrofóbica *Lipidex* tras el agregado de ácidos grasos (Chemale et al., 2005). En dicho estudio no se logró evidenciar cambios en los espectros tras el agregado de los ácidos grasos. Como es posible que la remoción de los ligandos hidrofóbicos no haya sido eficiente con la columna *Lipidex* (de acuerdo con la experiencia de nuestro grupo de investigación), no puede descartarse que en estos ensayos la proteína aún mantuviera unidos algunos lípidos de *E. coli* y debido a ello los espectros no presentarían variaciones con el agregado de ácidos grasos.

En el presente trabajo se realizaron ensayos similares con la subunidad EgAgB8/2 deslipidizada mediante RP-HPLC, empleando ácido oleico y colesterol como posibles ligandos, siguiendo el protocolo descrito en la sección de materiales y métodos (ver ítem 2.3.1). Para ello, se excitó ( $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ ) de forma selectiva al triptófano ubicado en la posición 16 de la secuencia (Trp16) y se recogieron los espectros entre 310 y 400 nm, como se muestra en la Figura 3.14. En estos ensayos, la emisión de la subunidad EgAgB8/2 mostró un pico aproximadamente a los 340 nm, lo cual indicaría que podría estar bastante expuesto al solvente o en una zona no hidrofóbica de la proteína (Lakowicz, 2007). Como puede observarse en el panel A, el espectro de la proteína EgAgB8/2 deslipidizada mediante RP-HPLC no mostró modificaciones tras los sucesivos agregados de ácido oleico, tanto en lo que respecta al valor de intensidad de fluorescencia, como a la posición del máximo. En estos ensayos se utilizó la mayor cantidad de ácido oleico posible de acuerdo al valor de su concentración micelar crítica (Richieri et al., 1992), ya que la formación de micelas a mayores concentración podría interferir con las mediciones de fluorescencia. Por otro lado, en el panel B se observa que tampoco se registraron cambios en los espectros de EgAgB8/2 tras los sucesivos agregados de colesterol. En conjunto, estos resultados podrían indicar que estos ligandos no fueron capaces de unirse a la subunidad EgAgB8/2 o eventualmente que el triptófano de la proteína no se encuentra próximo al sitio de unión de estos ligandos y por lo tanto su emisión no se ve afectada tras la unión de los mismos. Dado que el EgAgB nativo presenta unidos tanto ácidos grasos como colesterol, y que de acuerdo al espectro de emisión de la proteína el Trp16 parece estar expuesto al solvente en una zona poco hidrofóbica, la hipótesis de que éste se encuentra alejado del sitio de unión a los ligandos y por este motivo no es sensible a la unión de los mismos parecería ser la más probable. Como se describió en la introducción, en otras HLBP, como Me-HLBP y Hd-HLBP, el triptófano parecería estar próximo al sitio de unión del ligando (Barrett et

al., 1997; Saghir et al., 2001), pero su posicionamiento en la cadena polipeptídica difiere del correspondiente en el EgAgB8/2 (se encuentra en la posición 41).



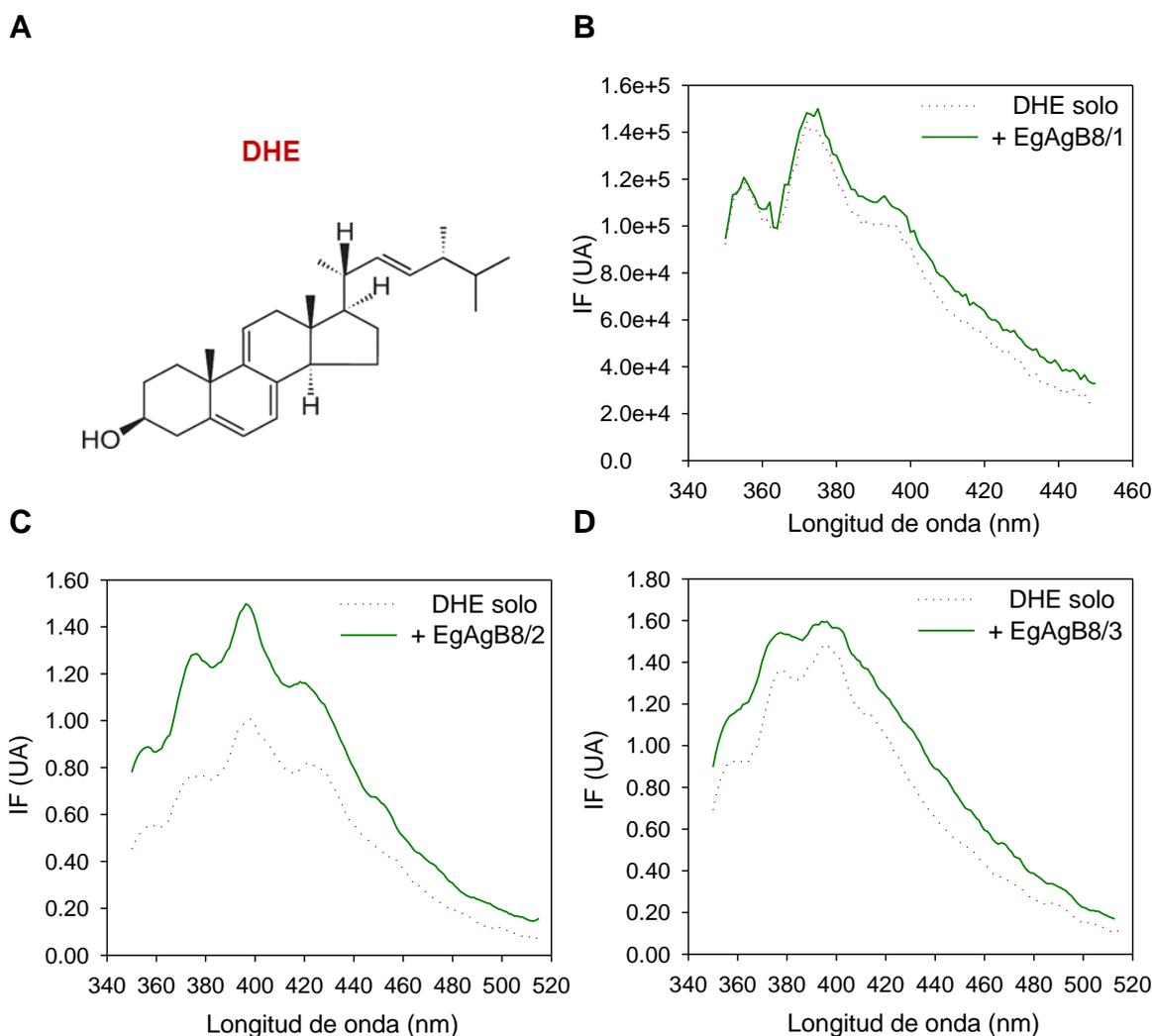
**Figura 3.14. Análisis de la unión de ligandos a EgAgB8/2 empleando fluorescencia intrínseca.** La unión de lípidos al EgAgB8/2 se siguió mediante recolección de los espectros (310-400 nm) luego de la excitación del Trp16 ( $\lambda_{exc}$  295 nm). **(A)** Espectros de EgAgB8/2 libre de lípidos (5  $\mu\text{M}$ ) y tras los sucesivos agregados de ácido oleico (0.5, 1.0, 1.5 y 6.5  $\mu\text{M}$ ). **(B)** Espectros de EgAgB8/2 libre de lípidos (2  $\mu\text{M}$ ) y tras los sucesivos agregados de colesterol (0.7, 1.4, 2.2, 3.6, 5.1 y 19.4  $\mu\text{M}$ ). Los espectros son representativos de dos experimentos independientes.

Dado que mediante el análisis de la fluorescencia intrínseca no fue posible profundizar el análisis de la unión de los lípidos a las subunidades de EgAgB, posteriormente se realizaron ensayos empleando diversos análogos fluorescentes de lípidos, tal como se describirá en el ítem siguiente.

### 3.3.2. Análisis de la unión de análogos fluorescentes de lípidos a las subunidades de EgAgB

La unión de ligandos a las subunidades de EgAgB se evaluó empleando diversos análogos fluorescentes de lípidos, debido a que el análisis de la fluorescencia intrínseca de las proteínas no brindó buenos resultados.

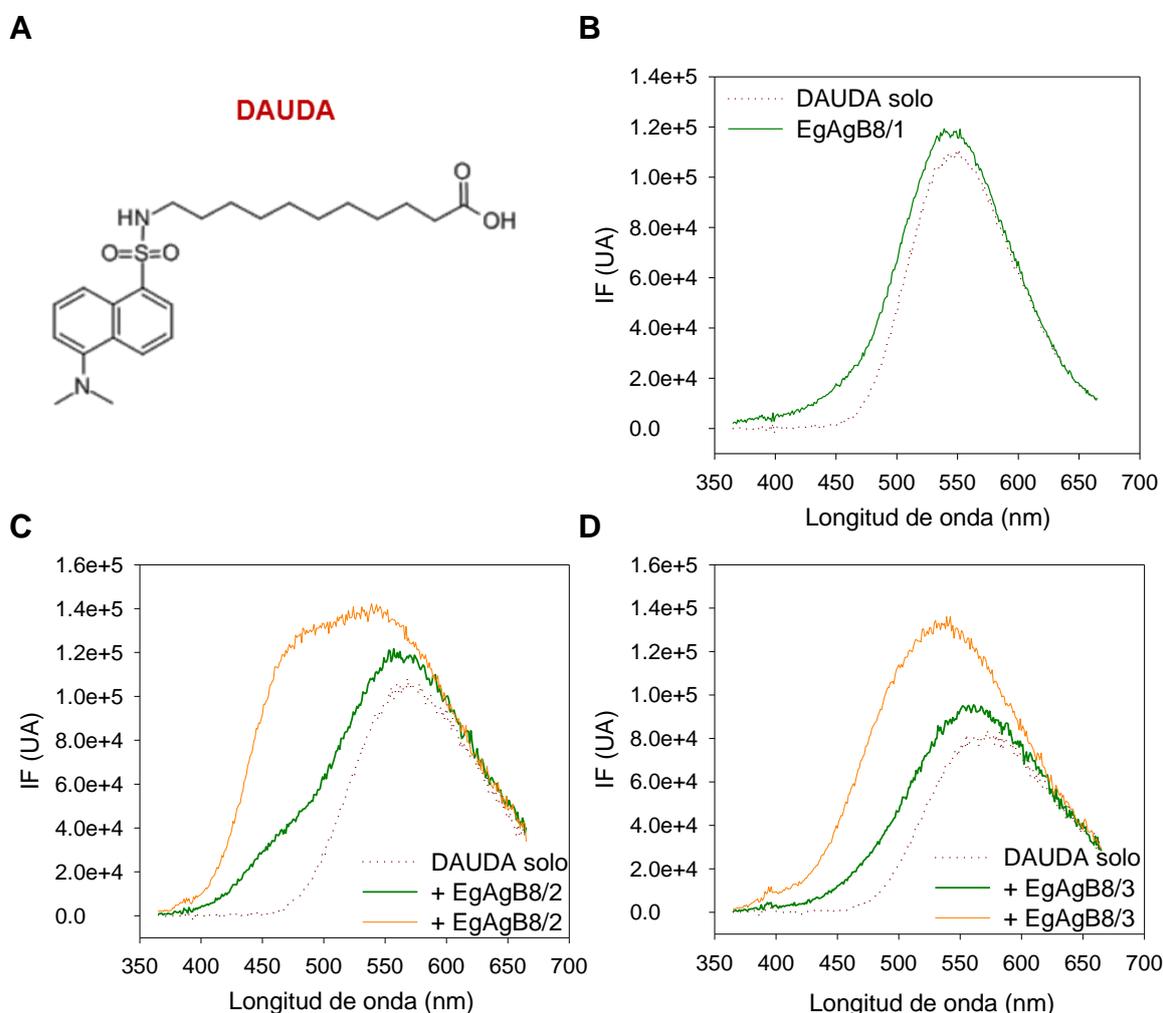
Para caracterizar la unión de los esteroides a las subunidades de EgAgB se inició el análisis empleando un análogo fluorescente del colesterol, el dehidroergosterol (DHE), siguiendo el protocolo descrito en la sección Materiales y Métodos (ver ítem 2.3.2.1). Para ello se excitó la sonda a 325 nm empleando una concentración final de DHE en cubeta de 0.5  $\mu\text{M}$  y se registraron los espectros entre 350-515 nm de la sonda sola y tras el agregado de las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 (desde 0.1 hasta 2.6  $\mu\text{M}$ ). La unión de la sonda a la proteína se esperaba visualizar como un cambio en el espectro del DHE tras el agregado de las distintas subunidades de EgAgB. Sin embargo, en ninguno de los casos se observaron modificaciones importantes en los espectros del DHE tras los sucesivos agregados de ninguna de las tres subunidades, como puede observarse en la Figura 3.15. En esta figura se observa el espectro del DHE solo, así como tras el agregado de la mayor concentración de proteína empleada en cada experimento (2.6  $\mu\text{M}$ ). Como se puede observar, el espectro tras el agregado de las subunidades es apenas distinto al de la sonda sola, mostrando mayores diferencias en el caso de la subunidad EgAgB8/2, pero estos cambios no representaron una modificación sustancial. Cabe mencionar que los espectros de los agregados intermedios son prácticamente superponibles. Este resultado mostró que la sonda fluorescente DHE no sería capaz de unirse a estas subunidades, por lo cual la unión de los esteroides a las subunidades de EgAgB no se pudo determinar mediante este método.



**Figura 3.15. Análisis de la unión de DHE a las subunidades de EgAgB.** (A) Se muestra la estructura química de la sonda DHE. La unión de DHE a las subunidades de EgAgB8/1 (B), EgAgB8/2 (C) y EgAgB8/3 (D) se midió registrando los espectros de emisión de la sonda (350-515 nm o 350-450 nm en el caso de EgAgB8/1), tras la excitación a 325 nm. La línea punteada representa el espectro de la sonda sola (0.5  $\mu\text{M}$ ), las líneas solidas representan los espectros tras el agregado máximo de las distintas subunidades de EgAgB (2.6  $\mu\text{M}$ ).

Con el fin de poder ampliar el análisis de los ligandos lipídicos del EgAgB, se empleó el análogo fluorescente del ácido undecanoico, el ácido 11-(dansilamino)undecanoico (DAUDA). Para ello se excitó la sonda a 345 nm empleando una concentración final de DAUDA en cubeta de 0.5  $\mu\text{M}$  y se registraron los espectros entre 365-665 nm de la sonda sola y tras el agregado de las subunidades de EgAgB siguiendo el protocolo descrito en la sección de materiales y métodos (ver ítem 2.3.2.2). La unión del DAUDA a la proteína se esperaría ver como un aumento en la intensidad de emisión de la sonda, así como en un corrimiento en el máximo de longitud de onda de emisión (McDermott et al., 2001). Nuevamente, para ninguna de las subunidades de EgAgB se observaron

modificaciones importantes en los espectros del DAUDA tras los sucesivos agregados de proteína, como se observa en la Figura 3.16. Dado que se observó un aumento de la intensidad de la emisión de fluorescencia del DAUDA más notorio para EgAgB8/2 y EgAgB8/3, para estas proteínas se llegó hasta una concentración proteica de 8  $\mu\text{M}$ , lo que representaría un exceso molar de proteína de 16 veces. Si bien se observó que la intensidad presentó un aumento mayor y que el máximo de emisión se corrió más aún hacia longitudes de onda menores, este aumento fue leve en comparación con el observado para otras LBPs, empleando una relación proteína ligando mucho menor (McDermott et al., 2001; Saghir et al., 2001; Lee et al., 2007). Este resultado indicaría que la afinidad de las subunidades por el DAUDA es muy baja.

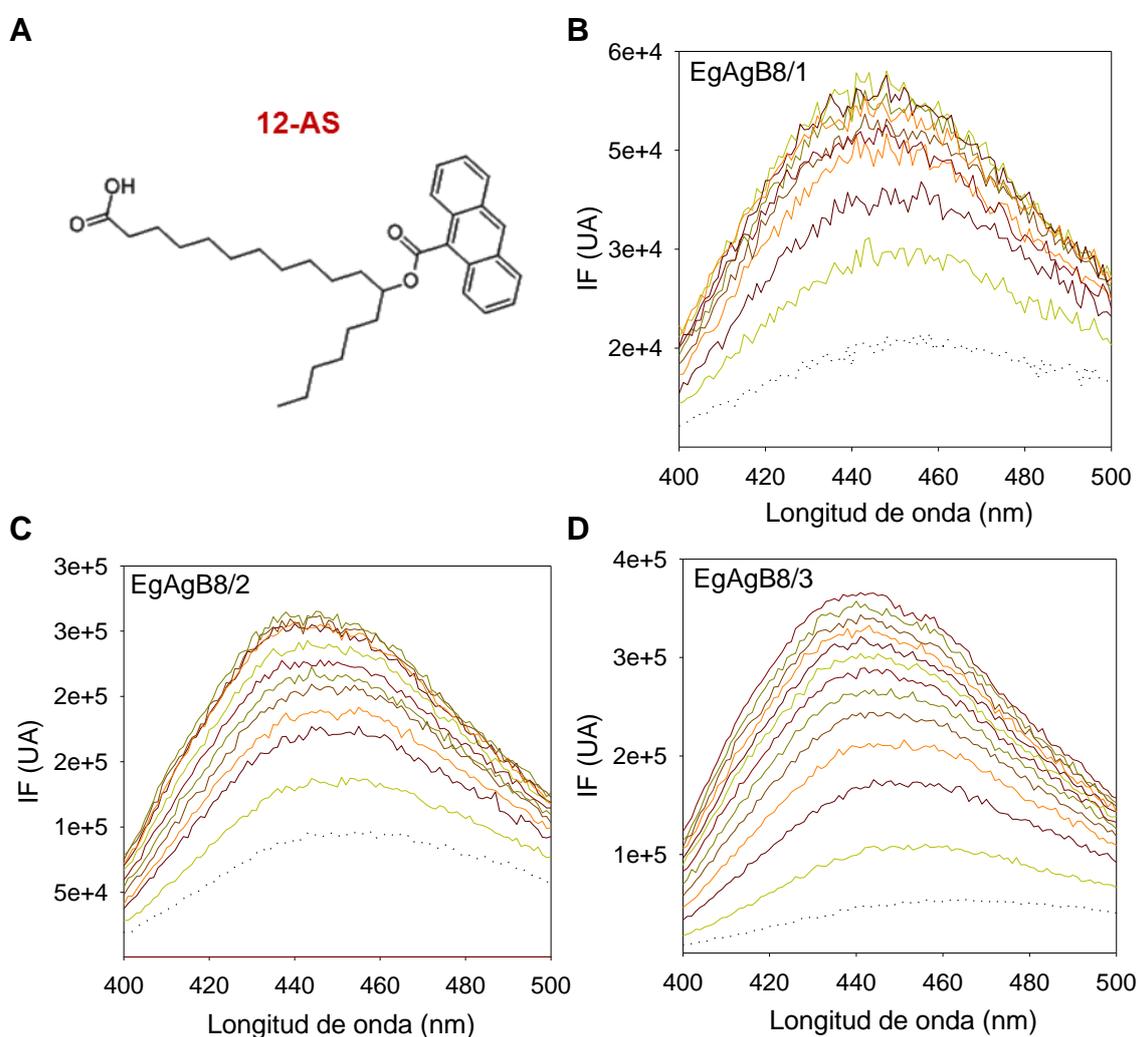


**Figura 3.16. Análisis de la unión de DAUDA a las subunidades de EgAgB.** (A) Se muestra la estructura química del DAUDA. La unión de DAUDA a las subunidades de EgAgB8/1 (B), EgAgB8/2 (C) y EgAgB8/3 (D) se midió registrando los espectros de emisión de la sonda (365-665 nm), tras la excitación a 345 nm. La línea punteada representa el espectro de la sonda sola (0.5  $\mu\text{M}$ ), las líneas solidas representan los espectros tras el agregado de las distintas subunidades de EgAgB (2  $\mu\text{M}$  en verde y 8  $\mu\text{M}$  en naranja).

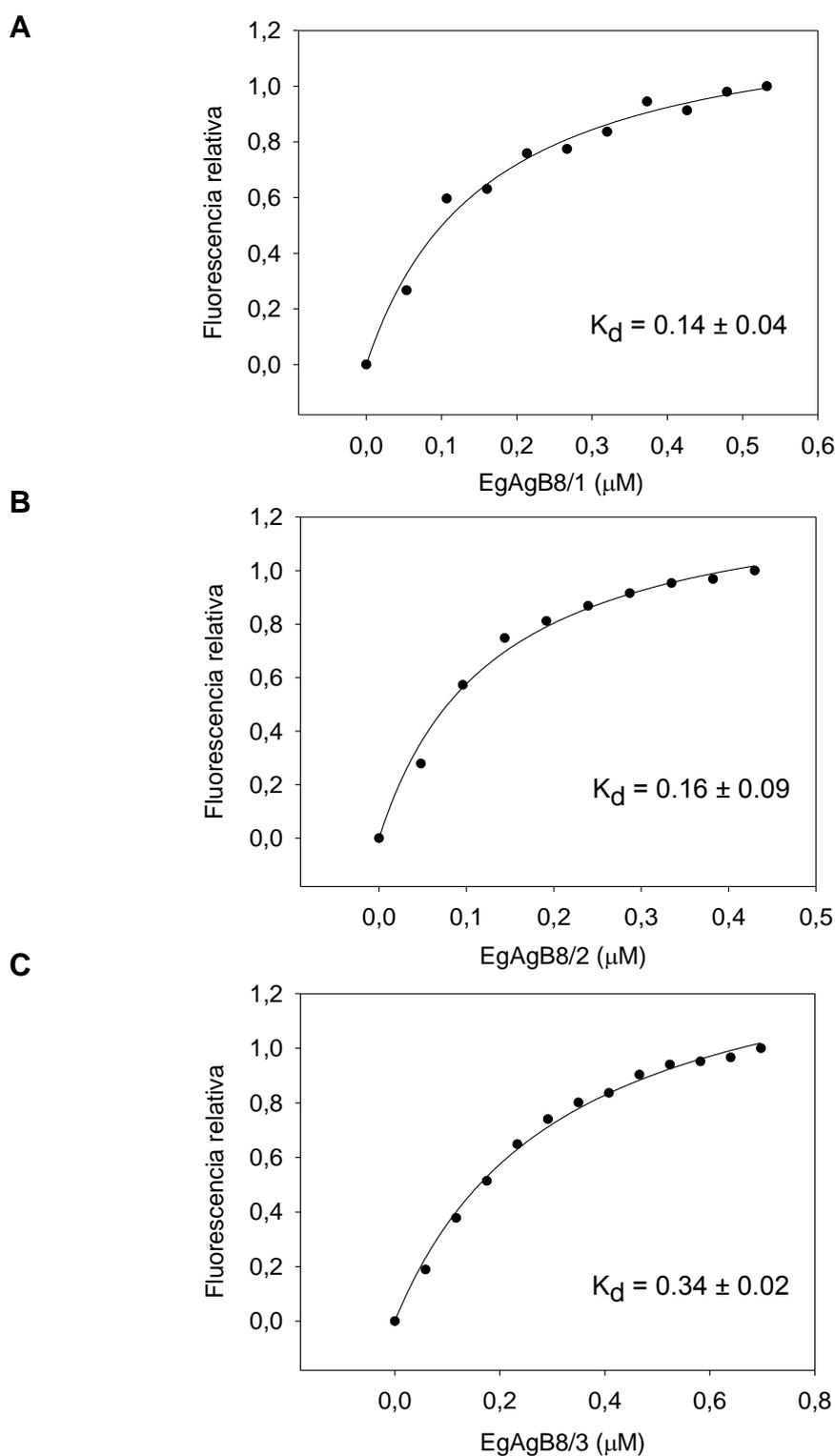
Dado que el DAUDA, un análogo fluorescente de un ácido graso, mostró una unión poco afín a las subunidades de EgAgB, para profundizar el análisis se estudió la capacidad de antroiloxi-derivados de ácidos grasos (AOFAs) de unirse a las subunidades de EgAgB libres de lípidos. Estas sondas, en particular el ácido 16-(9-antroiloxi)-palmítico (16-AP) habían mostrado capacidad de unión a las subunidades EgAgB8/1 y EgAgB8/2 deslipidizadas mediante *Lipidex* (Chemale et al., 2005). Asimismo, el uso de estas sondas permite luego evaluar la transferencia de las mismas hacia membranas fosfolipídicas artificiales mediante un ensayo de transferencia de energía, como se comentará más adelante. En particular, en el presente trabajo se analizó la unión del ácido 12-(9-antroiloxi)-esteárico (12-AS) a las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 deslipidizadas mediante RP-HPLC, siguiendo el protocolo descrito en la sección Materiales y Métodos (ver ítem al 2.3.2.3). Para ello se excitó la sonda a 383 nm empleando una concentración final de 12-AS en cubeta de 0.5  $\mu$ M y se registraron los espectros entre 400-500 nm de la sonda sola y tras el agregado de las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 hasta llegar a saturación. Los AOFAs son sondas que presentan una baja emisión en solvente acuoso, pero que aumentan su emisión cuando se encuentran en un entorno hidrofóbico. Al igual que para el DAUDA, este aumento de emisión es acompañado por un corrimiento espectral hacia longitudes de onda menores. Este corrimiento, conocido como corrimiento hacia el azul, es indicativo que la sonda se encuentra en un entorno hidrofóbico, como podría ocurrir cuando se une a una proteína (Storch et al., 1989). Como se observa en la Figura 3.17, el espectro de la sonda 12-AS tras los agregados de las subunidades de EgAgB mostró un aumento en la emisión de fluorescencia, así como también un corrimiento en la longitud de onda de emisión máxima hacia valores menores (desde 450 a 440 nm), similar al observado para otras LBPs empleando estas sondas (Porfido et al., 2012). En todos los casos se llegó hasta saturación, es decir punto en el cual los espectros no presentaron variaciones importantes. Este comportamiento indicaría que las subunidades son capaces de unirse al 12-AS.

Para obtener los valores de  $K_d$  del 12-AS y las distintas subunidades de EgAgB se graficó el máximo de emisión a 440 nm versus la concentración de proteína empleada y utilizó el programa *SigmaPlot* para determinar la ecuación que mejor se ajustó a estos datos. El mejor ajuste de los datos experimentales se obtuvo empleando una ecuación que describe un equilibrio de unión con un único sitio. En la Figura 3.18 se observan los datos experimentales, así como las curvas teóricas obtenidas empleando esta ecuación. En los distintos paneles de esta figura se observan los datos experimentales y la curva teórica obtenida para las subunidades EgAgB8/1 (A), EgAgB8/2 (B) y EgAgB8/3 (C).

Los valores de  $K_d$  obtenidos fueron  $0.14 \pm 0.04 \mu\text{M}$  para EgAgB8/1,  $0.16 \pm 0.09 \mu\text{M}$  para EgAgB8/2 y  $0.34 \pm 0.02 \mu\text{M}$  para EgAgB8/3. Estos valores indican que estas subunidades de EgAgB son capaces de unir al ligando fluorescente 12-AS. Valores similares de  $K_d$  fueron reportados al analizar la unión de otro AOFA (ácido 16-(9-antioiloxi)-palmítico [16-AP]) a las subunidades EgAgB8/1 y EgAgB8/2 deslipidizadas mediante *Lipidex*, si bien existe una diferencia en el número de sitios de unión que estos autores reportaron (Chemale et al., 2005). Diferencias entre los métodos de deslipidización de las proteínas, así como en el ajuste empleado para la obtención de los parámetros que describen la unión podrían explicar estas variaciones.



**Figura 3.17. Análisis de la unión de 12-AS a las subunidades de EgAgB.** (A) Se muestra la estructura química del 12-AS. La unión de 12-AS a las subunidades de EgAgB8/1 (B), EgAgB8/2 (C) y EgAgB8/3 (D) se midió registrando los espectros de emisión de la sonda (400-500 nm) tras la excitación a 383 nm. La línea punteada representa el espectro de la sonda sola ( $0.5 \mu\text{M}$ ), las líneas solidas representan los espectros tras sucesivos agregados de  $0.05 \mu\text{M}$  de las subunidades de EgAgB (lo cual corresponde al rango  $0.05 - 0.55 \mu\text{M}$ ). Los espectros son representativos de tres ensayos independientes.



**Figura 3.18. Determinación de la  $K_d$  para la unión 12AS-EgAgB.** Los valores de  $K_d$  que describe la unión entre las subunidades de EgAgB y la sonda 12-AS se obtuvieron registrando la emisión del 12-AS ( $\lambda_{\text{ex}} = 383 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$ ) tras sucesivos agregados de  $0.05 \mu\text{M}$  de proteína. Los puntos corresponden a los datos experimentales obtenidos, mientras que la línea sólida corresponde a la curva teórica calculada empleando el programa *SigmaPlot*. Cada gráfico es representativo de tres experimentos independientes. Se indican en cada caso los valores de  $K_d$  obtenidos para cada proteína. **(A)**, **(B)** y **(C)** Determinación de la  $K_d$  para EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3, respectivamente.

Como resumen de los resultados presentados en esta sección, se pudo determinar que el uso de la fluorescencia intrínseca de la proteína EgAgB8/2 no resultó apropiada para el análisis de la unión a ligandos, posiblemente debido a que el Trp16 del EgAgB8/2 se encuentra en una zona de la proteína que no participa de la unión a los lípidos. Por otro lado, las sondas DHE y DAUDA o bien no se unieron a las distintas subunidades de EgAgB o bien lo hicieron con una afinidad muy baja. No obstante, empleando la sonda 12-AS se pudieron determinar las constantes de disociación que describen la unión entre la sonda y las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3. El uso de esta sonda a su vez permitió realizar ensayos de transferencia de ligando desde las subunidades de EgAgB hacia membranas fosfolipídicas artificiales, como se describirá en la siguiente sección.

### **3.4. Análisis de la capacidad de las subunidades de EgAgB de transferir ácidos grasos hacia membranas fosfolipídicas**

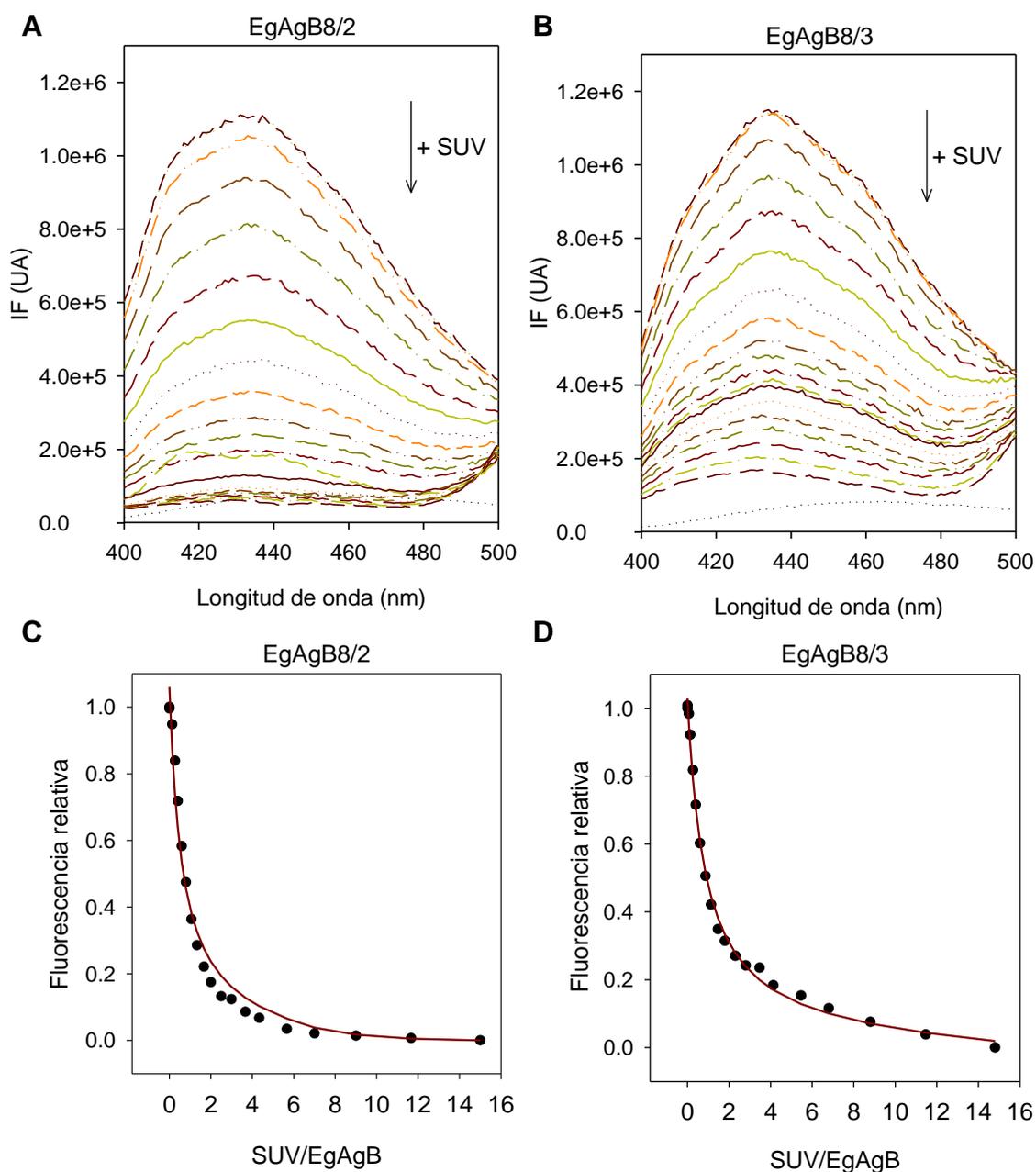
Dada la capacidad del EgAgB de unir diferentes clases de lípidos (Chemale et al., 2005; Obal et al., 2012), muchos de los cuales no son sintetizados por *Echinococcus granulosus*, como el colesterol y los ácidos grasos (Frayha, 1968,1974; Tielens & Hellemond, 2006; Zheng H. et al., 2013), es posible pensar que el EgAgB pueda participar en la distribución de lípidos dentro de los tejidos del parásito o incluso en la adquisición y transporte de los lípidos desde el hospedador, como ha sido propuesto para la proteína TsM150 de *T. solium* (Lee et al., 2007). Teniendo en cuenta que para cumplir esta función el EgAgB debería ser capaz de transferir sus ligandos a sus blancos moleculares y que una gran variedad de estos lípidos se encuentran formando parte de las membranas celulares, se podría suponer que el EgAgB es capaz de interactuar con dichas membranas para transferir sus ligandos. Por lo tanto, fue de nuestro interés analizar la capacidad del EgAgB de transferir ligandos hacia membranas fosfolipídicas, lo cual constituyó el cuarto objetivo del presente trabajo.

Como un primer abordaje a este estudio se empleó un ensayo *in vitro* analizando la capacidad de las subunidades recombinantes de EgAgB de transferir el ligando 12-AS hacia membranas fosfolipídicas artificiales, empleando un ensayo basado en el fenómeno de FRET. Para estos ensayos se emplearon las subunidades EgAgB8/2 y EgAgB8/3, como representantes de las dos subfamilias en que pueden clasificarse las

subunidades del EgAgB de acuerdo a su homología a nivel proteico (ver Figura 1.12). Los resultados obtenidos se detallan a continuación.

### 3.4.1. Determinación del coeficiente de partición de 12-AS entre las subunidades de EgAgB y SUVs

El coeficiente de partición ( $K_p$ ) de la sonda 12-AS entre las subunidades EgAgB8/2 y EgAgB8/3 y las SUVs definido de acuerdo a la Ecuación 2 descrita en el ítem 2.4.2 de la sección Materiales y Métodos, se calculó a través de un ensayo empleando la técnica de FRET. Esta técnica se basa en el fenómeno de transferencia de energía de una sonda que actúa como dador de FRET hacia otra que actúa como aceptor de FRET. Para que esto ocurra, es fundamental que el espectro de emisión del dador se superponga con el espectro de absorción del aceptor y que ambas moléculas se encuentren muy próximas entre sí. En este ensayo se agregaron concentraciones crecientes de SUVs de PC/NBD-PC al complejo EgAgB:12-AS y se registraron los cambios en la fluorescencia del 12-AS tras estos agregados. En este sistema la sonda 12-AS actúa como dador, mientras que el NBD actúa como aceptor de FRET, por lo cual si la sonda es transferida a la membrana, el 12-AS se encontrará próximo al grupo NBD y ocurrirá el fenómeno de transferencia de energía. De este modo, la emisión de fluorescencia del 12-AS presentó una disminución a medida que aumentó la cantidad de SUVs agregadas. Esta disminución de la fluorescencia se graficó en función de la relación molar SUV:EgAgB y se empleó la Ecuación 3 descrita en el ítem 2.4.2 de la sección Materiales y Métodos para ajustar a los datos experimentales obtenidos. Los datos experimentales, así como la curva teórica obtenida para ambas subunidades se muestran en la Figura 3.19. De acuerdo a este ajuste se obtuvieron valores de  $K_p$  de  $0.62 \pm 0.09$  para EgAgB8/2 y de  $0.88 \pm 0.15$  para EgAgB8/3. De acuerdo a como está definido el  $K_p$ , según la Ecuación 2 descrita en el ítem 2.4.2 de la sección Materiales y Métodos, estos valores indican una muy leve preferencia de la sonda 12-AS por las vesículas. Los valores de  $K_p$  así obtenidos permitieron establecer la relación molar adecuada para los ensayos de determinación de la velocidad de transferencia que se comentarán más adelante, asegurando que el fenómeno observado se deba a la transferencia de la sonda desde la proteína hacia las vesículas, lo que se conoce como unidireccionalidad del proceso.

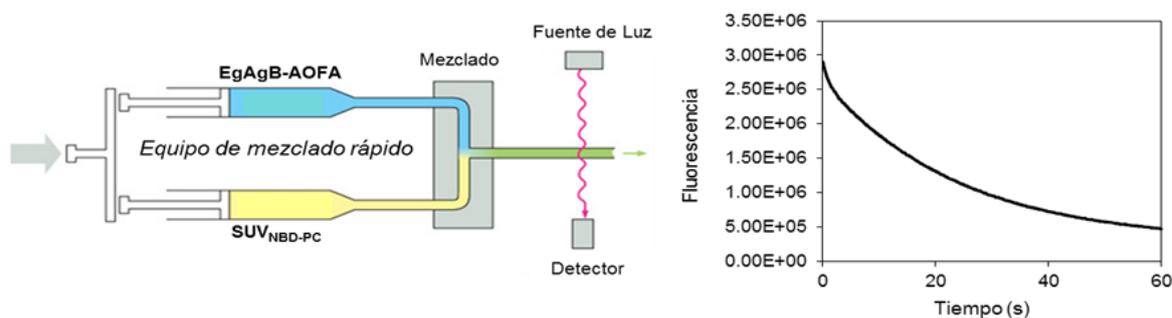


**Figura 3.19. Determinación de la  $K_p$  de 12-AS entre las subunidades de EgAgB y SUVs.** (A) y (B) Se muestran los espectros de emisión de la sonda 12-AS unida a las subunidades de EgAgB en ausencia de vesículas y tras los sucesivos agregados de SUVs de PC/NBD-PC ( $\lambda_{ex}$  383,  $\lambda_{em}$  400-500 nm). La línea punteada representa el espectro de la sonda sola, el espectro máximo corresponde a la sonda unida a la proteína (relación molar proteína:ligando 15:1), mientras que los espectros intermedios muestran la caída en la emisión de la sonda a medida que aumenta la cantidad de SUVs agregada. (C) y (D) Los valores de  $K_p$  del 12-AS entre las subunidades de EgAgB y las SUVs se obtuvieron registrando la intensidad de fluorescencia del 12-AS a 440 nm tras los sucesivos agregados de SUVs. Los puntos corresponden a los datos experimentales obtenidos, mientras que la línea sólida corresponde a la curva teórica calculada empleando la Ecuación 3 (ver ítem 2.4.2) utilizando el módulo *Solver* del programa *Microsoft Excel*. Los datos son representativos de dos experimentos independientes. Los valores de  $K_p$  obtenidos mediante este ajuste fueron de  $0.62 \pm 0.09$  para EgAgB8/2 y de  $0.88 \pm 0.15$  para EgAgB8/3.

### 3.4.2. Transferencia de 12-AS desde las subunidades de EgAgB hacia SUVs

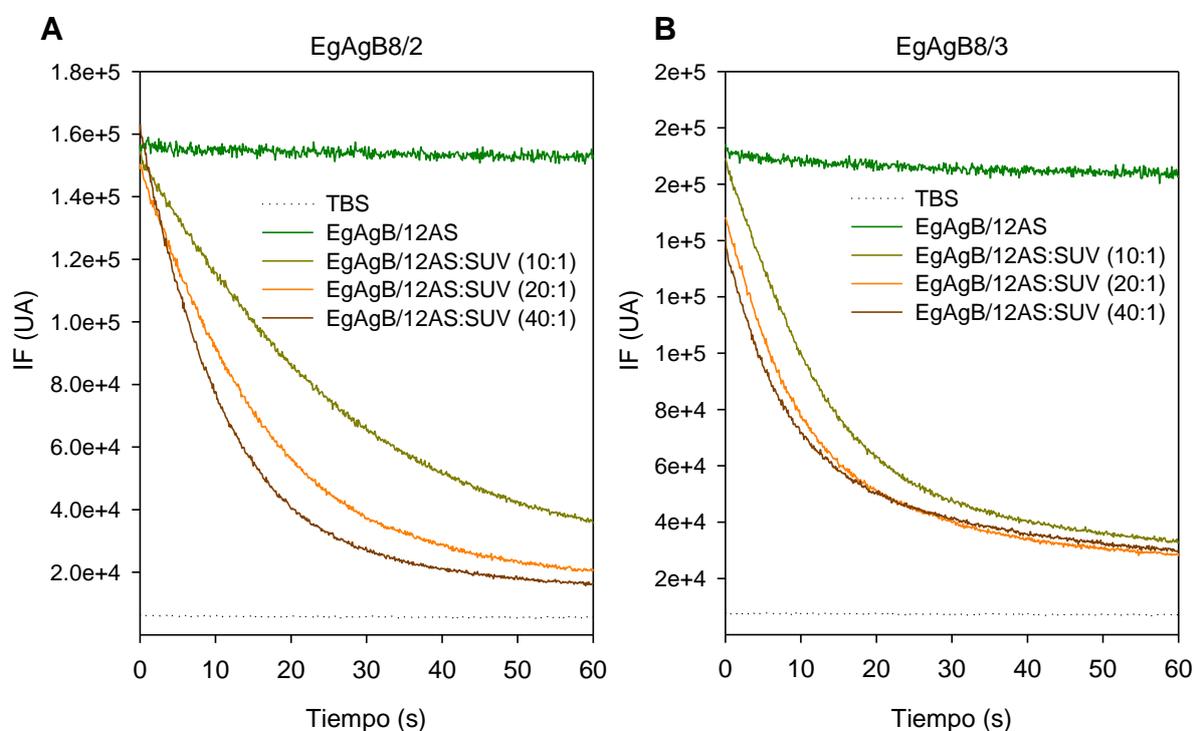
La velocidad de transferencia de ligando desde LBPs hacia vesículas fosfolipídicas es un parámetro que se ha utilizado para caracterizar la forma en que estas proteínas interactúan con las membranas (Storch & Bass, 1990; McDermott et al., 2002; Falomir Lockhart et al., 2009; Porfido et al., 2012). Estos estudios permitieron clasificar a estas proteínas en función del mecanismo por el cual transfieren los ligandos, ya sea a través de un contacto directo con las vesículas o bien por un mecanismo en el que la disociación del ligando es el paso limitante de la transferencia. En el presente trabajo se emplearon estos ensayos como primera aproximación al estudio de la capacidad de las subunidades de EgAgB de transferir ligandos hacia membranas fosfolipídicas.

Para determinar la velocidad de transferencia del ligando 12-AS desde las subunidades de EgAgB8/2 y EgAgB8/3 hacia las SUVs se empleó la técnica de FRET descrita previamente. La determinación de las velocidades de transferencia se logró empleando un módulo de mezclado rápido adosado al espectrofluorómetro, tal como se explicó en la sección Materiales y Métodos (ver ítem 2.4.3). Empleando este sistema, se monitorearon los cambios en el tiempo de la fluorescencia del 12-AS unido a las subunidades EgAgB8/2 o EgAgB8/3 al mezclarse con cantidades crecientes de vesículas, durante un período de 60 segundos. Un esquema de esta estrategia experimental se muestra en la Figura 3.20.



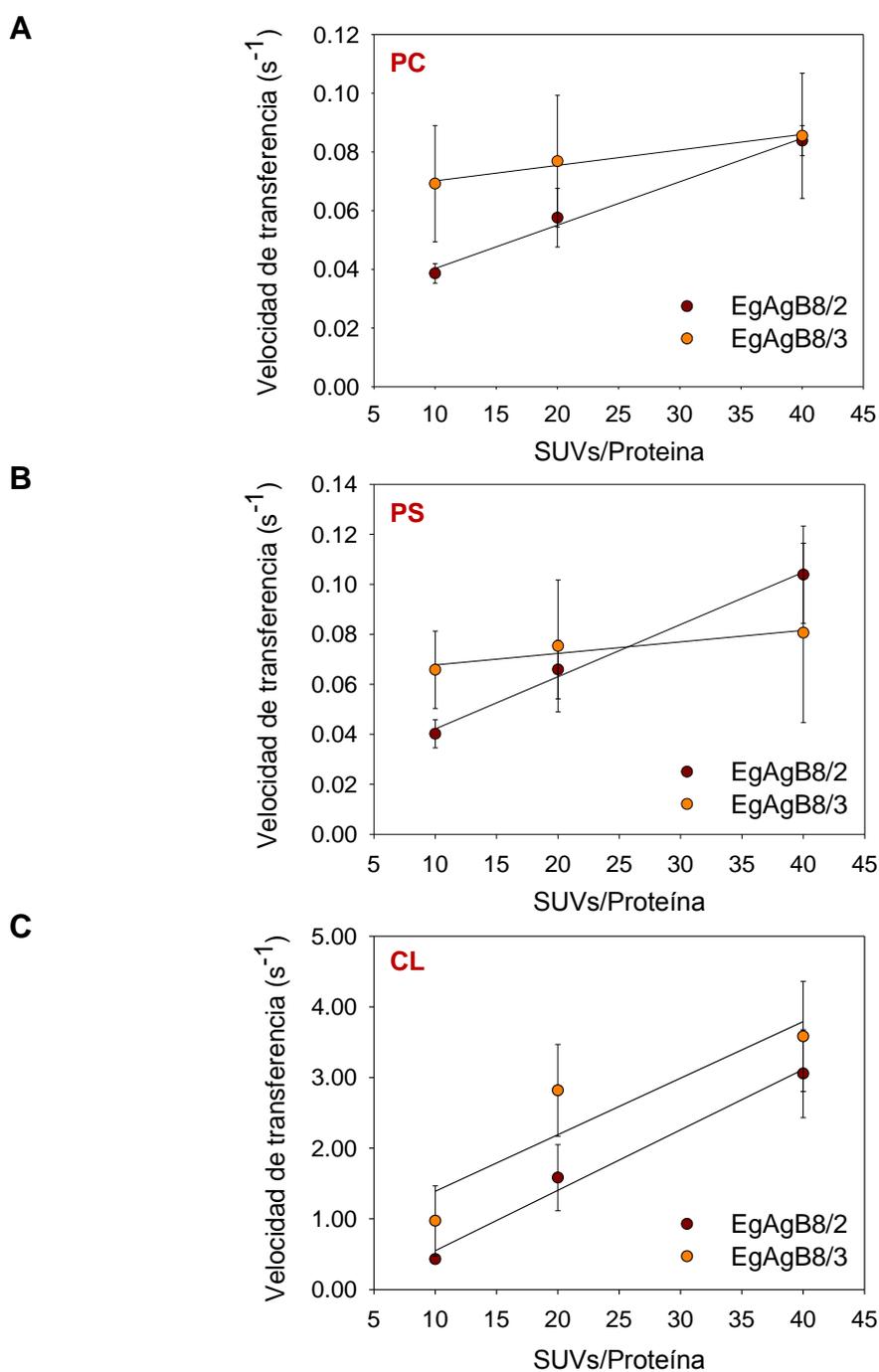
**Figura 3.20. Esquema de la estrategia experimental empleada para determinar la velocidad de transferencia de 12-AS desde EgAgB hacia SUVs mediante FRET.** Se empleó un módulo de mezclado rápido adosado al espectrofluorómetro; una de las jeringas del equipo contiene el complejo EgAgB:12AS (en azul) y la otra contiene las SUVs de NBD-PC (en amarillo). Este equipo permite comenzar la medida de la fluorescencia en el momento exacto en que se realiza la mezcla de ambas jeringas en la cubeta. Cuando el 12-AS se transfiere desde una proteína hacia las SUVs conteniendo NBD, su fluorescencia disminuye debido a que el NBD es un aceptor de FRET del 12-AS, lo que se registra en el tiempo como una curva de decaimiento de fluorescencia, como se muestra en la imagen de la derecha. Para estos experimentos se emplearon concentraciones crecientes de SUVs, así como SUVs con distinta composición fosfolipídica con la finalidad de aumentar la carga neta superficial negativa de las vesículas.

Para asegurar la unidireccionalidad del proceso, se emplearon relaciones molares SUV:Proteína superiores a 10:1. Por ello, la dependencia de la velocidad de transferencia con la concentración de vesículas enfrentadas se midió empleando relaciones SUV:Proteína de 10:1, 20:1 y 40:1. Un ejemplo de las curvas obtenidas en estos ensayos empleando vesículas de PC/NBD-PC se muestra en la Figura 3.21. Como se observa en la figura, para ambas proteínas la fluorescencia del complejo EgAgB:12AS se mantuvo constante durante los 60 segundos de la medida en ausencia de SUVs, mientras que decayó al mezclarse con concentraciones crecientes de SUVs. Como se explicó previamente, esta caída se debe al fenómeno de FRET entre el 12-AS y el grupo NBD presente en las vesículas.



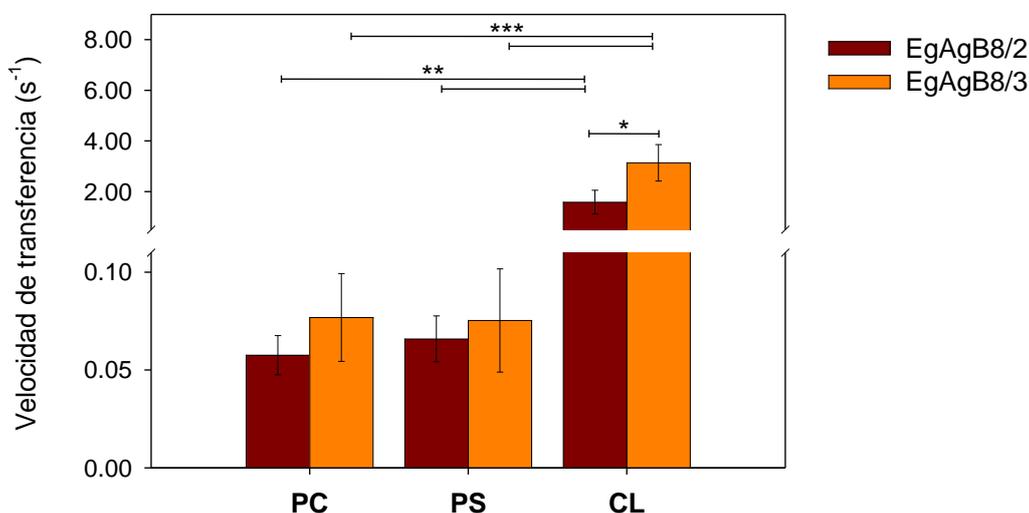
**Figura 3.21. Transferencia de 12-AS desde las subunidades de EgAgB hacia SUVs.** La transferencia de 12-AS desde las subunidades de EgAgB hacia SUVs se siguió registrando la emisión del 12-AS ( $\lambda_{ex} = 383 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 440 \text{ nm}$ ) unido a EgAgB8/2 (**A**) o EgAgB8/3 (**B**) en relación molar proteína:ligando 15:1, tras agregar SUVs de PC/NBD-PC. Los decaimientos de la fluorescencia se monitorearon durante 60 segundos. La línea punteada muestra el control con TBS, mientras que el control de decaimiento de la sonda en el tiempo se muestra en color verde (control de fotoblanqueo). Las otras líneas representan las distintas concentraciones de SUVs empleadas, en relación molar SUV:Proteína 10:1 (amarillo), 20:1 (naranja) y 40:1 (marrón). Las curvas representan el promedio de cinco medidas para cada condición. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. Un análisis similar se realizó empleando vesículas conteniendo 25 % PS o CL.

A partir de las curvas obtenidas registrando la caída de la fluorescencia en el tiempo que se observan en la Figura 3.21, se aplicó la ecuación de decaimiento exponencial descrita en el ítem 2.4.3 (Ecuación 4) para obtener la velocidad de transferencia para cada relación SUV:Proteína. En estos ensayos se emplearon SUVs de PC/NBD-PC, así como también vesículas de PS/NBD-PC y CL/NBD-PC con la finalidad de aumentar la carga neta negativa en la superficie de las vesículas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.22. En el panel A se observan las velocidades de transferencia de ligando obtenidas para las subunidades EgAgB8/2 y EgAgB8/3 empleando vesículas de PC/NBD-PC. En estos ensayos, las velocidades de transferencia aumentaron significativamente ( $p < 0.05$ ) desde  $0.039 \pm 0.003 \text{ s}^{-1}$  a  $0.084 \pm 0.005 \text{ s}^{-1}$  al aumentar la cantidad de SUVs desde 10:1 a 40:1 para la proteína EgAgB8/2. Por el contrario, para la subunidad EgAgB8/3 no se observó un aumento significativo en los valores de velocidad de transferencia obtenidos, dado que en las mismas condiciones estos variaron entre  $0.07 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$  y  $0.08 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ . Un resultado similar se observó al analizar las velocidades de transferencia de ligando hacia vesículas de PS/NBD-PC, como puede observarse en el panel B de la Figura 3.22. En el caso de la subunidad EgAgB8/2, se observó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) desde  $0.040 \pm 0.005 \text{ s}^{-1}$  hasta  $0.10 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ , mientras que la variación para la subunidad EgAgB8/3 fue desde  $0.07 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$  hasta  $0.08 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$ , no representando un cambio estadísticamente significativo. Dado que en el caso de la subunidad EgAgB8/2 se observa que la velocidad de transferencia del ligando depende de la concentración de vesículas empleada para ambos tipos de SUVs, esto podría indicar la existencia de un contacto directo con la membrana para que ocurra la transferencia de ligando. Por el contrario, para la subunidad EgAgB8/3 la velocidad de transferencia no es sensible a la concentración de las vesículas, lo cual indicaría que el choque efectivo entre la proteína y la vesícula podría no ser el paso limitante para que ocurra la transferencia del ligando. Por otro lado, como se observa en el panel C de la Figura 3.22, al analizar las velocidades de transferencia obtenidas para las vesículas de CL/NBD-PC, en ambos casos se observaron aumentos significativos ( $p < 0.05$ ) al aumentar la concentración de SUVs desde 10:1 hasta 40:1, variando entre  $0.43 \pm 0.03 \text{ s}^{-1}$  hasta  $3.1 \pm 0.6 \text{ s}^{-1}$  en el caso de EgAgB8/2, y desde  $1.0 \pm 0.5 \text{ s}^{-1}$  hasta  $3.6 \pm 0.8 \text{ s}^{-1}$  en el caso de EgAgB8/3. Este aumento en la velocidad de transferencia a medida que aumenta la concentración de las vesículas sugiere la existencia de un contacto directo con estas membranas para que ocurra la transferencia de los ácidos grasos desde ambas proteínas hacia las vesículas de CL/NBD-PC.



**Figura 3.22. Velocidades de transferencia de 12-AS desde las subunidades de EgAgB hacia SUVs.** Las velocidades de transferencia de 12-AS desde las subunidades de EgAgB hacia SUVs se obtuvieron mediante el ajuste de los datos de decaimiento exponencial obtenidos al registrar la emisión del 12-AS ( $\lambda_{ex} = 383 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 440 \text{ nm}$ ) unido a EgAgB8/2 o EgAgB8/3 tras el agregado de distintas concentraciones de SUVs (SUV:Proteína 10:1, 20:1 y 40:1). **(A)**, **(B)** y **(C)** Velocidades de transferencia empleando SUVs de PC/NBD-PC, PS/NBD-PC y CL/NBD-PC, respectivamente. Los valores de velocidad de transferencia se expresaron como el promedio  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el análisis ANOVA y el test de Tukey empleando el programa *GraphPad Prism*, los puntos que presentaron diferencias significativas se detallan en el texto.

Al comparar las velocidades de transferencia entre vesículas de distinta composición, se observó que la velocidad aumentó considerablemente al emplear SUVs de CL/NBD-PC, tal como se muestra en la Figura 3.23 para la relación SUV:Proteína 20:1. En el caso de EgAgB8/2, las velocidades de transferencia variaron entre  $0.06 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$  para las SUVs de PC/NBD-PC,  $0.06 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$  para las SUVs de PS-NBD-PC y  $1.6 \pm 0.5 \text{ s}^{-1}$  para las SUVs de CL/NBD-PC. En el caso de EgAgB8/3, las velocidades de transferencia variaron entre  $0.08 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$  para las SUVs de PC-NBD-PC,  $0.07 \pm 0.03 \text{ s}^{-1}$  para las SUVs de PS-NBD-PC y  $2.8 \pm 0.6 \text{ s}^{-1}$  para las SUVs de CL/NBD-PC. En ambos casos la variación entre las SUVs de PC y PS no fue significativa, mientras que se observó un aumento significativo en la velocidad de transferencia cuando se utilizaron las SUVs de CL ( $p < 0.005$  para EgAgB8/2,  $p < 0.0005$  para EgAgB8/3). Este resultado indicaría que las fuerzas electroestáticas podrían tener un rol importante en la interacción entre las subunidades y las vesículas. Asimismo, es interesante destacar que la velocidad de transferencia de 12-AS hacia vesículas ricas en CL fue significativamente mayor en el caso de la proteína EgAgB8/3 ( $p < 0.05$ ). Esto sugiere la existencia de diferencias en la densidad de cargas de ambas subunidades que podrían explicar una cinética más rápida para el EgAgB8/3 en comparación con el EgAgB8/2.



**Figura 3.23. Velocidades de transferencia de 12-AS desde las subunidades de EgAgB hacia SUVs de distinta composición.** Las velocidades de transferencia de 12-AS desde las subunidades de EgAgB hacia SUVs de distinta composición se obtuvieron mediante el ajuste de los datos de decaimiento exponencial obtenidos al registrar la emisión del 12-AS ( $\lambda_{\text{ex}} = 383 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$ ) unido a EgAgB8/2 o EgAgB8/3 tras el agregado de SUVs de PC/NBD-PC (PC), PS/NBD-PC (PS) y CL/NBD-PC (CL) utilizando una relación molar SUV:Proteína de 20:1. Los valores de velocidad de transferencia se expresaron como el promedio  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. Se indican en la figura los datos que presentaron diferencias significativas, mediante el análisis ANOVA, seguido del test de Tukey empleando el programa *GraphPad Prism* (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\* ( $p < 0.0005$ )).

Como se comentó anteriormente, los resultados obtenidos comparando las velocidades de transferencia entre vesículas de distinta composición sugieren que las fuerzas electrostáticas son importantes en el mecanismo de transferencia. Para obtener mayor información acerca de esta contribución se plantearon ensayos de transferencia aumentando la fuerza iónica, pero dado que las subunidades de EgAgB no fueron capaces de unir el 12-AS en estas condiciones, estos ensayos no pudieron realizarse.

En resumen, los resultados presentados en esta sección muestran que las subunidades de EgAgB son potencialmente capaces de transferir ácidos grasos hacia membranas fosfolipídicas. En el caso de la subunidad EgAgB8/2 el paso limitante en la reacción de transferencia sería el contacto directo con la membrana, mientras que para la subunidad EgAgB8/3 el paso limitante podría ser la disociación del ligando de la proteína para luego incorporarse a la membrana. Por otro lado, se encontró que la velocidad de transferencia fue significativamente mayor para las vesículas ricas en CL (doble carga superficial negativa), sugiriendo que las fuerzas electrostáticas podrían tener un rol importante en el mecanismo de transferencia o que podría existir una preferencia particular por las vesículas ricas en CL. Si bien este escenario es muy distinto al que podría ocurrir *in vivo*, tanto en lo relacionado a la estructura de las partículas de EgAgB, como a las membranas con que las mismas podrían interactuar, estos ensayos constituyen una primera aproximación experimental que alienta el desarrollo de estudios más complejos basados tanto en el uso de otros sistemas con vesículas artificiales así como también con células.

### **3.5. Análisis de la capacidad del EgAgB nativo de unirse a monocitos y macrófagos: contribución de los componentes proteicos y lipídicos**

Como se comentó anteriormente, el hecho de que EgAgB es capaz de unir varias clases lipídicas que no pueden ser sintetizadas por el parásito (Obal et al., 2012), hace suponer que el EgAgB podría participar en la adquisición de lípidos desde el hospedador, de forma similar a lo sugerido para otras proteínas miembros de la familia de las HLBP (Lee et al., 2007). Para que esto ocurra, el EgAgB debería interactuar con lipoproteínas y/o con células del hospedador para luego transferir estos lípidos a transportadores en la capa germinativa o eventualmente ser transportado nuevamente hacia el interior del parásito. En este sentido, la interacción del EgAgB con las células del hospedador ha sido previamente reportada, en particular con células del sistema

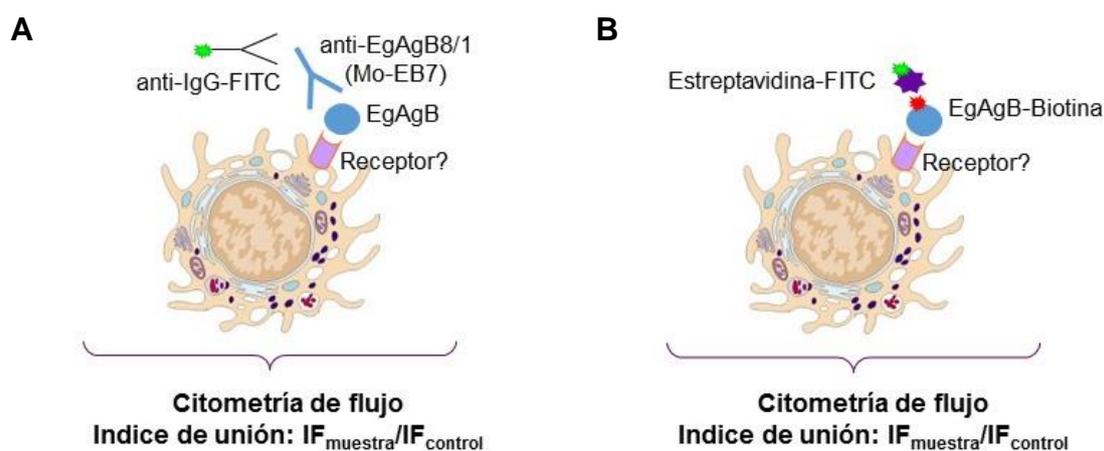
inmune (Siracusano et al., 2008). De hecho, ha sido demostrado que el EgAgB podría ejercer una modulación anti-inflamatoria en estas células. En particular, nuestro grupo de trabajo se ha enfocado en la interacción del EgAgB con monocitos y macrófagos. Estudios preliminares mostraron que el EgAgB nativo (purificado a partir de líquido hidático) es capaz de unirse a estas células y modular la activación inducida por productos derivados de patógenos (Ramos, 2008). Sin embargo, dada las dificultades para deslipidizar el EgAgB nativo, hasta el momento no se evaluó la contribución de sus fracciones lipídica y proteica a la unión a monocitos y macrófagos. La obtención de las subunidades recombinantes del EgAgB libres de lípidos permitió abordar este estudio. Esto es importante porque elucidar que componentes del EgAgB participan en la interacción con los monocitos y los macrófagos permitirá avanzar en el conocimiento de estas interacciones y en los efectos del EgAgB sobre las células mieloides. Así, fue de nuestro interés evaluar la capacidad de las subunidades libres de lípidos de interaccionar con monocitos y macrófagos, así como evaluar la contribución de los lípidos en esta unión, lo cual constituyó el quinto objetivo del presente trabajo. Los resultados obtenidos en relación a este objetivo se describen a continuación.

### 3.5.1. Análisis de la interacción de las subunidades de EgAgB con monocitos y macrófagos

Para analizar la capacidad de las subunidades de EgAgB libres de lípidos de interaccionar con monocitos y macrófagos se empleó un ensayo basado en la técnica de citometría de flujo. Inicialmente se utilizó como modelo monocitos y macrófagos diferenciados a partir de la línea celular humana THP-1, tal como se describió en la sección Materiales y Métodos (ver ítem 2.5.3.1). En primer lugar se ajustó el sistema con el EgAgB nativo para luego realizar el estudio con las subunidades recombinantes.

Para analizar la capacidad de estas células de unir el EgAgB nativo se reprodujeron ensayos ajustados previamente en nuestro laboratorio (Ramos 2008). Las células se incubaron con el EgAgB y para revelar la unión se emplearon como anticuerpos primario y secundario un anticuerpo monoclonal contra la subunidad EgAgB8/1 (Mo-EB7) y un anti-IgG/IgM de ratón conjugado a FITC, respectivamente. Para evitar la posible internalización del EgAgB, todas las incubaciones se realizaron en frío y en presencia de azida de sodio. Además, para evaluar el aporte de fluorescencia por interacciones inespecíficas de los anticuerpos con las células tratadas con el EgAgB, se realizaron controles en los cuales se utilizó la mayor concentración de EgAgB en la incubación y

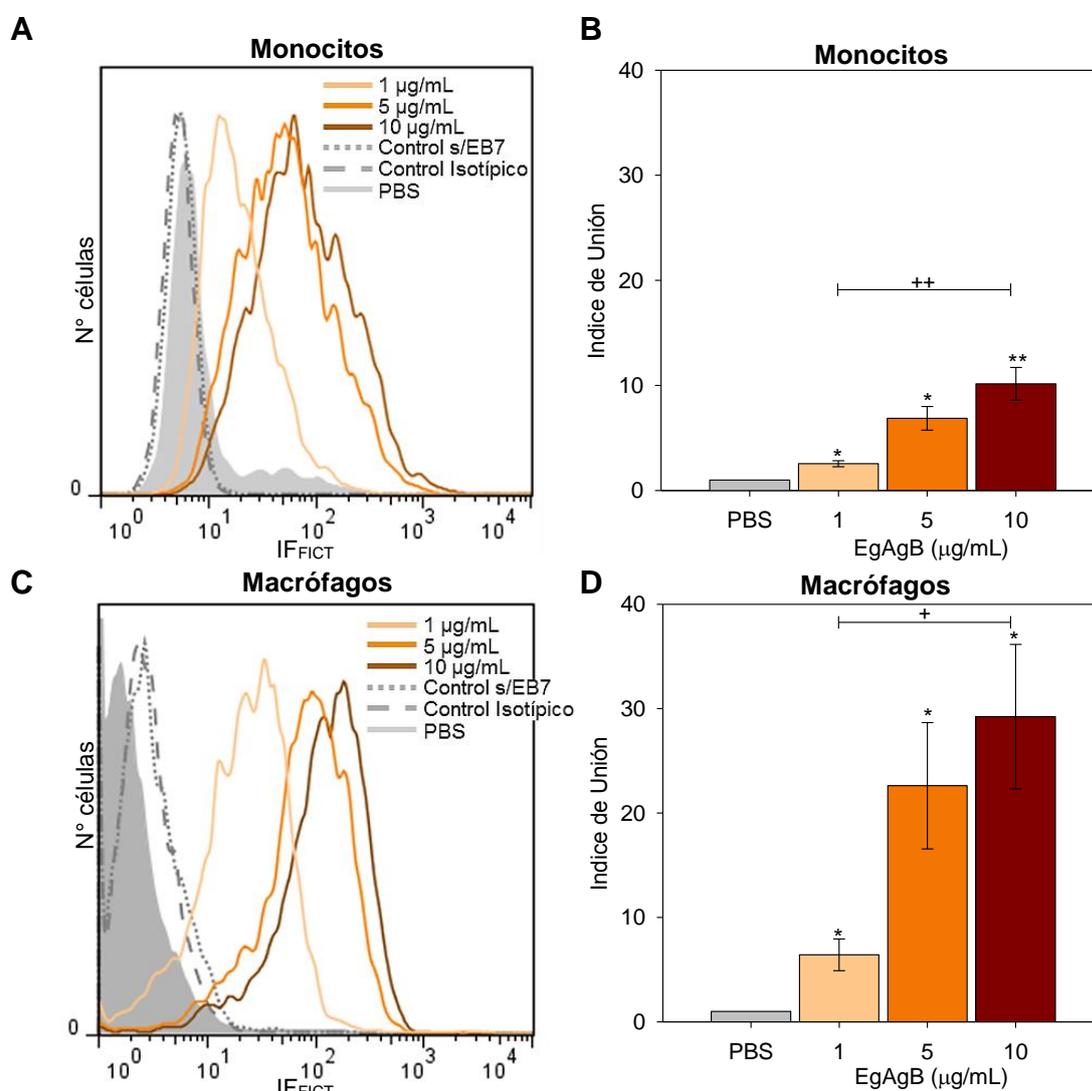
no se adicionó el anticuerpo primario o se utilizó un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo y especie que el Mo-EB7 (IgG1 de ratón, isotipo control). El índice de unión se determinó como el cociente de la intensidad de fluorescencia detectada en las células incubadas con el EgAgB sobre la intensidad de fluorescencia de las células control (incubadas con PBS en lugar del EgAgB). Un esquema de la estrategia experimental empleada para este análisis se muestra en el panel A de la Figura 3.24.



**Figura 3.24. Esquema de la estrategia experimental para analizar la unión del EgAgB nativo y de las subunidades de EgAgB a los monocitos y macrófagos. (A)** La unión del EgAgB nativo y el EgAgB8/1 a las células se monitoreó empleando un anticuerpo monoclonal anti EgAgB8/1 (Mo-EB7), el revelado se realizó empleando un anticuerpo anti-IgG conjugado a FITC. **(B)** La unión de las subunidades EgAgB8/2 y EgAgB8/3 a las células se monitoreó empleando las subunidades marcadas con biotina, el revelado se realizó empleando estreptavidina conjugada a FITC. En ambos casos los resultados se expresaron como índice de unión, determinado como el cociente de la intensidad de fluorescencia detectada en las células incubadas con el EgAgB sobre la intensidad de fluorescencia de las células control.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.25, donde se observa que el EgAgB nativo se unió a monocitos y macrófagos de la línea celular THP-1. En el panel A de la figura se muestra a través de un histograma la distribución de la población de monocitos THP-1 de acuerdo a su fluorescencia. Se observó un aumento de la fluorescencia de las células incubadas con concentraciones crecientes de EgAgB; mientras que no se observó aumento de fluorescencia en todos los controles realizados (control con PBS y controles de las interacciones inespecíficas de los anticuerpos). Los resultados obtenidos para cuatro experimentos independientes se representan en el gráfico de barras del panel B, donde se observa un aumento significativo en el índice de unión del EgAgB nativo, que mostró dependencia con la dosis utilizada en estos ensayos. Resultados similares fueron obtenidos para el caso de los macrófagos THP-1, como se ilustra en los paneles C y D de la Figura 3.25. Estos resultados indican que el

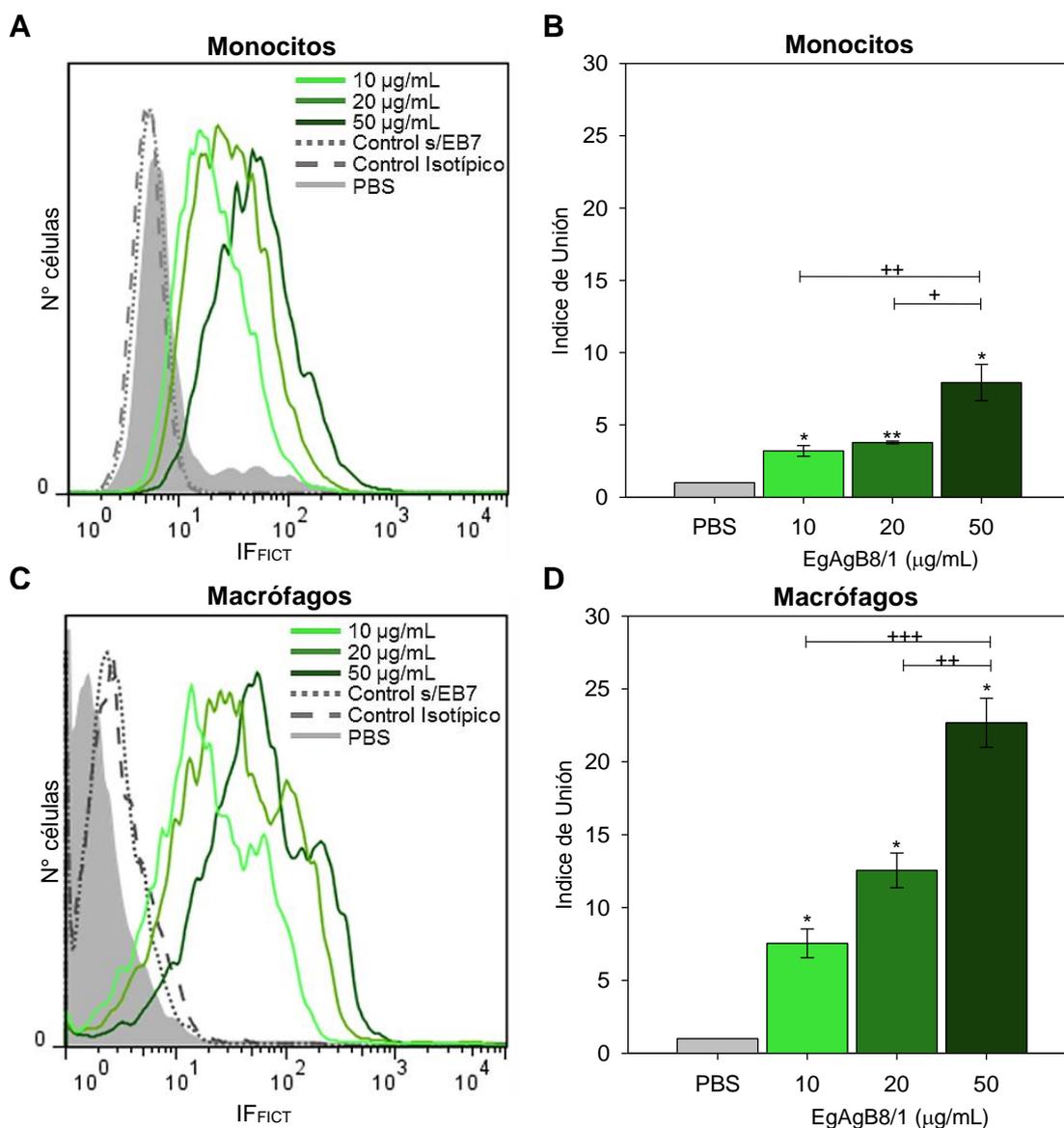
EgAgB nativo es capaz de unirse a los monocitos y los macrófagos THP-1 de forma dependiente de la dosis, confirmando los datos previamente obtenidos (Ramos, 2008).



**Figura 3.25. Unión de EgAgB nativo a monocitos y macrófagos THP-1.** Para analizar la unión de EgAgB nativo a monocitos y macrófagos THP-1 las células fueron incubadas con cantidades crecientes de EgAgB (1, 5 y 10 µg/mL) y el revelado de la unión se llevó a cabo empleando un anticuerpo monoclonal anti-EgAgB8/1 (Mo-EB7) seguido de un anticuerpo anti-IgG/IgM conjugado a FITC. Como control las células fueron tratadas con PBS (PBS), con un anticuerpo IgG1 kappa de ratón como isotipo control para el Mo-EB7 (Control Isotípico) o con EgAgB sin agregado de Mo-EB7 (Control s/EB7); en todos los casos seguido del anticuerpo anti-IgG/IgM-FITC. **(A)** y **(C)** Histogramas o distribución de la población celular en función de la fluorescencia de FITC emitida, para monocitos y macrófagos THP-1. Se muestran en gris las células control y en color naranja las células tratadas con EgAgB nativo. Los histogramas son representativos de cuatro experimentos independientes para cada tipo celular. **(B)** y **(D)** Índice de unión de EgAgB nativo para monocitos y macrófagos THP-1. Este índice se calculó como el cociente entre la intensidad de fluorescencia de cada muestra sobre la intensidad de fluorescencia del control con PBS (índice de unión PBS = 1). Los datos se expresaron como el promedio ± SEM de cuatro experimentos independientes. Se indican con \* los datos que mostraron diferencias significativas con el control de PBS analizados mediante el test t, y con + los datos que presentaron diferencias significativas entre sí analizados mediante ANOVA, seguidos del test de Tukey. Este análisis se realizó empleando el programa *GraphPad Prism*. (\*, + p < 0.05; \*\*, ++ p < 0.005).

Estos resultados sugieren la presencia de uno o más receptores capaces de reconocer al EgAgB en los monocitos y macrófagos. Por otro lado, al comparar la unión del EgAgB a los monocitos y macrófagos, se observa que el índice de unión fue mayor en el caso de los macrófagos, para todas las concentraciones de EgAgB utilizadas, sugiriendo que el EgAgB nativo presenta una mayor interacción con los macrófagos. Esto podría deberse tanto a una mayor expresión del/los receptor(es) que interactúa(n) con el EgAgB o a la expresión de receptores diferentes en los macrófagos

Para analizar la contribución a la unión a monocitos y macrófagos de los componentes proteico y lipídico del EgAgB se realizó el mismo ensayo de unión empleando en primer lugar la subunidad EgAgB8/1 libre de lípidos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.26. En este caso también se produjo un aumento de la fluorescencia de las células al ser incubadas con concentraciones crecientes de EgAgB8/1, mientras que en los controles no hubo aumento de fluorescencia (ver histogramas de los paneles A y C de la figura). Los datos obtenidos a partir de tres experimentos independientes se representan en el gráfico de barras de los paneles B y D, donde se observa un aumento significativo y dependiente de la dosis en el índice de unión del EgAgB8/1 tanto para los monocitos, como para los macrófagos THP-1. Estos datos indicarían que la subunidad EgAgB8/1 libre de lípidos es capaz de unirse directamente a ambos tipos celulares, sugiriendo que la porción proteica puede contribuir a la unión del EgAgB nativo a dichas células. En este caso también se observó una mayor unión a los macrófagos en comparación con los monocitos, de forma similar a lo observado para el EgAgB nativo. Sin embargo, el EgAgB nativo parecería unirse con mayor afinidad que el EgAgB8/1, ya que fue necesario emplear mayores concentraciones de EgAgB8/1 para evidenciar la unión. Esto puede tener múltiples explicaciones, incluyendo el hecho de que el EgAgB expone probablemente un número mayor de sitios para la unión (al menos se estiman del orden de la decena de subunidades por partícula) que los presentes en las subunidades recombinantes deslipidizadas (oligómeros de entre 7 u 8 subunidades en el caso de EgAgB8/1, según lo reportado previamente en este trabajo). Además no puede descartarse que la afinidad de los receptores celulares por las otras subunidades del EgAgB sea mayor y/o que la presencia de los lípidos favorezca la interacción. Así, para profundizar este análisis, se evaluó la capacidad de unión de las subunidades EgAgB8/2 y EgAgB8/3 libres de lípidos, y posteriormente se analizó la participación de la fosfatidilcolina en la interacción, como se comentará más adelante en esta sección.

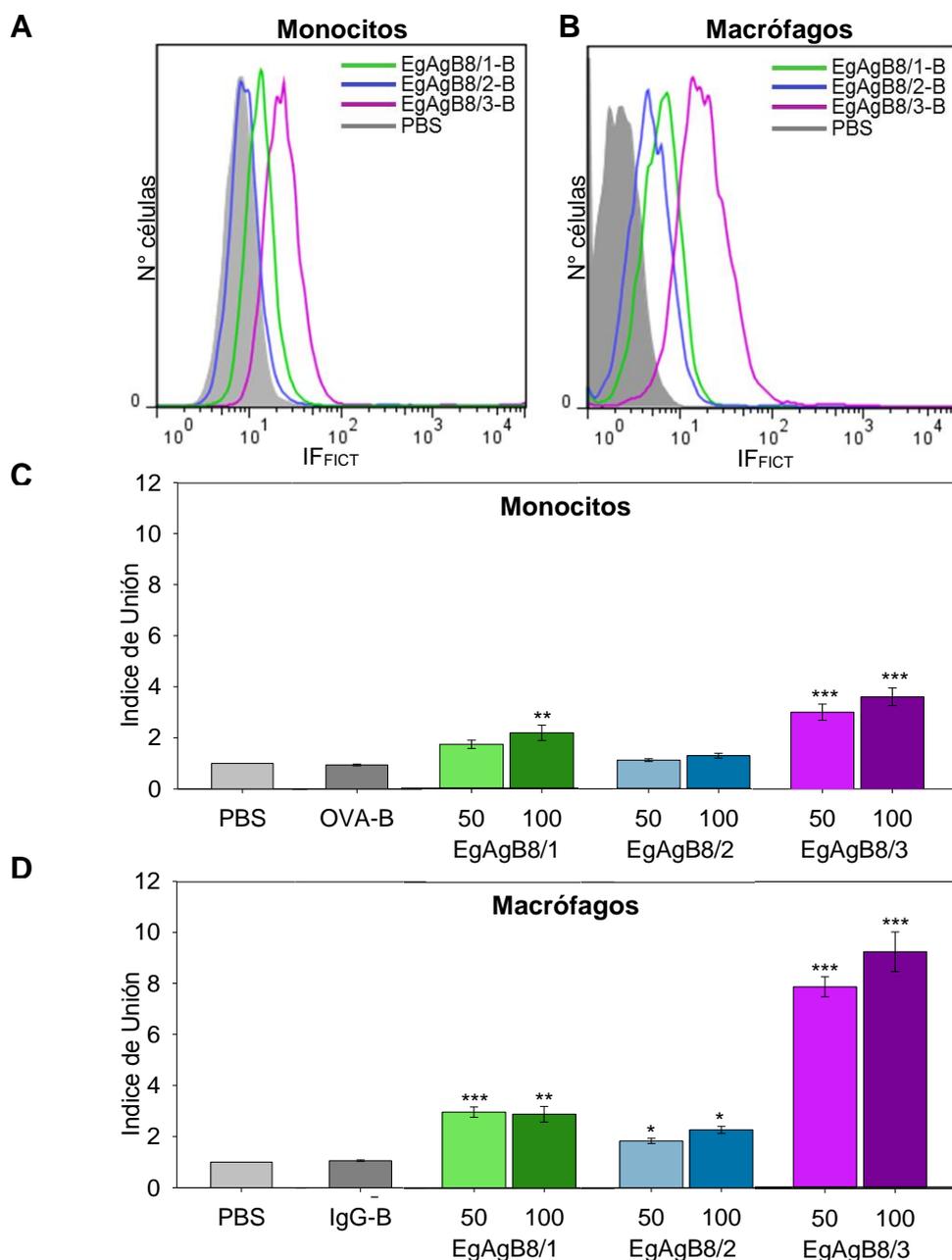


**Figura 3.26. Unión de la subunidad EgAgB8/1 a monocitos y macrófagos THP-1.** La unión de EgAgB8/1 a monocitos y macrófagos THP-1 fue analizada empleando cantidades crecientes de EgAgB8/1 (10, 20 y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y revelada como se describió en la Figura 3.25, empleando los mismos controles. **(A)** y **(C)** Histogramas obtenidos para monocitos y macrófagos THP-1. Se muestran en gris las células control y en color verde las células tratadas con EgAgB8/1. Los histogramas son representativos de tres experimentos independientes para cada tipo celular. **(B)** y **(D)** Índice de unión de EgAgB8/1 para monocitos y macrófagos THP-1, expresados como el promedio  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. Se indican con \* los datos que mostraron diferencias significativas con el control analizados mediante el test t, y con + los datos que presentaron diferencias significativas entre sí analizados mediante ANOVA, seguido del test de Tukey. El análisis estadístico se realizó empleando el programa *GraphPad Prism* (\*, +  $p < 0.05$ ; \*\*, ++  $p < 0.005$ , +++  $p < 0.0005$ ).

Para analizar la capacidad de las subunidades EgAgB8/2 y EgAgB8/3 a los monocitos y macrófagos, dado que no se contaba con anticuerpos monoclonales contra estas subunidades para emplear la misma estrategia que la descrita anteriormente, se utilizaron las subunidades marcadas con botina, tal como se describió en la sección

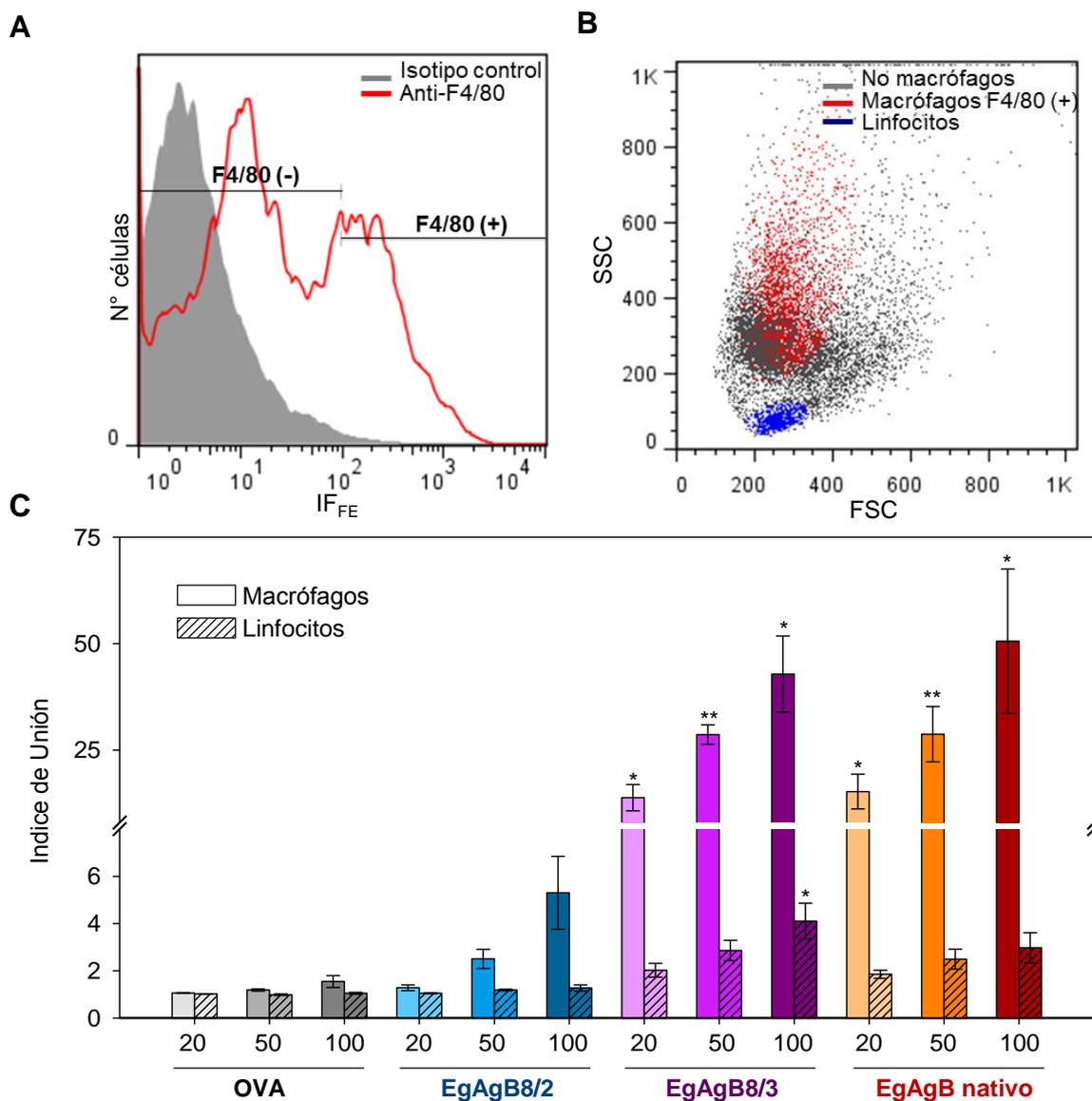
Materiales y Métodos (ver ítem 2.5.3.2). El revelado de la unión en este caso se realizó empleando estreptavidina conjugada a FITC. Un esquema de esta estrategia experimental se muestra en el panel B de la Figura 3.24. De forma comparativa también se marcó la subunidad EgAgB8/1. Los resultados obtenidos para estas subunidades se muestran en la Figura 3.27. En los paneles A y B de la figura se observan los histogramas obtenidos para los monocitos y macrófagos al emplear las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 marcadas con biotina. Como se puede observar, utilizando esta metodología también se observó la unión de la subunidad EgAgB8/1 libre de lípidos a ambos tipos celulares y se encontró que la subunidad EgAgB8/3 libre de lípidos también es capaz de unirse tanto a los monocitos como macrófagos THP-1, dado que las poblaciones celulares presentaron mayor fluorescencia que el control con PBS. Por otro lado, la unión de la subunidad EgAgB8/2 a ambos tipos celulares fue menor comparativamente con la unión de EgAgB8/1 y EgAgB8/3. Como se observa en el panel C al analizar los índices de unión a los monocitos de las tres subunidades, el EgAgB8/1 y EgAgB8/3 presentaron una unión significativamente mayor que la proteína ovoalbúmina (OVA) marcada con biotina empleada como control. Por otro lado, el índice de unión del EgAgB8/2 no presentó diferencias significativas respecto al índice de unión de la OVA. En el panel D se observa que el índice de unión de las tres subunidades a macrófagos fue significativamente mayor que el que presentó la IgG marcada con biotina empleada como control en estos ensayos. Cabe mencionar que en este caso, el índice de unión de la proteína EgAgB8/2 fue menor que el de EgAgB8/1 y EgAgB8/3. En conjunto los resultados indican que principalmente las subunidades EgAgB8/1 y EgAgB8/3, y en menor grado la subunidad EgAgB8/2, son reconocidas por éstas células. Esto estaría de acuerdo con el hecho de que las subunidades EgAgB8/1 y EgAgB8/3 son más parecidas entre sí, que con la subunidad EgAgB8/2 (ver Figura 1.12). No se puede descartar que la unión de biotina pueda haber alterado las propiedades de unión de la subunidad EgAgB8/2, disminuyendo su unión a las células. En este sentido, cabe mencionar que estos resultados se reprodujeron con varios conjugados de EgAgB8/2 con biotina preparados en forma independiente y en paralelo con los correspondientes del EgAgB8/1 y EgAgB8/3. Además, se utilizó una relación molar de biotina igual para todas las subunidades, lo cual hace improbable que los mismos residuos se vieron afectados por la unión de la biotina en diferentes preparaciones. Por otro lado, es interesante destacar que la unión de la subunidad EgAgB8/3 también fue significativamente mayor que la de la subunidad EgAgB8/1 para las dos concentraciones ensayadas, en ambos tipos celulares. Asimismo, en todos los casos, nuevamente se encontró que la unión a los macrófagos fue mayor que la unión

a los monocitos, como se puede observar al comparar las barras de los gráficos en los paneles C y D de la Figura 3.27.



**Figura 3.27. Unión de la subunidades de EgAgB a monocitos y macrófagos THP-1.** La unión de EgAgB8/1 (verde), EgAgB8/2 (celeste) y EgAgB8/3 (violeta) marcadas con biotina (50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) se reveló empleando estreptavidina-FITC. **(A)** y **(B)** Histogramas obtenidos para monocitos y macrófagos THP-1, se muestran los datos para 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . **(C)** y **(D)** Índice de unión de las subunidades de EgAgB para monocitos y macrófagos THP-1, expresados como el promedio  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. Se indican los datos que presentaron diferencias significativas, con los controles de OVA e IgG marcadas con biotina (OVA-B, IgG-B) para monocitos y macrófagos, respectivamente. Los datos fueron analizados mediante ANOVA seguido del test de Dunnett para la comparación con el control, empleando el programa *GraphPad Prism* (\*  $p < 0.05$ ); \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\* ( $p < 0.0005$ ).

Para profundizar el análisis de la unión de las distintas subunidades libres de lípidos a los monocitos y macrófagos, se realizaron ensayos empleando células primarias de ratón obtenidas de un infiltrado inflamatorio, tal como se describió la sección Materiales y Métodos (ver ítem 2.5.3.3). Además del hecho de emplear células primarias en lugar de una línea celular, este análisis permite comparar la unión del EgAgB a diferentes tipos de células inflamatorias, ya que además de monocitos y macrófagos, mediante este método también se obtienen otros tipos celulares como neutrófilos, eosinófilos, basófilos y linfocitos. En estos ensayos se empleó el EgAgB nativo, así como también las subunidades EgAgB8/2 y EgAgB8/3, todos marcados con biotina. Como control se empleó la proteína OVA marcada con biotina en las mismas condiciones. Entre las células inflamatorias obtenidas mediante lavado peritoneal, se analizó la unión de estas proteínas a los macrófagos y a los linfocitos. Como se observa en los paneles A y B de la Figura 3.28, los macrófagos fueron seleccionados de acuerdo a la expresión en membrana de la proteína F4/80 específica de macrófagos (Gordon et al., 2011), mediante tinción con un anticuerpo anti-F4/80 de ratón; mientras que los linfocitos fueron seleccionados a partir del gráfico de puntos de acuerdo a sus valores de dispersión lateral (SSC) y dispersión frontal (FSC), dentro de la población F4/80 negativa. Los resultados obtenidos para el análisis de la unión de las subunidades de EgAgB y del EgAgB nativo a estos macrófagos y linfocitos, se observa en el panel C de la Figura 3.28. Como se observa en la figura, el EgAgB nativo y la subunidad EgAgB8/3 libre de lípidos fueron capaces de unirse a los macrófagos inflamatorios murinos, ya que se determinó que su índice de unión fue significativamente mayor al de la proteína OVA empleada como control. En el caso de EgAgB8/2; si bien se observó una tendencia hacia valores en el índice de unión mayores que los obtenidos para el control, el análisis estadístico no demostró que este aumento fuera significativo. En cuanto a la unión a los linfocitos, se observó un aumento significativo en el índice de unión a la máxima concentración de EgAgB8/3 respecto a la OVA a la misma concentración, sin embargo al comparar este aumento con el que se produjo en el caso de los macrófagos, se puede observar que para los macrófagos el aumento fue aproximadamente diez veces superior al que se produjo para los linfocitos. Estos resultados apoyan los resultados obtenidos empleando los monocitos y macrófagos de la línea celular THP-1 y sugieren que el EgAgB nativo y la subunidad EgAgB8/3 libre de lípidos son capaces de unirse de forma preferencial a los macrófagos, y que podrían existir diferencias en la capacidad de diferentes subunidades del EgAgB de interactuar con las células del hospedero.



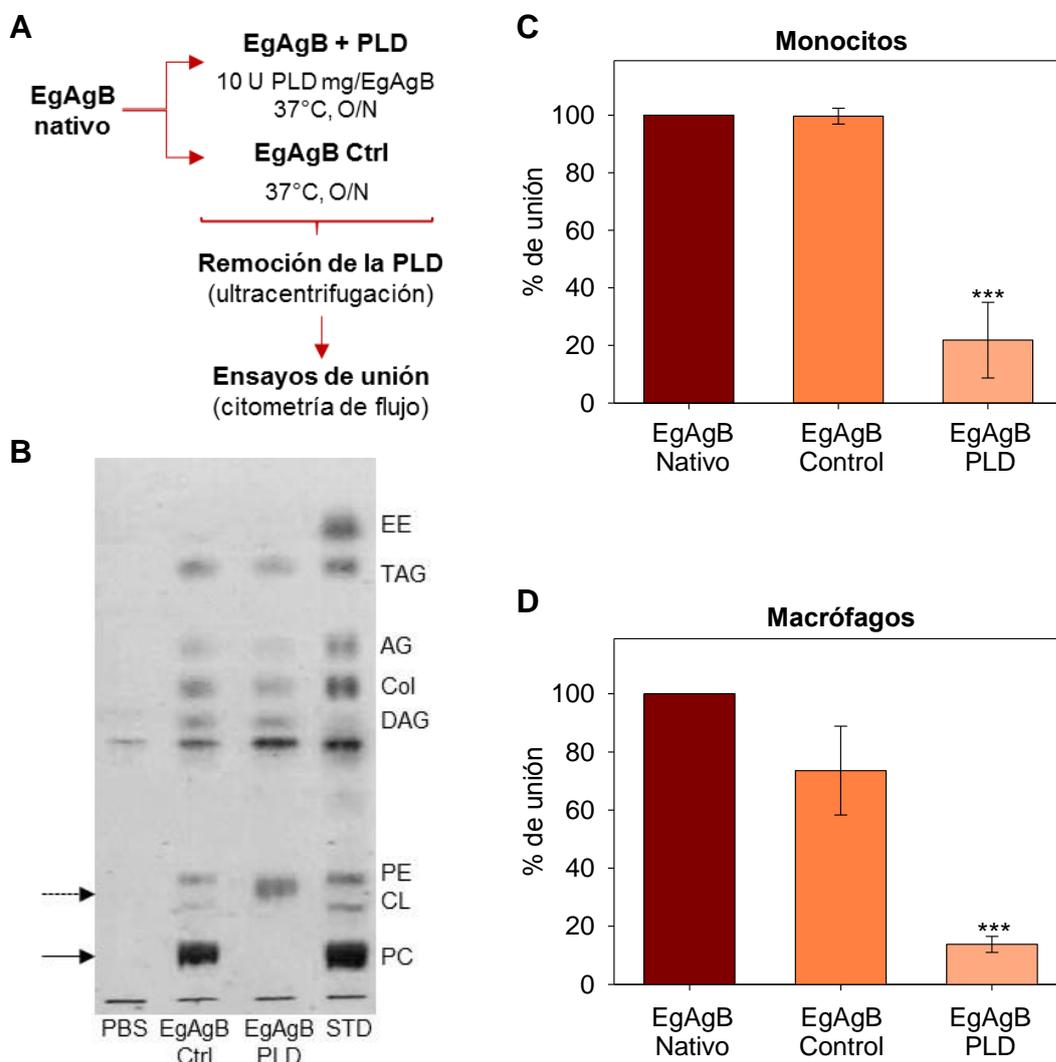
**Figura 3.28. Unión de la subunidades de EgAgB a células inflamatorias de ratón.** La unión de las subunidades de EgAgB y del EgAgB nativo a células inflamatorias de ratón se evaluó empleando células recuperadas de un infiltrado inflamatorio peritoneal. Los macrófagos se seleccionaron mediante tinción con un anticuerpo anti-F4/80 conjugado a ficoeritrina (FE). **(A)** Histograma de la población celular en función de la fluorescencia de FE. Las células F4/80 negativas (-) se tomaron de acuerdo con la emisión de fluorescencia producida por la incubación con un anticuerpo IgG2a kappa de ratón conjugado a FE empleado como isotipo control (gris). En rojo se muestra el histograma obtenido empleando el anti-F4/80-FE, se consideraron las células F4/80 positivas (+), como aquellas que presentaron fluorescencia mayor a la del isotipo control. **(B)** Gráfico de puntos SSC vs FSC dónde se indican en rojo las células correspondientes a macrófagos (F4/80 (+)) y en azul los linfocitos. **(C)** Se representa la unión de OVA (gris), EgAgB8/2 (celeste), EgAgB8/3 (violeta) y EgAgB nativo (naranja) a macrófagos (barras sin relleno) y a linfocitos (barras con líneas en diagonal). Se emplearon las proteínas marcadas con biotina a 20, 50 y 100 µg/mL, la unión se reveló empleando estreptavidina-FITC. El índice de unión se calculó como fue descrito previamente y fue expresado como el promedio  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes, salvo en el caso de EgAgB nativo a 20 y 50 µg/mL que corresponden a dos experimentos independientes. Se indican los datos que presentaron diferencias significativas respecto a OVA para cada concentración, analizados mediante ANOVA seguido del test de Dunnett, empleando el programa *GraphPad Prism* (\*  $p < 0.05$ ; \*\* ( $p < 0.005$ )).

### 3.5.2. Análisis de la contribución de la fosfatidilcolina presente en el EgAgB nativo en la interacción con monocitos y macrófagos THP-1

En el ítem anterior se describió la unión del EgAgB nativo, así como también de algunas de las subunidades libres de lípidos a monocitos y macrófagos. Concretamente se determinó que principalmente las subunidades deslipidizadas EgAgB8/1 y EgAgB8/3, pueden ser reconocidas por éstas células, lo cual sugiere que las subunidades proteicas median la interacción de la partícula nativa con las células. Sin embargo, dado que el EgAgB nativo es una molécula compleja con un alto porcentaje de lípidos, es probable que no solo las subunidades proteicas, sino también los lípidos polares como la fosfatidilcolina (PC) se ubiquen superficialmente, y puedan participar en la interacción con estas células. Por esa razón, nos interesó analizar el papel de la PC en la interacción del EgAgB nativo con monocitos y macrófagos. Para iniciar este análisis el EgAgB nativo fue tratado con fosfolipasa D (PLD), enzima que hidroliza la PC, dejando en su lugar al ácido fosfatídico y liberando el grupo colina, cambio que modificaría sustancialmente la cabeza polar de la PC expuesta en el EgAgB. Posteriormente, el EgAgB tratado con PLD (EgAgB-PLD) fue purificado por ultracentrifugación para eliminar la PLD y la colina y evitar interferencias en estos ensayos. Como control de este procedimiento a una fracción de EgAgB se le aplicó el mismo tratamiento sin agregado de PLD (EgAgB control). Un esquema de la estrategia experimental utilizada se muestra en el panel A de la Figura 3.29.

Para verificar la efectividad del tratamiento, se realizó una extracción lipídica del EgAgB-PLD y del EgAgB control y las fracciones lipídicas obtenidas se analizaron mediante TLC, tal como se explicó en la sección Materiales y Métodos (ver ítem 2.5.2.2). En el panel B se muestran los resultados obtenidos mediante este análisis, donde se observa que el tratamiento con PLD resultó efectivo, dado que desapareció la banda correspondiente a PC en la fracción lipídica del EgAgB-PLD y no en su control. Más aún el perfil de bandas correspondientes a todos los fosfolípidos muestra alteración, con la aparición de una nueva banda que migra más que la PC, y que podría corresponder al ácido fosfatídico. Por tanto el tratamiento con PLD permitió obtener una partícula de EgAgB con modificaciones en sus fosfolípidos, principalmente con la desaparición de la PC, que por tanto resulta útil para analizar su contribución a la unión a monocitos y macrófagos. Para analizar la capacidad de unión del EgAgB-PLD a los monocitos y macrófagos de la línea THP-1 y compararla con el EgAgB control, se realizaron ensayos

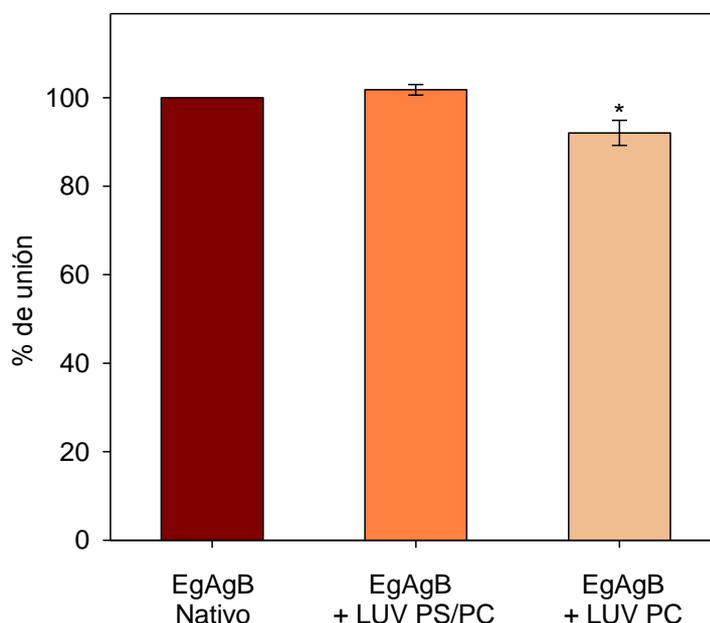
de unión utilizando el anticuerpo Mo-EB7 seguido del conjugado anti-IgG/IgM-FICT para el revelado (ver ítem 2.5.4.1), como se muestra en los paneles C y D de la Figura 3.29.



**Figura 3.29. Análisis de la contribución de la PC en la unión del EgAgB a monocitos y macrófagos THP-1.** (A) Esquema de la estrategia experimental utilizada para este análisis. El EgAgB nativo se dividió en dos fracciones, una de ellas fue sometida a tratamiento con PLD (EgAgB-PLD), mientras que a la otra se le aplicó el mismo tratamiento sin agregado de PLD (EgAgB Control). La PLD fue eliminada por ultracentrifugación y la capacidad de ambas muestras de unirse a monocitos y macrófagos se realizó mediante citometría de flujo, como fue descrito previamente. (B) Las fracciones lipídicas del EgAgB Control y del EgAgB-PLD fueron analizadas mediante TLC de doble desarrollo y reveladas mediante tinción con vapores de yodo. Como control se realizó el mismo procedimiento para la solución de PBS en la que se obtuvo el EgAgB nativo. Las especies lipídicas se identificaron por comparación con un estándar corrido en paralelo (STD), como fue descrito en la Figura 3.7. Se indica con una flecha llena la banda correspondiente a PC y con una flecha punteada la banda que podría corresponder al ácido fosfatídico. (C) y (D) Unión del EgAgB-PLD y el EgAgB control (10  $\mu$ g/mL) a monocitos y macrófagos THP-1, respectivamente. Esta unión se reveló empleando el anticuerpo Mo-EB7 seguido del anticuerpo anti-IgG/IgM-FITC. Los resultados se expresaron como porcentaje de unión tomando como 100% la unión del EgAgB nativo sin ningún tratamiento. Los datos corresponden al promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  SEM. Se indican los datos que presentaron diferencias significativas respecto al EgAgB nativo, analizados mediante ANOVA seguido del test de Dunnett, empleando el programa *GraphPad Prism* (\*\*\*)  $p < 0.0005$ .

Los resultados obtenidos al analizar la unión del EgAgB-PLD y el EgAgB control se expresaron como porcentaje de unión tomando como 100% la unión del EgAgB nativo sin ningún tratamiento. Como se observa en los paneles C y D de la Figura 3.29, tanto en monocitos, como en macrófagos, la unión del EgAgB control no varió respecto a la unión del EgAgB nativo sin tratamiento, mientras que la unión del EgAgB-PLD fue significativamente menor. Este resultado sugiere que de algún modo la PC influye en la unión del EgAgB a estas células. Esto puede deberse tanto a una participación directa de la PC en la unión o a una participación indirecta, en donde la PC modifique la forma en la que se exponen las subunidades de EgAgB en la partícula nativa afectando la capacidad de unión del EgAgB a estas células.

Finalmente, para complementar los estudios del papel de la PC en la interacción del EgAgB con las células se realizaron ensayos de competencia con vesículas unilamelares grandes (LUVs) compuestas por PC o PC/PS (50:50 molar), tal como se describió en el sección Materiales y Métodos (ver ítem 2.5.4.2). En estos ensayos se emplearon monocitos THP-1 que fueron pre-incubados con las vesículas y posteriormente tratados con EgAgB nativo marcado con biotina, revelando la unión con estreptavidina-FITC. Los resultados se expresaron como porcentaje de unión tomando como 100% la unión del EgAgB nativo a las células pre-incubadas con PBS como control. Como se muestra en la Figura 3.30, el porcentaje de unión de EgAgB a las células pre-incubadas con LUVs de PC mostró una leve disminución significativa respecto a la unión a las células tratadas con LUVs de PC/PS. Este resultado muestra que las LUVs de PC no lograron inhibir en forma notoria la interacción del EgAgB con las células. Esta leve inhibición (~ 10%) contrasta con la reducida capacidad de unión del EgAgB tratado con PLD (80% menos que el control), sugiriendo que posiblemente la inhibición en la unión a las células que se observó en el caso del EgAgB tratado con PLD se deba mayormente a la participación de la PC en la exposición de las distintas subunidades de EgAgB en la partícula nativa, más que a una interacción directa de la PC con las células, dado que la inhibición de la unión en el caso de EgAgB-PLD fue mucho mayor que la observada mediante competencia con las vesículas de PC.

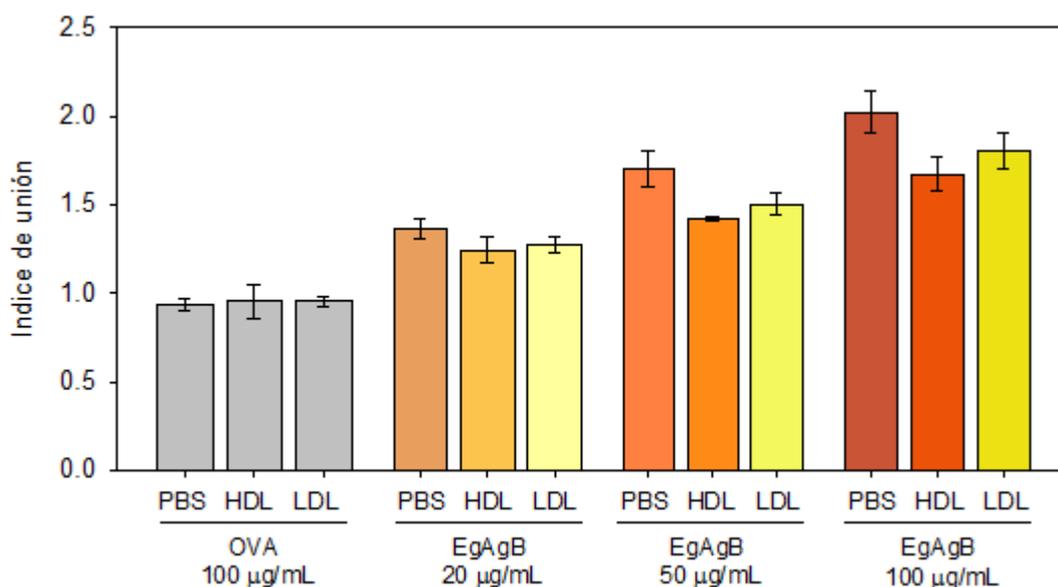


**Figura 3.30. Competencia por la unión a monocitos THP-1 con LUVs de PC y PC/PS.** La unión de EgAgB nativo marcado con biotina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a monocitos THP-1 pre-incubados con LUVs de PC o PC/PS (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) fue revelada empleando estreptavidina-FITC. Los resultados se expresaron como porcentaje de unión tomando como 100% la unión del EgAgB nativo a monocitos pre-incubados con PBS como control. Los datos corresponden al promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  SEM. Se indican los datos que presentaron diferencias significativas en comparación con el control en ausencia de LUVs, analizados empleando ANOVA seguido del test de Dunnett, empleando el programa *GraphPad Prism* (\*  $p < 0.05$ ).

### 3.5.3. Ensayos de competencia empleando lipoproteínas plasmáticas

Los resultados descriptos hasta el momento en relación a la unión de EgAgB a monocitos y macrófagos sugieren la existencia de receptores en estas células capaces de reconocer al EgAgB. Este reconocimiento parecería estar dado a través de algunas subunidades de EgAgB, aunque los lípidos, en particular los fosfolípidos como la PC, tendrían un papel importante en la interacción, por lo menos en relación a la forma en que se arma la partícula nativa para exponer estas subunidades. Dado que el EgAgB nativo podría adoptar una estructura similar a la de las lipoproteínas plasmáticas y que las subunidades de EgAgB comparten motivos moleculares con algunas apolipoproteínas que son reconocidas por distintos receptores de lipoproteínas plasmáticas, es posible pensar que el EgAgB sea reconocido este tipo de receptores. Con el fin de evaluar esta posibilidad se realizaron ensayos de competencia empleando HDL y LDL. Estas lipoproteínas se purificaron a partir de plasma humano, tal como fue descrito en la sección Materiales y Métodos (ver ítem 2.5.2.4). En estos ensayos las

células fueron pre-incubadas con las lipoproteínas y posteriormente fueron tratadas con concentraciones crecientes de EgAgB nativo marcado con biotina. Como control, se realizó el mismo ensayo empleando OVA marcada con biotina en las mismas condiciones. La unión fue revelada empleando estreptavidina-FITC y los resultados se expresaron como índice de unión, tal como fue descrito previamente (ver ítem 3.5.1). Como se observa en la Figura 3.31, no se produjo unión de la OVA marcada con biotina a los monocitos, ya que el índice de unión fue cercano a uno en todas las condiciones utilizadas. Por el contrario, en el caso del EgAgB nativo el índice de unión aumentó al aumentar la concentración, tal como fue descrito en los ítems previos. Al comparar la unión del EgAgB a las células pre-incubadas con HDL y LDL, se pudo observar una leve disminución, más marcada en el caso de la HDL. Sin embargo, si bien esta tendencia se cumple para todas las concentraciones de EgAgB empleadas, el análisis estadístico mostró que esta disminución no fue significativa para ninguna de las dos lipoproteínas. Este resultado sugiere que si bien no se podría descartar que el EgAgB pueda compartir receptores con las lipoproteínas plasmáticas, el mismo es capaz de ser reconocido por estas células aún en presencia de HDL y LDL.



**Figura 3.31. Competencia por la unión a monocitos THP-1 con lipoproteínas plasmáticas.**

La unión de EgAgB nativo marcado con biotina (20, 50 y 100 µg/mL) a monocitos THP-1 pre-incubados con PBS, HDL o LDL (500 µg/mL) fue revelada empleando estreptavidina-FITC. Comparativamente también se utilizó OVA marcada con biotina a 100 µg/mL. El índice de unión se calculó como el cociente entre la intensidad de fluorescencia de cada muestra sobre la intensidad de fluorescencia del control con PBS para cada concentración de OVA o EgAgB utilizada. Los datos corresponden al promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  SEM. Las diferencias significativas entre la unión a las células pre-incubadas con HDL y LDL fueron analizadas empleando ANOVA seguido del test de Dunnett comparando con las células en ausencia de lipoproteínas (pre-incubadas con PBS) para cada concentración de OVA o EgAgB.

Asimismo, los resultados obtenidos en los experimentos de competencia con las lipoproteínas plasmáticas apoyan la idea de que la PC participaría principalmente en la forma en la que se exponen las subunidades de EgAgB en la partícula nativa, puesto que la PC presente en estas lipoproteínas tampoco produjo una inhibición en la unión del EgAgB tan importante como la observada en el caso del EgAgB tratado con PLD.

Como resumen de los resultados presentados en esta sección, se pudo determinar que células inflamatorias, como los monocitos y macrófagos, son capaces de unir al EgAgB nativo, así como a las subunidades libres de lípidos, en particular EgAgB8/1 y EgAgB8/3. Por otra parte, también se pudo establecer que la PC es importante en la interacción, posiblemente participando en la forma en que las subunidades de EgAgB se presentan en la partícula de EgAgB nativo, más que a través de una interacción directa con las células. Por otro lado, realizando ensayos de competencia a las lipoproteínas plasmáticas, HDL y LDL, se observó que éstas no fueron capaces de inhibir significativamente la unión del EgAgB nativo a monocitos. Estos datos sugieren que otros receptores no compartidos con estas lipoproteínas podrían estar reconociendo al EgAgB en estas células.

## **DISCUSIÓN**

La hipótesis general planteada en el presente trabajo de tesis está relacionada con el posible papel del EgAgB de *E. granulosus* en el intercambio de lípidos con el hospedador, que involucra la necesidad de captar especies lipídicas que el parásito no puede sintetizar y el transporte posterior de estos lípidos dentro del parásito. A su vez, esta función podría estar relacionada con la función anti-inflamatoria propuesta para esta molécula en base a sus efectos sobre algunos tipos de células mieloides, puesto que un posible blanco molecular para la adquisición de los lípidos desde el hospedador podrían ser estas células. Dado que distintas subunidades de EgAgB son expresadas en el metacestodo de *E. granulosus*, sería posible que estas subunidades cumplan distintas funciones, ya sea uniendo y/o transportando distintos tipos de lípidos, así como interaccionando con distintos blancos moleculares.

Dentro de los interrogantes que es posible plantear en el marco de esta hipótesis general, el objetivo global de este trabajo fue avanzar en la caracterización estructural y funcional del EgAgB, más específicamente en la forma en que se asocian los constituyentes proteicos y lipídicos en la partícula y en la contribución que estas fracciones tienen a algunas de las propiedades descritas para el EgAgB nativo. En particular los objetivos específicos planteados fueron: i) la obtención de las subunidades de EgAgB libres de lípidos, ii) el análisis de la capacidad de oligomerización de estas subunidades, iii) el análisis de las propiedades de unión de estas subunidades a distintos ligandos lipídicos, iv) la capacidad de distintas subunidades de transferir ligandos hacia membranas fosfolípicas modelo y v) la participación de distintas subunidades y/o de la fracción lipídica en el reconocimiento del EgAgB nativo por monocitos y macrófagos. En los capítulos previos se describieron los métodos llevados a cabo para cumplir estos objetivos, así como los resultados obtenidos en el transcurso de este trabajo. En este capítulo se discuten con más detalle estos resultados, destacando los aspectos más relevantes de los mismos y comparándolos con los antecedentes previos.

#### **4.1. Obtención de las subunidades recombinantes de EgAgB libres de lípidos**

Para llevar a cabo el análisis de la capacidad de oligomerización de las subunidades de EgAgB en ausencia de ligandos, la caracterización de sus propiedades de unión, su capacidad de transferir ligandos, así como la participación

de la fracción proteica y lipídica en la interacción con células del sistema inmune, primeramente fue fundamental la obtención de las subunidades recombinantes de EgAgB libres de lípidos.

Para obtener las subunidades libres de lípidos, como primera estrategia se decidió subclonar los ADN codificantes para las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 en el plásmido pET28b para purificar estas subunidades mediante cromatografía de afinidad con metales quelados, haciendo uso de la cola de histidinas con la que se expresan las proteínas en dicho plásmido. Este método de purificación ha sido ampliamente utilizado en nuestro laboratorio para la obtención de otras proteínas recombinantes, por lo cual además de la experiencia de los investigadores en su aplicación, se disponía de todos los reactivos necesarios para llevarlo a cabo de inmediato. De este modo, mediante técnicas de biología molecular se logró obtener la construcción pET28b-EgAgB8/1, que fue verificada mediante secuenciación. En el sistema pET se utiliza la ADN polimerasa del bacteriófago T7 para dirigir la expresión del gen de interés, enzima que se expresa en la cepa de *E. coli* BL21-(DE3) bajo control de un promotor inducible por IPTG (Studier & Moffatt, 1986). Para evaluar la expresión de la proteína EgAgB8/1 a partir del plásmido pET28b se ensayaron distintas temperaturas de inducción y concentraciones de IPTG, sin embargo, no fue posible obtener cantidades de proteína detectables mediante SDS-PAGE en la cepa BL21-(DE3). Dado que ha sido reportado que en este sistema existe un nivel basal de expresión aún en ausencia de inductor y que esto puede llevar a una disminución en la estabilidad del plásmido, y por consiguiente a su eliminación, también se ensayó la expresión de EgAgB8/1 en la cepa de expresión BL21-(DE3)-pLysS. En esta cepa, el plásmido pLysS produce la lisozima del bacteriófago T7, enzima que actúa como inhibidor natural de la polimerasa T7, mejorando así la inducción basal que ocurre en la cepa BL21-(DE3) (Studier, 1991). Sin embargo, tampoco en esta cepa fue posible lograr una mejor expresión de la proteína EgAgB8/1 en ninguna de las condiciones ensayadas. Cabe mencionar que todas las cepas BL21 utilizadas son adecuadas para la expresión de proteínas, dado que carecen de las proteasas OmpT y Lon, involucradas en la degradación proteica. Si bien no se pudo determinar el motivo por el cual el EgAgB8/1 no se expresó en este sistema, una hipótesis posible es que esta subunidad resulte tóxica para las bacterias, ya que se sabe que algunos péptidos formados por  $\alpha$ -hélices anfipáticas resultan tóxicos porque perturban la membrana plasmática bacteriana (Oren & Shai, 1998; Shai, 2002). Además, este inconveniente no es un hecho únicamente ocurrido para la expresión de la subunidad EgAgB8/1 en el sistema pET, sino que también ha sido constatado por otros investigadores para las

subunidades EgAgB8/2 y EgAgB8/4 (Kamenetzky, 2007). Por otro lado, esta hipótesis explicaría el hecho de que en ensayos previos fue posible obtener las subunidades recombinantes de EgAgB como proteínas de fusión a GST (Fernández et al., 1996; Rott et al., 2000; Monteiro et al., 2007), dado que la GST podría estar previniendo los efectos tóxicos causados por las subunidades expresadas en el sistema pET (Harper & Speicher, 2011).

Dado que no se obtuvieron resultados empleando el sistema pET28b y que la expresión de las subunidades como proteínas de fusión a GST brindó anteriormente buenos resultados, se decidió cambiar la estrategia experimental y purificar las subunidades de EgAgB como proteínas de fusión a GST a partir del plásmido pGEX, a pesar de no ser un método desarrollado previamente en nuestro laboratorio. Para ello, primeramente se puso a punto la purificación de la subunidad EgAgB8/3 fusionada a GST a partir del plásmido pGEX-4T-1. Durante esta puesta a punto se constató que una fracción importante de proteína de fusión EgAgB8/3-GST se mantuvo en la fracción insoluble luego de la lisis de las bacterias. Como se describió en el ítem 3.1.2 del capítulo Resultados, se realizaron varios intentos tendientes a mejorar la cantidad de proteína de fusión soluble obtenida. Los mejores resultados se obtuvieron disminuyendo el volumen del cultivo y aumentando la agitación del mismo, de modo tal de maximizar la aireación y permitir una correcta oxigenación del cultivo. En la mayoría de los casos la producción de proteínas recombinantes es llevada a cabo bajo condiciones aerobias para obtener un mayor rendimiento de biomasa y producto, ya que la generación de energía es mayor que bajo condiciones anaerobias. Además, bajo condiciones anaerobias la glucosa del medio es oxidada sólo de forma parcial por *E. coli*, lo que conlleva a la acumulación de subproductos de fermentación que pueden resultar tóxicos. Asimismo, estos procesos podrían afectar la solubilidad de las proteínas recombinantes sobre-expresadas en la bacteria. En los cultivos líquidos a la escala empleada en el laboratorio el oxígeno que utilizan las bacterias es el oxígeno disuelto en el medio proveniente del oxígeno atmosférico. En algunos casos, la expresión de proteínas recombinantes tras la inducción está acompañada de un aumento en la tasa de consumo de oxígeno y por lo tanto de una disminución en la concentración de oxígeno disuelto en el medio (Bhattacharya & Dubey, 1997). Por este motivo es probable que el hecho de disminuir el volumen del cultivo y de aumentar la velocidad de agitación aumente la superficie de contacto y permita una mayor uniformidad de la suspensión de bacterias de forma tal de aumentar el intercambio entre éstas y el medio. Asimismo, la turbulencia generada por la agitación posiblemente permita la división de las burbujas de aire lo que también aumenta la

superficie de contacto. Mediante este ajuste en las condiciones de cultivo fue posible obtener una buena proporción de EgAgB8/3-GST, y también de EgAgB8/1-GST y EgAgB8/2-GST solubles. Una vez que se logró mejorar la cantidad de proteína de fusión soluble, se prosiguió con la purificación de las mismas mediante afinidad empleando una columna de glutatión. Finalmente, las subunidades fueron separadas de la porción de GST mediante proteólisis específica con trombina. Empleando dicho protocolo fue posible obtener cantidades adecuadas de las subunidades recombinantes EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 con un alto grado de pureza.

Con el objetivo de obtener las subunidades del EgAgB libres de lípidos fue necesario ajustar un método para remover los ligandos provenientes de la bacteria que se hubieran unido durante la síntesis de las subunidades en *E. coli*. En primer lugar analizamos qué clases lipídicas contenían las subunidades recombinantes realizando una extracción lipídica y posterior análisis por TLC. Se encontró que las tres subunidades unen mayoritariamente fosfolípidos de *E. coli*, en particular PE y CL. Este resultado no llamó la atención, ya que se había descrito previamente que la partícula nativa de EgAgB contiene fosfolípidos, principalmente PC, en concordancia con la abundancia de fosfolípidos en el líquido hidático (Obal et al., 2012). En *E. coli* no se ha detectado PC, y dentro de sus fosfolípidos mayoritarios se encuentran la PE y la CL (Ames, 1968; De Siervo, 1969), tal como fue constatado en el análisis de las especies lipídicas de la cepa de *E. coli* utilizada para la expresión de las subunidades de EgAgB. Por este motivo, resulta razonable que los fosfolípidos unidos por las subunidades de EgAgB se encuentren entre estas especies, a pesar de que en la partícula nativa la PC sea el fosfolípido mayoritario. Para lograr remover estos ligandos de las subunidades recombinantes EgAgB8/1 y EgAgB8/2, en trabajos previos se había utilizado la resina hidrofóbica *Lipidex* (Chemale et al., 2005). Sin embargo, en nuestro laboratorio esta resina no resultó apropiada para la remoción completa de ligandos asociados a varias LBPs provenientes de organismos parásitos. Por esa razón optamos por un método basado en RP-HPLC, originalmente desarrollado para remover los ligandos de varias LBPs para el análisis estructural de estas proteínas mediante resonancia magnética nuclear (Meenan et al., 2011), y que además había resultado efectivo para deslipidizar varias LBPs en nuestro laboratorio (Ibañez Shimabukuro, 2014; Rey Burusco, 2014). Por otro lado dada la complejidad del EgAgB, molécula con potencial para oligomerizar y capaz de unir una gran variedad y cantidad de lípidos, preferimos optar por este método a pesar de que se trata de un método muy drástico que implica la desnaturalización de las proteínas seguida de su renaturalización. Aplicando el protocolo descrito por Meenan y colaboradores, fue

posible remover los fosfolípidos unidos a las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3, de acuerdo con el análisis de la extracción lipídica realizada luego del tratamiento mediante RP-HPLC. Vale la pena comentar que la aplicación de este método permitió constatar que la subunidad EgAgB8/1 presenta un componente más hidrofóbico que las subunidades EgAgB8/2 o EgAgB8/3, dado que el gradiente empleado para su elución implicó un mayor porcentaje de solvente orgánico (95% de acetonitrilo para EgAgB8/1 versus 70% para EgAgB8/2 o EgAgB8/3). Del mismo modo, en todas las purificaciones de esta subunidad se observó una mayor tendencia a precipitar luego de la renaturalización en solución acuosa, lo cual indicaría una menor estabilidad del EgAgB8/1 frente a la deslipidización. Es probable que estos factores contribuyeran al menor rendimiento final obtenido tras la expresión, purificación y deslipidización del EgAgB8/1 en comparación con el EgAgB8/2 y EgAgB8/3.

La caracterización estructural de las subunidades de EgAgB se llevó a cabo mediante CD; para las tres subunidades se observó un espectro característico de proteínas con alto contenido en  $\alpha$ -hélices, tal como fue previamente descrito, tanto para la proteína nativa como para las subunidades recombinantes (Oriol & Oriol, 1975; González-Sapienza & Cachau, 2003; Monteiro et al., 2007). La deconvolución de los espectros de CD sugirió que estas proteínas presentan un contenido de  $\alpha$ -hélices que varió entre el 30 y el 60% y un contenido de *random coil* o plegamiento con giros al azar que varió entre el 29 y 50% entre las distintas subunidades. Si bien estos porcentajes no siempre son exactos empleando distintos métodos de deconvolución, al compararlos con los obtenidos por Monteiro y colaboradores (Monteiro et al., 2007), se observa que para las subunidades con lípidos estos autores obtuvieron valores que prácticamente no variaron entre las distintas subunidades y se asemejaron a los obtenidos para el EgAgB nativo. De hecho todos los espectros de CD obtenidos por estos autores son prácticamente superponibles. Esto podría sugerir que al encontrarse en presencia de los lípidos de la bacteria, las tres subunidades adoptan una estructura similar a la que adoptarían en la partícula de EgAgB nativo, mientras que en ausencia de los lípidos estaríamos observando ciertas diferencias en la estructura intrínseca que adoptarían las subunidades por sí mismas sin la participación de sus ligandos. De acuerdo con datos obtenidos *in silico* en el marco de una colaboración recientemente establecida con el grupo del Dr. Marcelo Costabel (Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina), parecen existir algunas diferencias en el plegamiento de las subunidades del EgAgB, principalmente en el EgAgB1 en relación a las demás subunidades. Esta información se discute más adelante con más detalle en esta sección (ver ítem 4.6).

Como resumen de los resultados discutidos en referencia al primer objetivo de este trabajo, el método más eficiente para la obtención de las subunidades recombinantes fue la expresión como proteínas de fusión a GST, lo cual podría colaborar previniendo su potencial toxicidad para la bacteria al ser expresadas sin la porción de GST. Asimismo, luego de ajustar las condiciones del cultivo mejorando la aireación del mismo, fue posible obtener cantidades adecuadas de proteína de fusión soluble y por consiguiente obtener cantidades adecuadas de las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3. Los ligandos lipídicos provenientes de *E. coli* que co-purificaron con las subunidades, principalmente PE y CL, fueron removidos eficientemente empleando el método basado en RP-HPLC. Las proteínas libres de lípidos obtenidas mediante este método presentaron una estructura secundaria acorde a la reportada previamente (Oriol & Oriol, 1975; González-Sapienza & Cachau, 2003; Monteiro et al., 2007) y a los datos de modelado molecular recientemente obtenidos (Dr. Costabel, comunicación personal).

#### **4.2. Análisis de la capacidad de oligomerización de las subunidades de EgAgB libres de lípidos**

Como se ha comentado a lo largo de este trabajo, una característica de las subunidades de EgAgB es su capacidad de auto-ensamblarse en oligómeros de mayor tamaño (Monteiro et al., 2007, 2012). Se ha propuesto que la característica anfipática de las subunidades, así como su disposición de cargas eléctricas, de acuerdo a estudios de modelado molecular, favorecen esta auto-asociación (Monteiro et al., 2007, 2008). Sin embargo, en estos trabajos la participación de los lípidos en la oligomerización no fue considerada.

Como una caracterización inicial para evaluar si las subunidades de EgAgB son capaces de ensamblarse en ausencia de sus ligandos, en este trabajo se realizó un análisis de las subunidades libres de lípidos mediante cromatografía de exclusión molecular. Los perfiles de elución de las tres subunidades presentaron un pico único bien definido, que de acuerdo al estándar empleado, no se corresponde con el perfil esperado para los monómeros de 8 kDa. Esto indicaría que las tres proteínas son capaces de formar oligómeros de mayor tamaño. Las estimaciones de sus pesos moleculares muestran que la subunidad EgAgB8/3 forma oligómeros de menor tamaño (aproximadamente 40 kDa), mientras que las subunidades EgAgB8/1 y EgAgB8/2 formarían oligómeros más grandes (aproximadamente 60 kDa). Estos datos sugieren que los oligómeros formados por EgAgB8/1 y EgAgB8/2 estarían formados por 7 u 8

subunidades, mientras que los oligómeros de EgAgB8/3 estarían formados por 4 o 5 subunidades. Si bien estos datos muestran que los lípidos no son imprescindibles para el auto-ensamblaje de estas subunidades, si parecerían participar en la organización estructural de la partícula, ya que los oligómeros formados por las tres subunidades sin deslipidizar presentaron un tamaño bastante mayor, entre 110 y 160 kDa, así como oligómeros más grandes (Monteiro et al., 2007).

Para profundizar el análisis de la oligomerización de las subunidades libres de lípidos, se realizaron experimentos de entrecruzamiento químico con EDC y los productos se analizaron mediante SDS-PAGE. Como se ha comentado anteriormente, dado que el EDC es un agente de entrecruzamiento de brazo cero o *zero-length*, es necesario que los grupos carboxilo y las aminas primarias que entrecruza este agente se encuentren muy cercanos para que se produzca el enlace covalente entre ambos (Nakajima & Ikada, 1995). En estos ensayos nuevamente se encontró un comportamiento distinto para las subunidades EgAgB8/1 y EgAgB8/2 en comparación con EgAgB8/3. Mientras el producto mayoritario tras el entrecruzamiento de las subunidades EgAgB8/1 y EgAgB8/2 parece ser un componente cercano a los 45 kDa, la subunidad EgAgB8/3 mostró productos de entrecruzamiento más heterogéneos, presentando un patrón de bandas regularmente espaciadas, si bien productos de mayor tamaño fueron detectados para las tres subunidades. En cambio, para las subunidades no deslipidizadas, los productos de entrecruzamiento presentaron un tamaño mayor, siendo también más grandes en el caso de las subunidades de EgAgB8/1 y EgAgB8/2 en comparación con los formados por EgAgB8/3; presentando similitudes con los productos de entrecruzamiento formados para el EgAgB nativo. Estos datos apoyan la idea de que si bien los lípidos no son imprescindibles para la oligomerización, en presencia de lípidos los oligómeros formados por las subunidades de EgAgB presentan un tamaño mayor.

En la bibliografía, trabajos previos analizando la estabilidad de los oligómeros formados por las subunidades sin deslipidizar, determinaron que los oligómeros formados por la subunidad EgAgB8/3 son de mayor tamaño, más estables y compactos, seguidos por los de la subunidad EgAgB8/2 y luego por los de la subunidad EgAgB8/1 (Monteiro et al., 2007, 2012). El análisis de las subunidades de EgAgB libres de lípidos llevado a cabo en el presente trabajo está de acuerdo con algunas de estas observaciones, si consideramos las características de los oligómeros formados por las distintas subunidades. Si bien el EgAgB8/3 deslipidizado mostró tendencia a formar oligómeros de tamaño menor que el EgAgB8/1 y EgAgB8/2, según su comportamiento en la cromatografía de exclusión molecular, esta subunidad generó oligómeros de

tamaños más heterogéneos que los formados por el EgAgB8/1 y EgAgB8/2, algunos de tamaño mayor a 97 kDa, coincidentemente con lo observado por Monteiro y colaboradores (Monteiro et al., 2012). Por tanto es posible que en presencia de los lípidos esta diferencia en la capacidad de oligomerización de EgAgB8/3 conduzca a la formación de componentes mayores a los formados por EgAgB8/1 y EgAgB8/2.

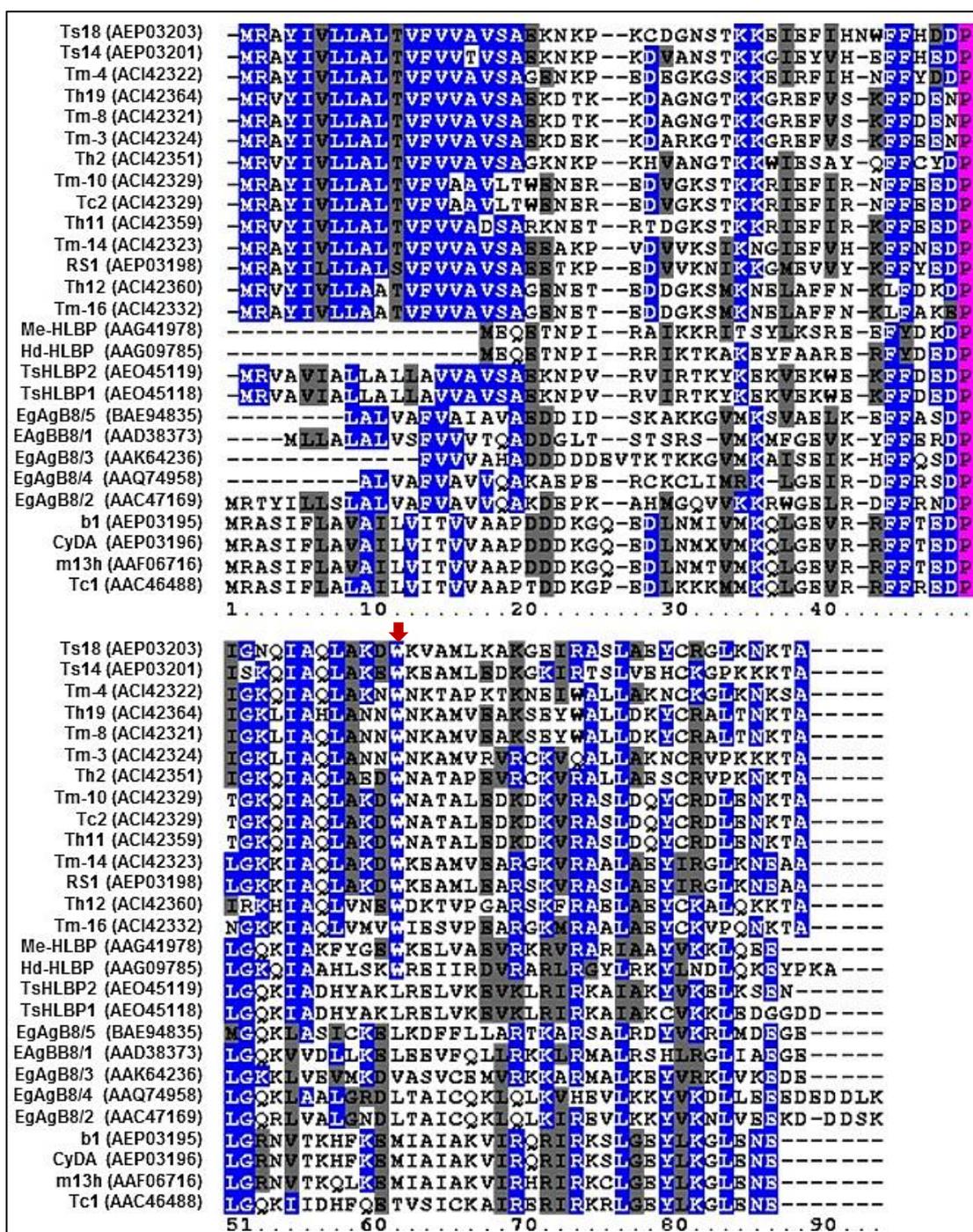
Como resumen de los resultados discutidos en referencia al segundo objetivo de este trabajo, se pudo determinar que las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 tienen capacidad de interactuar consigo mismas para formar oligómeros de mayor tamaño aún en ausencia de los ligandos lipídicos que estas son capaces de unir. Los datos obtenidos en este trabajo y su comparación con la información descrita por otros autores sugieren que cuando las subunidades unen sus ligandos, los oligómeros que se forman adoptan un tamaño mayor, con una organización estructural distinta a la adoptada por las subunidades en ausencia de los ligandos, asemejándose más a la de la partícula de EgAgB nativo.

#### **4.3. Caracterización de las propiedades de unión de las subunidades de EgAgB a ligandos lipídicos**

Como se comentó en la Introducción, la capacidad de las HLBP de unir lípidos ha sido estudiada para varios miembros de esta familia, mostrando que podría variar entre proteínas pertenecientes a subfamilias de una HLBP particular. Por ejemplo, en el caso de la proteína TsM150 de *T. solium*, los componentes de la subfamilia de 10 kDa llamados CyDA, b1 y m13h, mostraron unión a 16-AP, pero no a DAUDA o ANS, mientras que el componente RS1 de la subfamilia de 7 kDa se unió a DAUDA y ANS, pero no a 16-AP (Kim et al., 2011). En el caso del EgAgB, la información disponible era muy incompleta. Ensayos basados en técnicas fluorescentes demostraron que el EgAgB nativo y las subunidades recombinantes EgAgB8/1 y EgAgB8/2 deslipidizadas mediante *Lipidex* son capaces de unir al análogo fluorescente 16-AP, pero no a otras sondas fluorescentes como DAUDA, DACA o ANS (Chemale et al., 2005). Sin embargo, no se conocía si las distintas subunidades del EgAgB podrían unir directamente otro tipo de lípidos, diferente a los ácidos grasos, y no se habían examinado las propiedades de unión de las subunidades EgAgB8/3, EgAgB8/4 y EgAgB8/5. En este trabajo nos propusimos abordar algunos de estos interrogantes, utilizando las subunidades recombinantes EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 totalmente deslipidizadas. Las herramientas metodológicas que se utilizaron

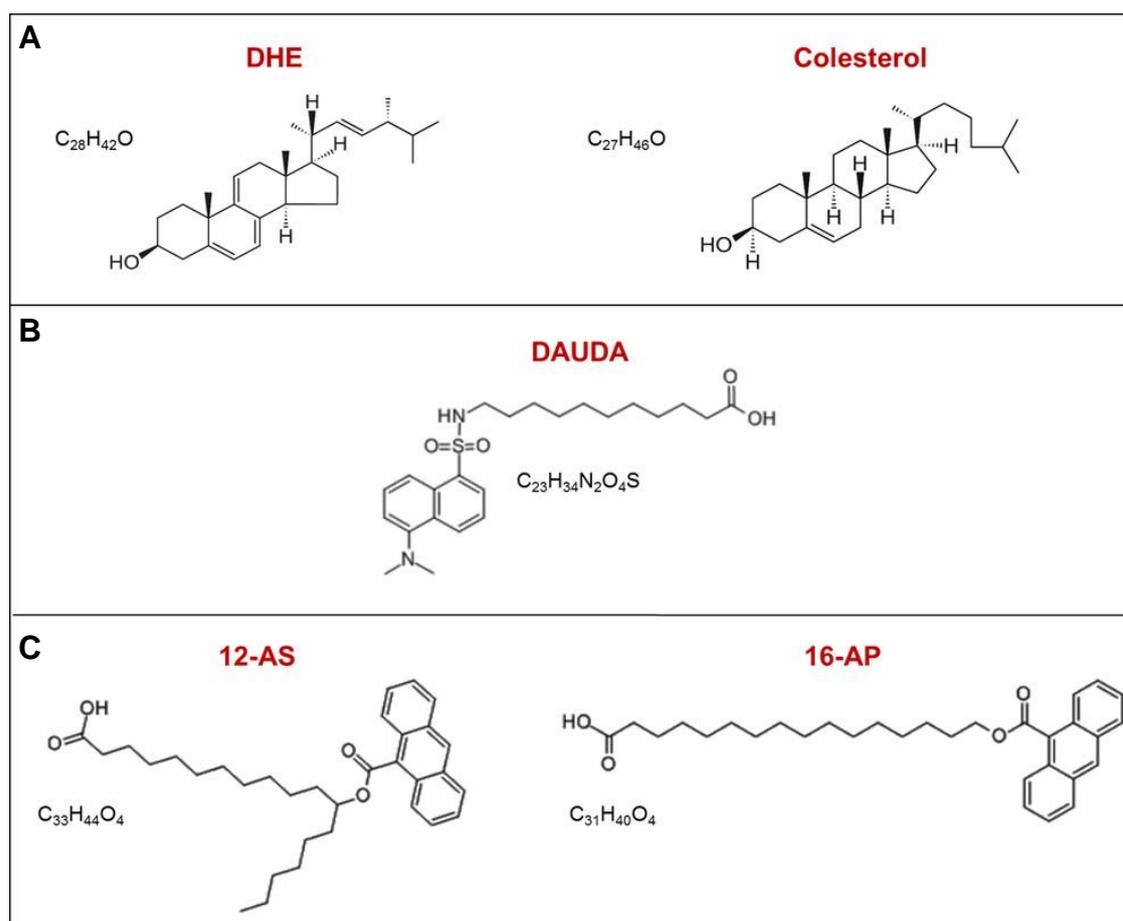
involucraron la medición de los cambios en la fluorescencia intrínseca del EgAgB8/2 tras el agregado de ácido oleico o colesterol, y la capacidad de las subunidades de EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 de unir distintas sondas lipídicas, incluyendo análogos de ácidos grasos y colesterol. Este análisis fue novedoso, no sólo por incluir otro tipo de ligandos, sino también porque el método de remoción de los lípidos asociados a las subunidades (basado en el uso de RP-HPLC) mostró ser un método más eficiente que la resina *Lipidex*, logrando una completa remoción de los ligandos unidos a distintas LBPs (Ibañez Shimabukuro, 2014; Rey Burusco, 2014). Más aún, las propiedades de unión de la subunidad EgAgB8/3 no habían sido exploradas anteriormente.

Una de las aproximaciones experimentales posibles de aplicar para el estudio de la interacción lípido-proteína está basada en el análisis de la fluorescencia intrínseca de triptófano, pero sólo pudo ser aplicada en nuestro caso con la proteína EgAgB8/2, ya que es la única que presenta un triptófano en su secuencia (Trp16). Este análisis mostró que el Trp16 de EgAgB8/2 se encuentra en un entorno bastante polar de la proteína. El mismo no resultó ser sensible a los sucesivos agregados de ácido oleico o de colesterol, mostrando un comportamiento similar al descrito previamente por Chemale y colaboradores para la proteína deslipidizada por *Lipidex*. Esto sugiere que en este aminoácido se encuentra en una zona de la proteína que no participa en la unión del ligando. Como se ha comentado previamente, en la Me-HLBP de *M. expansa* y en la Hd-HLBP de *H. diminuta* el triptófano ubicado en la posición número 41 (Trp41) de ambas proteínas parece formar parte del sitio de unión a ligandos lipídicos (Barrett et al., 1997; Saghir et al., 2001). Como se puede observar en el alineamiento de la Figura 4.1, este triptófano es compartido por varias subunidades de distintas HLBP, no así por las subunidades de EgAgB (indicado en la figura con una flecha roja). En el caso del EgAgB no se ha determinado cual es la región que participa en la unión al ligando. En este sentido, sería interesante diseñar mutantes de las distintas subunidades de EgAgB, para generar isoformas que presenten y otras que no presenten un triptófano en la región donde se encuentra el Trp41 en Me-HLBP y Hd-HLBP de acuerdo al alineamiento, de manera de evaluar si esta región de la proteína participa de la unión al ligando.



**Figura 4.1. Alineamiento de las secuencias de distintas HLBPs.** Las secuencias correspondientes a HLBPs de distintos cestodos fueron alineadas empleando la herramienta *ClustalW* del programa *Biology Workbench*. Los residuos completamente conservados, idénticos o similares se muestran en violeta, azul y gris, respectivamente. Se indica con una flecha roja el residuo de triptófano (W) que se menciona en el texto. Las distintas proteínas empleadas en este análisis son: EgAgB1-5 de *Echinococcus granulosus*; RS1, Ts14, Ts18, CyDA, b1 y m13h, TsHLBP1, TsHLBP2 de *Taenia solium*; Tc1-2 de *Taenia crassiceps*; Hd-HLBP de *Hymenolepis diminuta*; MeHLBP de *Moniezia expansa*; Tm-3, Tm-4, Tm-8, Tm-10, Tm-14 y Tm-16 de *Taenia multiceps* y Th11, Th12, Th19, y Th2 de *Taenia hydatigena*. Se indica entre paréntesis los números de acceso en la base de datos *GenBank* para cada proteína.

Para profundizar el análisis de las propiedades de unión de las subunidades de EgAgB se abordó su posible asociación con colesterol, ya que es uno de los ligandos lipídicos presentes en el EgAgB nativo. Para esto se utilizó como sonda fluorescente el análogo de colesterol DHE. El uso de esta sonda fluorescente se basó en que es muy similar estructuralmente al colesterol (ver Figura 4.2A). Además, el DHE ha sido empleado en numerosos estudios funcionales sobre el tráfico de colesterol, así como en el estudio de las membranas biológicas (Schroeder, 1984; Smutzer et al., 1986; Wüstner, 2007; McIntosh et al., 2008). Los resultados obtenidos mostraron que el DHE no fue capaz de unirse a ninguna de las subunidades de EgAgB analizadas. Dada la similitud con el colesterol, el hecho que las subunidades de EgAgB no presenten unión al DHE sugiere que en la partícula de EgAgB nativo el colesterol posiblemente no se encuentre interactuando directamente con las subunidades proteicas, por lo menos en lo que respecta a las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/2 o EgAgB8/3.



**Figura 4.2. Estructura química de sondas fluorescentes y ligandos lipídicos.** Se muestran las estructuras químicas de distintas sondas y ligandos lipídicos de relevancia para este trabajo. **(A)** Estructura química de la sonda DHE y comparación con la estructura del colesterol. **(B)** Estructura química del DAUDA. **(C)** Estructuras químicas de los AOFAs empleados para el análisis de las propiedades de unión de las subunidades de EgAgB: 12-AS y 16-AP.

Por otro lado, se analizó la capacidad de las tres proteínas recombinantes de unir ácidos grasos utilizando dos sondas fluorescentes: DAUDA y 12-AS. En el caso del DAUDA, cuya estructura química se muestra en el panel B de la Figura 4.2, se encontró una unión débil a las subunidades de EgAgB. Como se comentó más arriba, ya había sido descrito previamente que las subunidades EgAgB8/1 y EgAgB8/2 deslipidizadas mediante *Lipidex* no fueron capaces de unir DAUDA (Chemale et al., 2005). Como en este trabajo, se obtuvo el mismo resultado para estas subunidades tras el tratamiento de RP-HPLC, el método utilizado para extraer los lípidos de la proteína no parece influenciar en la capacidad de las subunidades de EgAgB de unir esta sonda. Además, comprobamos que la subunidad EgAgB8/3 tampoco es capaz de unir esta sonda. En contraste, las tres subunidades fueron capaces de unir el análogo 12-AS con afinidad submicromolar, presentando un único sitio de unión por monómero de cada subunidad ( $n = 1$ ). Otros AOFAs, en particular el análogo 16-AP, fueron utilizados anteriormente para el análisis de las propiedades de unión de varias HLBP. De hecho, como se comentó más arriba, las subunidades recombinantes EgAgB8/1 y EgAgB8/2 deslipidizadas mediante *Lipidex* presentaron unión al 16-AP caracterizada por  $K_d$  submicromolares para ambas subunidades, pero un número de sitios de unión por monómero próximo a 0.3 (Chemale et al., 2005). Esto sugiere que serían necesarias por lo menos tres subunidades de EgAgB para unir una única molécula de 16-AP, mientras que en este trabajo la unión del 12AS a las subunidades sería 1 a 1. Vale la pena mencionar que durante el desarrollo de este trabajo de tesis se realizaron algunos ensayos preliminares de unión de la sonda 16-AP a las subunidades EgAgB8/2 y EgAgB8/3, que sugirieron que la interacción también sería de tipo 1 a 1. Así, las diferencias en cuanto al número de sitios de unión por monómero no parecen deberse al uso de dos AOFAs distintos, y podría ser resultado de los distintos métodos empleados para remover los ligandos provenientes de la bacteria. Por otro lado el hecho que diferentes sondas DAUDA, 12-AS y 16-AP muestren comportamientos diferentes sugiere que existe cierto grado de selectividad por estos derivados de ácidos grasos. Las estructuras químicas del DAUDA, 12-AS y el 16-AP se comparan en la Figura 4.2. Como se observa en la figura, los sustituyentes que le brindan la característica fluorescente a los distintos análogos de ácidos grasos son distintos en el DAUDA y en los AOFAs, por lo que no se puede descartar que esta diferencia sea responsable de este grado de selectividad. No obstante, también debe considerarse la posibilidad de que las subunidades de EgAgB estén mayormente adaptadas a unir ácidos grasos de 16 y 18 carbonos, debido a que éstos son los ácidos

grasos mayoritarios que se encuentran en el entorno natural de esta lipoproteína, el líquido hidático (Obal et al., 2012). Esto permitiría explicar el hecho de que estas subunidades sean capaces de unir análogos del ácido palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0), como el 16-AP y el 12-AS, pero no los análogos de los ácidos undecanoico (C11:0) o caprílico (C8:0), como el DAUDA y el DACA, de acuerdo a nuestros resultados y a los obtenidos por Chemale y colaboradores (Chemale et al., 2005).

Comparativamente con las propiedades de unión descritas para otras HLBP, las subunidades de EgAgB analizadas en este trabajo comparten algunas propiedades de unión con algunas subunidades de otras HLBP, como se detallará a continuación. Por ejemplo, en relación a los AOFAs, se determinó que la sonda 16-AP mostró unión a la proteína Me-HLBP de *M. expansa*, a las proteínas TsHLBP1, TsHLBP2 y las subunidades de 10 kDa de la proteína TsM150 de *T. solium* (Barrett et al., 1997; Kim et al., 2011; Rahman et al., 2012). En todos los casos se reportó un aumento en la emisión de esta sonda, así como también un corrimiento en el máximo de emisión hacia valores de longitud de onda menores, tal como se observó para las subunidades de EgAgB deslipidizadas en el presente trabajo. En el caso de la proteína Me-HLBP, se reportó una  $K_d$  mayor que para las subunidades de EgAgB (aproximadamente 2  $\mu$ M), indicando una menor afinidad por esta sonda, aunque un valor de  $n$  cercano a 1 también fue reportado para esta HLBP (Barrett et al., 1997). La sonda 16-AP también mostró capacidad de unión a las proteínas recombinantes TsHLBP1 y TsHLBP2, que se ubican en el mismo clado que la proteína Me-HLBP (ver Figura 1.10). Además, al igual que las subunidades de EgAgB estas proteínas no presentaron unión a DAUDA (Rahman et al., 2012), indicando que algunas de estas propiedades de unión son compartidas con las subunidades de EgAgB. Como se comentó previamente, en el caso de la proteína TsM150, la sonda 16-AP mostró unión a las subunidades pertenecientes a la subfamilia de 10 kDa (CyDA, b1 y m13h), mientras que no a la subunidad RS1, perteneciente a la familia de 7 kDa. Al igual que las subunidades de EgAgB, las subunidades CyDA, b1 y m13h no presentaron unión a DAUDA (Kim et al., 2011). Esto indicaría que las subunidades de EgAgB tendrían propiedades de unión más similares a la subfamilia de 10 kDa que a la de 7 kDa. Estudios evolutivos sitúan a esta subfamilia en el mismo clado que las subunidades de EgAgB (Alvite & Esteves, 2012; Rahman et al., 2012). Sin embargo, dado que el análisis de otras HLBP que se encuentran en clados distintos, tales como la Me-HLBP y la TsHLBP, han mostrado que también unen AOFAs, las propiedades de unión de las distintas HLBP parecen no estar relacionadas con las similitudes evolutivas de las estas proteínas. El

alineamiento de las subunidades de EgAgB con varias HLBP's de distintos cestodos se muestra en la Figura 4.1 en este capítulo.

Como resumen de los resultados discutidos en referencia al tercer objetivo de este trabajo, se pudo determinar que las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 presentaron unión a algunas de las sondas fluorescentes empleadas, mientras que no a otras, compartiendo similitudes con otras HLBP's descritas hasta el momento. La unión a colesterol no pudo ser evidenciada, ni empleando fluorescencia intrínseca, ni haciendo uso de la sonda DHE. La similitud entre el DHE y el colesterol sugiere que estas subunidades no serían capaces de interactuar directamente con este ligando, que si está presente en la partícula de EgAgB nativo. Por otra parte, la capacidad de unión de la sonda 12-AS a las subunidades de EgAgB, así como los parámetros determinados en este objetivo, revelaron que esta sonda resultaría útil para evaluar la transferencia de ácidos grasos hacia membranas fosfolipídicas artificiales, tal como se discutirá a continuación.

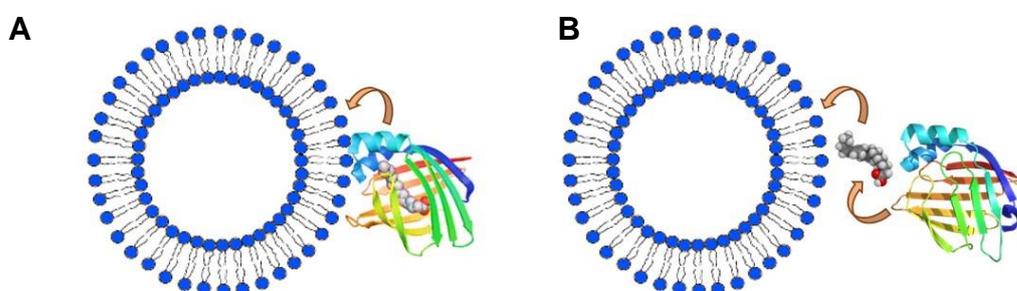
#### **4.4. Análisis de la capacidad de las subunidades de EgAgB de transferir ácidos grasos hacia membranas fosfolipídicas**

Dentro de la hipótesis general en la cual se enmarca este trabajo de tesis, se ha propuesto que, dado que el EgAgB es capaz de unir varios tipos de lípidos, entre ellos algunos lípidos que *E. granulosus* no puede sintetizar por sí mismo, esta molécula podría participar en la adquisición de estos compuestos desde el hospedador y/o en el transporte de los lípidos entre los distintos tejidos del parásito. En cualquier caso, sería necesario que esta proteína sea capaz de entregar sus ligandos hacia distintos blancos moleculares, como otras proteínas, membranas o células. Sin embargo, abordar esta posibilidad no resulta metodológicamente sencillo.

Para evaluar la capacidad de transferencia de ligandos de las subunidades de EgAgB, en este trabajo se propuso realizar una primera aproximación evaluando la capacidad de transferencia de ácidos grasos hacia membranas fosfolipídicas de dos subunidades de EgAgB que representan los subgrupos con mayores diferencias en cuanto a su secuencia proteica. Para ello se empleó un método de fluorescencia, utilizando la técnica de FRET, valiéndonos de la unión de las subunidades de EgAgB al 12-AS y empleando membranas fosfolipídicas conteniendo un aceptor de la fluorescencia del grupo antroilo, como es el NBD-PC. Esta técnica ha sido empleada para el estudio de la transferencia de ácidos grasos desde distintos tipos de LBP's de

diferentes organismos, incluyendo parásitos helmintos entre los que también se encuentra *E. granulosus* (Storch & Bass, 1990; McDermott et al., 2002; Falomir Lockhart et al., 2009; Porfido et al., 2012). Sin embargo, esta metodología nunca fue empleada para el análisis de la transferencia de ligandos de ninguna HLBP, resultando una aproximación novedosa para estas proteínas.

Este tipo de estudios han permitido investigar qué mecanismo utilizan estas proteínas para transferir los ácidos grasos hacia las membranas fosfolipídicas. Como ya se ha descrito previamente, cuando un AOFA se une de forma específica a una proteína, su fluorescencia aumenta de forma considerable debido al entorno hidrofóbico que le brinda la proteína. Si la proteína es capaz de transferir este ácido graso a una membrana fosfolipídica que tiene en su composición NBD-PC, la fluorescencia del grupo antróilo decae por el fenómeno de FRET. Al medir esta caída de fluorescencia en el tiempo, es posible determinar la velocidad de transferencia del ligando. Si la transferencia de ligando implica un contacto directo con la membrana fosfolipídica, al aumentar la concentración de vesículas aumentan los choques efectivos con la membrana y por lo tanto aumenta la velocidad de transferencia. Si por el contrario, esta velocidad no aumenta significativamente, es indicativo de que el paso limitante de la velocidad de transferencia sería la disociación del complejo proteína-ligando (Storch & Thumser, 2000). Asimismo, la comparación de las velocidades de transferencia frente a vesículas de diferente composición y carga neta superficial permite profundizar en el mecanismo de transferencia y establecer qué tipo de interacciones cobran importancia. De este modo, se han podido clasificar a las distintas LBPs de acuerdo a la forma en que transfieren sus ligandos (Storch & Thumser, 2000; McDermott et al., 2002; Falomir Lockhart et al., 2009). Un esquema ilustrativo de estos mecanismos se muestra en la Figura 4.3.



**Figura 4.3. Esquema de los mecanismos de transferencia de ligandos hacia membranas.** Las LBPs pueden transferir los ácidos grasos hacia vesículas fosfolipídicas empleando diferentes mecanismos. **(A)** El paso limitante de la velocidad de transferencia es la colisión directa de la proteína con la membrana. **(B)** El paso limitante de la velocidad de transferencia es la disociación del complejo proteína-ligando. Se muestra como ejemplo una proteína de la familia de la FABPs. Adaptado de Storch & Thumser, 2000.

En el caso de las subunidades de EgAgB, inicialmente se realizaron ensayos de titulación agregando vesículas de PC/NBD-PC a los complejos EgAgB8/2-12AS y EgAgB8/3-12AS. En estos ensayos se observó una caída en la fluorescencia del 12-AS tras los sucesivos agregados de vesículas. Esto fue indicativo de la existencia de un proceso de transferencia de la sonda hacia las vesículas, puesto que para que el fenómeno de FRET ocurra, el dador y el aceptor de energía deben encontrarse muy próximos entre sí (Lakowicz, 2007), indicando que el ácido graso se estaría incorporando a la vesícula. Mediante esta titulación fue posible obtener los valores de  $K_p$  del 12-AS entre EgAgB8/2 o EgAgB8/3 y las vesículas. En ambos casos se obtuvieron valores ligeramente menores a 1, indicando una leve preferencia de la sonda por las vesículas respecto a las proteínas. Estos datos mostraron que las subunidades EgAgB8/2 y EgAgB8/3 son capaces de transferir el ligando 12-AS hacia las vesículas fosfolipídicas artificiales.

Con el fin de profundizar estos estudios y evaluar el mecanismo de transferencia de ambas proteínas, se realizaron ensayos de cinética para determinar las velocidades de transferencia de 12-AS desde ambas proteínas hacia las vesículas. En el caso de la subunidad EgAgB8/2 se encontró que la velocidad de transferencia de ligando aumentó de forma significativa al aumentar la cantidad de vesículas de PC/NBD-PC empleadas. Por el contrario, este aumento significativo en la velocidad de transferencia de ligando tras los incrementos en la concentración de vesículas no fue observado en el caso de la subunidad EgAgB8/3. Estos datos sugieren que en el caso de la subunidad EgAgB8/2 el paso limitante de la velocidad de transferencia sería la interacción directa con la vesícula, mientras que en el caso de EgAgB8/3, es posible que en proximidad de la membrana, la proteína libere el ligando para transferirlo a la vesícula. Este mecanismo no necesariamente implica que el EgAgB8/3 no interaccione con las vesículas, si no que en una primera instancia el ligando debe tomar contacto con el medio para luego transferirse a la membrana. De hecho, para otras proteínas que también transfieren sus ligandos empleando este mecanismo se ha descrito que sí existe una interacción directa con las vesículas, como es el caso de la proteína FABP de hígado de rata (Falomir-Lockhart et al., 2011) y de las proteínas de nematodos ABA-1-A1 y Ov-FAR-1 (McDermott et al., 2002).

Para profundizar en el análisis de transferencia de ligandos, se utilizaron vesículas aceptoras con densidad de carga neta negativa superficial, empleando vesículas de PS/NBD-PC y CL/NBD-PC. El cambio en la densidad de carga neta superficial puede modificar la velocidad de transferencia de ligando si el proceso es mediado por interacciones electrostáticas (Hsu & Storch, 1996; Córscico et al., 1998, 2004, 2005).

En el caso de las vesículas de PS/NBD-PC, el comportamiento de ambas proteínas fue similar al descrito para las vesículas de NBD-PC (vesículas *zwitteriónicas*). Mientras que para la subunidad EgAgB8/2 la velocidad de transferencia aumentó significativamente al incrementar la cantidad de vesículas, en el caso la subunidad EgAgB8/3 presentó una leve variación. Estos datos apoyan la idea de que la interacción directa con la membrana es el paso limitante en la cinética de transferencia en el caso de EgAgB8/2 y no en el caso de EgAgB8/3. Para aumentar más aún la densidad de carga neta negativa en la superficie de las vesículas se utilizaron vesículas de CL/NBD-PC. En este caso, se encontró que la velocidad de transferencia aumentó de forma significativa a medida que se incrementó la concentración de estas vesículas, tanto en el caso de EgAgB8/2 como para EgAgB8/3. Esto implica que ambas proteínas estarían interaccionando de forma directa con estas vesículas. A su vez, al comparar los valores de velocidad de transferencia entre los distintos tipos de vesículas se observó que la velocidad fue significativamente mayor en el caso de las vesículas que presentan fosfolípidos con doble carga neta negativa superficial (25 % CL) en comparación con las que presentan fosfolípidos con una única carga neta negativa superficial (25 % PS) o con las vesículas *zwitteriónicas* (100 % PC). Estos datos sugieren que la interacción de ambas proteínas con las vesículas de CL se podría ver favorecida por la participación de interacciones electrostáticas, posiblemente mediadas a través de los residuos positivos de éstas subunidades. Sin embargo, dado que este aumento en la velocidad de transferencia se dio específicamente para las vesículas ricas en CL, y no ocurrió para las vesículas conteniendo 25 % de PS, otra posible explicación puede ser que la interacción con las vesículas ricas en CL se vea favorecida por la propia presencia de este fosfolípido y en menor medida por las interacciones electrostáticas. Debido a que el análisis *in silico* utilizando diferentes herramientas para modelar la estructura de las subunidades de EgAgB sugieren la existencia de zonas definidas con densidades de carga tanto negativas, como positivas (Monteiro et al., 2007; Dr. Costabel, comunicación personal), parecería probable que la interacción con vesículas ricas en CL se posibilite principalmente por la existencia de fuerzas electrostáticas. Como la velocidad de transferencia de 12-AS hacia las vesículas ricas en CL fue mayor para la subunidad EgAgB8/3 que para la subunidad EgAgB8/2, si las fuerzas electrostáticas son en mayor medida las responsables de esta fuerte interacción, la distribución de cargas en la superficie de estas dos subunidades debería mostrar diferencias. Más aún, podríamos sugerir que en el EgAgB8/3, para el cual la cinética de transferencia hacia vesículas de ricas en CL fue más rápida, la región de mayor densidad de cargas

positivas de la proteína correspondería a la zona que se aproxima a la membrana fosfolípida para entregar el ligando.

No obstante, dado que el aumento en la velocidad de transferencia se dio específicamente para las vesículas ricas en CL y no para las vesículas conteniendo 25% de PS, como se comentó anteriormente no se puede descartar que la interacción con las vesículas ricas en CL se vea favorecida por la presencia específica de este fosfolípido y en menor medida por las interacciones electrostáticas. La CL es un fosfolípido particular, dado que presenta una estructura dimérica con cuatro ácidos grasos y dos grupos fosfato unidos mediante un glicerol. Este fosfolípido puede presentar un alto polimorfismo de fases, pudiendo formar fases lamelares como las que formaría en una bicapa u otras fases menos comunes, como fases hexagonales invertidas, que se ven favorecidas en presencia de cationes divalentes o a pH bajo (Schlame et al., 2000). En los experimentos de transferencia llevados a cabo en este trabajo, las SUVs ricas en CL fueron preparadas y siempre mantenidas en una solución TBS con el agregado de EDTA 1 mM a pH 7.4, por lo cual en estas condiciones, y teniendo en cuenta la composición de las vesículas en CL y PC, es poco probable que estos fosfolípidos hayan presentado una fase distinta a la lamelar. Más aún, la caracterización en nuestro laboratorio de estas vesículas mediante ensayos de dispersión de luz ha mostrado que el tamaño de las SUVs de composición 100% PC o con la sustitución de 25% PS o 25% CL fue prácticamente similar (Franchini, 2006). Por lo tanto, es probable que ni la fase, ni el tamaño varíen sustancialmente entre las vesículas de diferente composición, al menos de tal forma que permitan explicar tan marcada preferencia de ambas subunidades de EgAgB por las vesículas ricas en CL. Por tanto para elucidar si en nuestros ensayos es más importante la contribución de interacciones electrostáticas o de interacciones específicas con la CL, sería necesario realizar experimentos con SUVs de similar densidad de carga superficial negativa que las SUVs ricas en CL, pero que no contengan este fosfolípido.

Como se ha comentado anteriormente, este tipo de análisis de transferencia de ligando no se ha realizado anteriormente para ninguna proteína de la familia de las HLBP. Por ello para comparar los resultados obtenidos en este trabajo con datos previos, a continuación haremos referencia a los datos obtenidos para otras LBPs (Hsu & Storch, 1996; McDermott et al., 2002; Falomir Lockhart et al., 2009; Porfido et al., 2012). No obstante, debemos mantener en mente que estas proteínas tienen una estructura distinta a la que podría adoptar el EgAgB, ya que ninguna de ellas tiene una variedad tan amplia de lípidos, forma oligómeros de mayor tamaño, ni se ha reportado que en su forma nativa formen estructuras lipoproteicas como la que han sido

sugeridas para el EgAgB (Obal et al., 2012). Como se ha comentado anteriormente, si bien los mecanismos de transferencia de EgAgB8/2 y EgAgB8/3 hacia vesículas de PC parecen ser diferentes, tienen valores de velocidad de transferencia del mismo orden, indicando que ambas proteínas transfieren el ligando con una velocidad similar, a pesar de hacerlo por vías distintas. Por el contrario, al comparar otras LBP que transfieren sus ligandos mediante distintos mecanismos se verificó que las velocidades de transferencia fueron distintas. Tal es el caso de las proteínas FABPs de hígado y de intestino de rata. La FABP de intestino transfiere sus ligandos mediante un mecanismo de tipo “colisional”; mientras que la FABP de hígado lo hace mediante un mecanismo de tipo “difusional” (Hsu & Storch, 1996). Al comparar las velocidades de transferencia de ambas proteínas empleando distintos AOFAs, se encontró que la proteína FABP de intestino transfiere los ligandos más rápido que la FABP de hígado, existiendo una diferencia de un orden de magnitud entre sus velocidades de transferencia (Hsu & Storch, 1996). Algo similar se observó al comparar las velocidades de transferencia para la proteína de la familia de las poliproteínas de nematodos ABA-1-A1 y la proteína FABP de *Schistosoma japonicum* (Sj-FABPc). La proteína Sj-FABPc transfiere sus ligandos empleando un mecanismo de tipo “colisional”, mientras que la proteína ABA-1-A1 lo hace mediante un mecanismo de tipo “difusional” (McDermott et al., 2002). También en este caso los valores de velocidad de transferencia fueron un orden mayor para la Sj-FABPc que para la proteína ABA-1-A1 (McDermott et al., 2002). Además, para las proteínas clasificadas como “colisionales”, es decir aquellas proteínas para las que el paso limitante en la cinética de transferencia es la colisión con la membrana, en general se ha observado que las velocidades de transferencia aumentan de forma proporcional con los incrementos en la concentración de las vesículas. Esto significa que al duplicar la concentración de vesículas, se duplica el valor de la velocidad de transferencia, como se ha observado para la FABP de intestino, la Sj-FABPc, la proteína EgFABP-1 de *E. granulosus* o la YLSCP2, una LBP de la levadura *Yarrowia lipolytica*, entre otros ejemplos (Hsu & Storch, 1996; McDermott et al., 2002; Falomir Lockhart et al., 2009; Porfido et al., 2012). Sin embargo, si bien en este trabajo se observó que la velocidad de transferencia aumentó significativamente para la proteína EgAgB8/2 al duplicar la concentración de vesículas, este aumento no representó el doble. Por otro lado, en el caso de las proteínas clasificadas como “difusionales”, es decir aquellas proteínas para las que el paso limitante en la cinética de transferencia es la disociación del complejo proteína-ligando, en general se observa que la velocidad de transferencia no varía al modificar la composición de las vesículas, como se ha observado para las proteínas

FABP de hígado, ABA-1-A1 u Ov-FAR-1 (Hsu & Storch, 1996; McDermott et al., 2002). Sin embargo, en este trabajo encontramos que la proteína EgAgB8/3, que parece transferir el 12-AS empleando este tipo de mecanismo, es sensible a los cambios la composición de las vesículas, ya que como se comentó más arriba, la velocidad de transferencia aumentó significativamente al emplear vesículas conteniendo 25 % de CL. En conjunto, la comparación de los resultados obtenidos en este trabajo para las subunidades de EgAgB y los resultados reportados por otros autores para otras LBPs, sugieren que ambas subunidades de EgAgB no presentan un comportamiento clásicamente “colisional” o “difusional” como el reportado para las proteínas de la familia de las FABPs, o incluso para LBPs con estructura de tipo  $\alpha$ -helicoidal como las proteínas YLSCP2, ABA-1-A1 u Ov-FAR-1. Esto sugiere que estas subunidades se comportan de un modo intermedio que no parece ser exactamente igual a ninguno de los mecanismos “colisional” o “difusional” clásicos que emplean otras LBPs para transferir sus ligandos *in vitro*. Ensayos de este tipo con otras proteínas de la familia de las HLBP podrían indicarnos si este tipo de comportamiento es único de las subunidades de EgAgB o es compartido por otros miembros de esta familia.

Como resumen de los resultados discutidos en referencia al cuarto objetivo de este trabajo, se logró aplicar con éxito una técnica utilizada para el análisis de la capacidad de otras LBPs de transferir sus ligandos a una HLBP. Mediante esta técnica se observó que las subunidades de EgAgB8/2 y EgAgB8/3 son capaces de transferir AOFAs hacia membranas fosfolipídicas artificiales. Si bien esta situación puede ser muy diferente a la situación fisiológica, desde el punto de vista de los ligandos unidos al EgAgB, de la estructura que las subunidades unidas a los lípidos adopten *in vivo* y del tipo de membranas con la que la partícula podría interactuar, estos estudios constituyen el primer indicio de que las subunidades son potencialmente capaces de transferir ácidos grasos en la proximidad de una membrana fosfolipídica.

#### **4.5. Análisis de la capacidad del EgAgB nativo de unirse a monocitos y macrófagos**

##### **4.5.1. Contribución de los componentes proteicos y lipídicos en la unión a monocitos y macrófagos**

En cuanto a las funciones propuestas para el EgAgB, se ha postulado que es una molécula importante en la interacción entre el parásito y su hospedador, favoreciendo

respuestas tendientes a generar un perfil menos inflamatorio que resulte más beneficioso para el parásito. En particular, se han descrito varios efectos moduladores del EgAgB en células de la línea mieloide (Siracusano et al., 2008). Más específicamente, nuestro grupo centró parte de sus estudios en el análisis de la interacción entre el EgAgB y monocitos/macrófagos. Mediante ensayos de citometría de flujo se logró establecer que el EgAgB nativo es capaz de unirse a estas células, inhibir la translocación al núcleo de la subunidad p65 del factor nuclear  $\kappa$ B y posiblemente de este modo inducir la disminución de síntesis de interleuquinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa y la IL-1 (Ramos, 2008). Dado que estos datos fueron obtenidos empleando el EgAgB nativo, no se ha establecido si estos efectos son mediados por la porción lipídica o proteica del EgAgB. Establecer que interacciones se dan entre esta HLBP y las células es fundamental para avanzar en qué mecanismos moleculares se asocian a estos efectos anti-inflamatorios y qué otras consecuencias podrían tener sobre la biología de monocitos y macrófagos.

Con el fin de avanzar en las interacciones entre el EgAgB nativo y los monocitos y macrófagos nos propusimos evaluar en primer lugar en qué medida las subunidades proteicas del EgAgB contribuyen a la unión de esta HLBP a estas células. Para esto utilizamos las subunidades de EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 libres de lípidos, la línea humana THP-1 y macrófagos peritoneales obtenidos de ratones estimulados por vía intraperitoneal con preparaciones pro-inflamatorias. En todos los casos la unión se examinó por citometría de flujo tal como se detalló previamente (ver ítem 3.5.1). Los resultados mostraron que algunas subunidades de EgAgB libres de lípidos son reconocidas tanto por células derivadas de la línea celular THP-1 como por macrófagos peritoneales de ratón. En particular se encontró que las subunidades EgAgB8/1 y EgAgB8/3 se unieron a monocitos y en mayor medida a macrófagos derivados de la línea THP-1, mientras que la subunidad EgAgB8/2 no presentó unión a los monocitos y fue pobremente reconocida por los macrófagos. También se observó una fuerte unión de EgAgB8/3 y EgAgB nativo a macrófagos inflamatorios colectados del peritoneo de ratones, pero no a linfocitos colectados del mismo modo. Cabe mencionar que en estos ensayos las células siempre fueron mantenidas en frío y en presencia de azida de sodio para evitar la internalización de las subunidades de EgAgB. En conjunto, estos resultados sugieren que los monocitos y macrófagos poseen una superficie celular capaz de unir al EgAgB, eventualmente a través de una o más moléculas que funcionarían como receptores para las subunidades de EgAgB, reconociendo particularmente a las subunidades EgAgB8/1 y EgAgB8/3. Esta especificidad de reconocimiento está de acuerdo con el hecho de que a nivel proteico

las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/3 y EgAgB8/5 presentan mayor similitud entre sí que con las subunidades EgAgB8/2 y EgAgB8/4; y viceversa (ver Figura 1.12). Asimismo, dado que se observó que los valores de índice de unión fueron siempre mayores en el caso de los macrófagos en comparación con los monocitos, el eventual receptor del EgAgB parecería estar más expresado en las células diferenciadas; aunque no puede descartarse la posibilidad de que al diferenciarse las células expresen un receptor distinto que también sea capaz de reconocer específicamente a las subunidades EgAgB8/1 y EgAgB8/3. Además, dado que se trabajó con las subunidades libres de lípidos, estos resultados sugieren que la partícula de EgAgB nativo es reconocida por los monocitos y macrófagos a través de algunas de sus subunidades proteicas, en particular por EgAgB8/1 y EgAgB8/3.

Por otro lado, como la partícula nativa de EgAgB podría adoptar una estructura similar a la de las lipoproteínas plasmáticas (Obal et al., 2012), es probable que los lípidos, principalmente los lípidos polares (fosfolípidos) expuestos en la superficie de la partícula puedan participar en las interacciones con distintos blancos moleculares. Estos fosfolípidos podrían modificar la forma en que se exponen las subunidades para interactuar con su(s) receptor(es), o podrían establecer interacciones directas con receptores sobre las células. Dado que en la partícula de EgAgB nativo la PC es el fosfolípido mayoritario, en este trabajo se evaluó la participación de la PC en esta interacción. Como estrategia inicial se modificó la PC presente en el EgAgB nativo mediante acción de la enzima PLD. Como ya se comentó en los capítulos previos, esta enzima actúa hidrolizando la PC liberando la colina y dejando una molécula de ácido fosfatídico. Este cambio modifica la cabeza polar de la PC, siendo posiblemente la región más expuesta de este fosfolípido en la partícula de EgAgB nativa. Los resultados obtenidos mostraron que el EgAgB nativo tratado con PLD disminuyó su capacidad de unión a los monocitos y macrófagos de la línea THP-1 en más de un 80%, indicando que la PC contribuye de alguna manera a la interacción del EgAgB nativo con estas células. Estos estudios no permiten diferenciar si la contribución de la PC ocurre en forma directa con un eventual receptor, o bien si la modificación de la PC altera la forma en que se exponen las subunidades de EgAgB, particularmente EgAgB8/1 y EgAgB8/3, que son las subunidades mayormente reconocidas por estas células de acuerdo a los resultados comentados previamente. Como forma de evaluar si la interacción es directa, se estudió si vesículas de fosfolípidos ricas en PC compiten directamente por la unión del EgAgB a las células. Para esto se realizaron ensayos pre-incubando las células con vesículas de PC o compuestas por 50% de PC y 50% de PS (PC/PS). En estos ensayos se encontró que al emplear vesículas ricas en PC

la interacción del EgAgB con los monocitos de la línea THP-1 disminuyó solamente en un 10%, mientras que no disminuyó al emplear las vesículas de PC/PS. Esta disminución no alcanzó los niveles observados para el EgAgB tratado con PLD, sugiriendo que la PC contribuye a la forma en que las subunidades se presentan en la partícula nativa, más que mediando una interacción directa con las células. No obstante, también debemos considerar que al modificar la PC expuesta en la partícula de EgAgB nativo y sustituirla por ácido fosfatídico mediante acción de la PLD, es posible que aumente significativamente la carga negativa sobre la partícula de EgAgB. Este aumento de carga neta negativa podría actuar inhibiendo la unión de esta HLBP a las células, sin que esto afecte en gran medida la exposición de las subunidades EgAgB8/1 y EgAgB8/3 en la partícula nativa.

A partir de los resultados discutidos previamente, se desprende que los monocitos y macrófagos expresan estructuras en sus membranas celulares, eventualmente receptores, capaces de reconocer algunas subunidades del EgAgB, por lo que es posible pensar que a través de esta interacción el EgAgB nativo pueda ejercer parte de los efectos moduladores descritos sobre estas células. Por otro lado, la presencia de varias subunidades proteicas del EgAgB por partícula de antígeno nativo facilitaría la interacción de la macromolécula con las células a través del fenómeno de avidéz. Además, el componente PC del EgAgB jugaría un papel importante en su interacción con las células, probablemente a través de la forma en que las subunidades proteicas, quedan expuestas en la partícula.

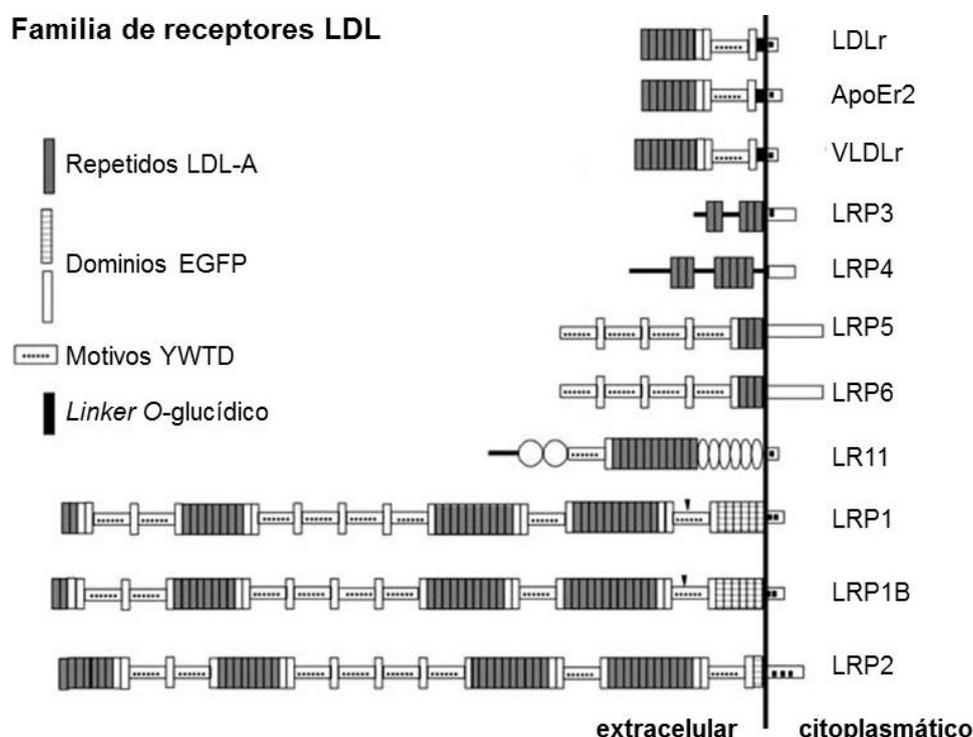
#### 4.5.2. Estudio preliminar de receptores involucrados en el reconocimiento del EgAgB por monocitos y macrófagos

Trabajos preliminares llevados a cabo por nuestro grupo, sugirieron que las lipoproteínas plasmáticas HDL y LDL nativas, pero no oxidadas, fueron capaces de inhibir parcialmente (25-30%) la unión del EgAgB nativo a los monocitos (Ramos, 2008). Estas lipoproteínas se unen a diferentes tipos de receptores, en general a través del reconocimiento de las apolipoproteínas que las componen. Dentro de los distintos tipos de receptores de lipoproteínas conocidos y mayormente caracterizados se encuentran el receptor de LDL (LDLr), la familia de proteínas relacionadas al LDLr, los receptores barrenderos o *scavenger* (Schneider, 2008) y las proteínas de la familia de transportadores ABC que participan en el transporte reverso de colesterol (Fielding and Fielding, 2008). Algunos de estos receptores son expresados por monocitos y macrófagos, incluyendo los monocitos de la línea celular THP-1 (Bejta et al., 2007;

Sporstøl et al., 2007), por lo que podrían ser candidatos a reconocer al EgAgB en estas células. Para comprender que motivos moleculares podrían ser reconocidos en el EgAgB por estos receptores, a continuación se discutirán algunas características generales de los mismos, según lo revisado por Schneider (Schneider, 2008).

El LDLr es una glicoproteína integral de membrana altamente conservada que se divide en 5 dominios distintos, tres de ellos extracelulares, uno transmembrana y uno citoplasmático (Schneider, 2008). El primer dominio extracelular, correspondiente a la región amino terminal de la proteína, es el dominio de unión al ligando. Este dominio se compone de siete módulos repetidos que se denominan módulos LDL-A (del inglés *LDL receptor type A*). En cada módulo LDL-A se expone una región rica en aminoácidos cargados negativamente, como ácido aspártico y ácido glutámico (Jeon & Blacklow, 2005). Las regiones que conectan cada módulo repetido con el siguiente le brindan flexibilidad al dominio de unión, de forma tal de poder acomodar lipoproteínas de distinto tamaño. El dominio LDL-A también está presente en diferente número de copias en toda la familia de receptores de LDL, entre los que también se incluyen las proteínas relacionadas al LDLr (LRP del inglés *LDLr related protein*), como se observa en la Figura 4.4 (Schneider, 2008). El dominio LDL-A del LDLr es capaz de reconocer a la apolipoproteína B de la LDL, así como a otras lipoproteínas ricas en apolipoproteína E, a través de interacciones entre los residuos negativos del receptor y los aminoácidos positivos de las apolipoproteínas (Jeon & Blacklow, 2005; Schneider, 2008). En particular, en el caso de la apolipoproteína E, la cuarta  $\alpha$ -hélice de la proteína posee una región rica en aminoácidos como arginina y lisina que forman una zona con potencial electrostático positivo, permitiendo la interacción de lipoproteínas ricas en apolipoproteína E con el dominio LDL-A, tanto en el LDLr, como en el LRP1. Esto ha sido reproducido empleando distintos péptidos sintéticos derivados de la apolipoproteína E, todos ellos con alto contenido de aminoácidos cargados positivamente en una de las caras de la  $\alpha$ -hélice (Dyer & Curtiss, 1991; Dyer et al., 1995; Datta et al., 2000; Schneider, 2008). Cabe destacar que las subunidades de EgAgB contienen una cantidad importante de argininas y lisinas en su secuencia y de acuerdo a datos de modelado molecular posee regiones con potencial electrostático positivo (ver Figura 4.6), por lo que compartirían algunas características con las apolipoproteínas que se unen a estos receptores. Más aún, se ha establecido que algunas de estas apolipoproteínas inhiben la síntesis de interleuquinas proinflamatorias inducida por LPS en macrófagos murinos de la línea celular RAW 264.7 (Zhu et al., 2010), de forma similar a lo observado para el EgAgB nativo en las células THP-1 (Ramos, 2008). Sumado a esto, se ha descrito que los motivos de

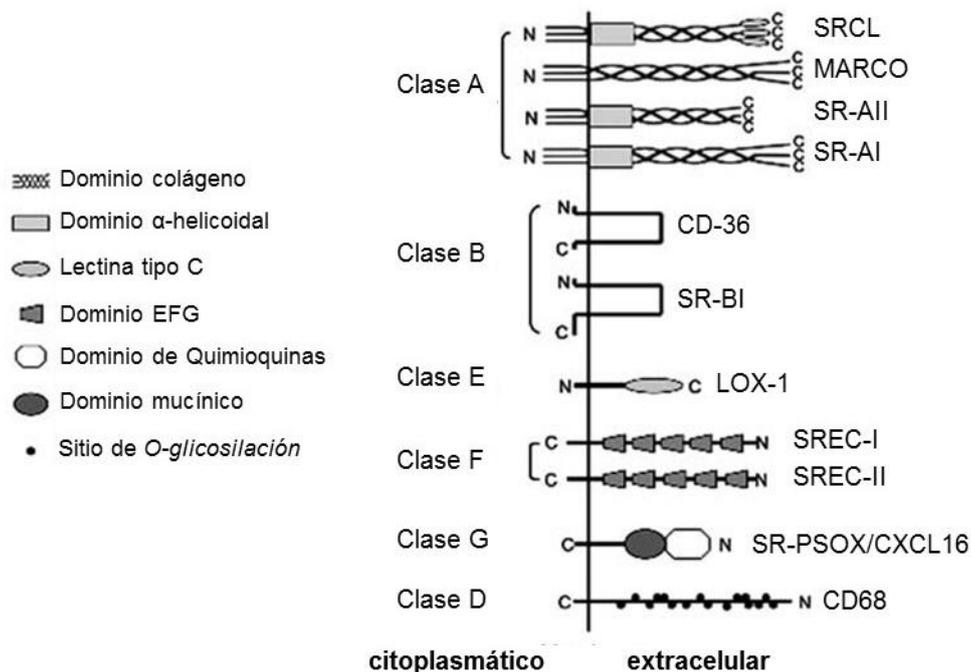
proteoglicanos de heparan sulfato que se encuentran en la superficie de diversos tipos celulares también participan en la interacción con los residuos positivos de la apolipoproteína E, para luego interactuar con el receptor LRP1 (Mahley et al., 1994; Al-Haideri et al., 1997; Datta et al., 2000). Los proteoglicanos de heparan sulfato no se expresan en los monocitos de la línea celular THP-1, pero si se expresan en estas células luego de la diferenciación con PMA (Edwards et al., 1995). Dado que el EgAgB es capaz de unirse a motivos de heparina (Barbieri et al., 1993), sería posible que también interaccionan con estos motivos en la superficie de los macrófagos diferenciados con PMA, potenciando la unión a estas células, coincidentemente con los datos experimentales observados en este trabajo. Ensayos de unión similares a los realizados en este trabajo empleando macrófagos THP-1 pre-tratados con heparinasas permitiría explorar esta posibilidad. En conjunto, esta información permite proponer que el EgAgB podría ser reconocido por receptores de la familia de LDL (directamente o a través de la unión a proteoglicanos de heparan sulfato) y mediante esta interacción inducir un fenotipo tendiente a moderar la respuesta inflamatoria de los macrófagos, tal como ha sido observado experimentalmente.



**Figura 4.4: Esquema ilustrativo de los distintos receptores pertenecientes a la familia de receptores de LDL.** Se destacan las estructuras principales compartidas por los distintos receptores de esta familia, los motivos repetidos LDL-A, los dominios con homología al precursor del factor de crecimiento epidérmico (EGFP), los motivos consenso compuestos por el tetrapéptido tirosina-triptófano-treonina-ácido aspártico (YWTD) y el *linker* O-glucídico. Adaptado de Schneider, 2008.

Otro posible grupo de receptores de lipoproteínas son los receptores barrenderos o *scavenger* (SR). Existen varios tipos de SR, que se clasifican en seis grupos, denominados A, B, D, E, F y G; de acuerdo a su estructura primaria, al tejido en que se expresan y/o a su posible función. En el contexto de la unión a lipoproteínas, los más estudiados son los SR de clase A (SR-A), de clase B (SR-B1 y CD36) y de clase E (LOX-1). Un esquema ilustrativo de estos receptores se observa en la Figura 4.5 (Schneider, 2008). Existen distintos tipos de receptores SR de clase A, entre ellos se encuentran el SR-AI, SR-AII, SR-AIII y el receptor MARCO. Estos receptores se expresan en varios tipos celulares, principalmente en células mieloides (Plüddemann et al., 2007). Los SR-A poseen dominios extracelulares ricos en colágeno que participan de la unión al ligando (ver Figura 4.5). Los receptores SR de clase B, son receptores que contienen dos dominios transmembrana y una región extracelular altamente glicosilada. Los tres miembros de SR de clase B, CD36, SR-BI y SR-BII, comparten este tipo de estructura. Los receptores SR presentan una alta promiscuidad en cuanto a los ligandos que pueden unir, se sabe que los receptores SR-A unen LDL modificada (oxidada o acetilada); mientras que los SR-B también son capaces de unir lipoproteínas nativas como HDL, LDL y VLDL. Además, ambos tipos de receptores son capaces de unir células apoptóticas, péptidos amiloideos y fosfolípidos aniónicos, entre otros ligandos (Murphy et al., 2005; Moore & Freeman, 2006; Plüddemann et al., 2007). Estos datos indicarían que moléculas ricas en cargas negativas podrían ser ligandos de estos receptores. Como se discute con más detalle en el ítem siguiente, los modelados de las subunidades de EgAgB mostraron que éstas podrían presentar regiones con potencial positivo y negativo claramente diferenciadas (ver Figura 4.6), por lo que los receptores SR, tanto de clase A, como de clase B, podrían estar reconociendo a las subunidades de EgAgB a través de sus zonas con potencial de carga negativo. No obstante, dado que en ensayos previos llevados a cabo por nuestro grupo se determinó que la LDL oxidada no fue capaz de inhibir la unión del EgAgB nativo a las células (Ramos, 2008), es poco probable que algunos de ellos, en particular el receptor SR-AII, que une mayoritariamente LDL oxidada, esté involucrado en esta interacción. En el mismo sentido, es posible suponer que el receptor SR de clase E, LOX-1, tampoco participaría en este reconocimiento.

## Receptores SR



**Figura 4.5: Esquema ilustrativo de los distintos receptores SR.** Se muestran algunos ejemplos de SRs de las clases A, B, D, E, F y G. Se indican los dominios correspondientes a dominios de colágeno, dominios  $\alpha$ -helicoidales, dominios de lectina tipo C, dominios similares al factor de crecimiento epidérmico (EFG), dominio de quinonas, dominio mucínico y sitios de O-glicosilación. Adaptado de Schneider, 2008.

Por otro lado, otras proteínas que podrían estar relacionadas con el reconocimiento del EgAgB son las proteínas pertenecientes a la familia de transportadores dependientes de ATP, denominadas ABC (del inglés *ATP-binding cassette*). Los transportadores ABC median el transporte de diversos tipos de moléculas a través de membranas extra e intracelulares (Voelker, 2008). En particular los transportadores ABC de tipo A y G han sido implicados en la interacción con la HDL participando en el transporte reverso de colesterol (Fielding & Fielding, 2008). En este sentido, los transportadores ABCA1 y ABCG1 participan en este mecanismo en los macrófagos (Sporstøl et al., 2007; Wang et al., 2007). El transportador ABCA1 participa en el transporte reverso de colesterol hacia la apolipoproteína AI libre de lípidos, mientras que el transportador ABCG1 cumple una función similar pero mediando el eflujo de colesterol hacia las partículas de HDL maduras (Wang et al., 2007). Se ha determinado que el transportador ABCA1 interacciona directamente con la apolipoproteína AI y otras apolipoproteínas relacionadas, posiblemente mediante el reconocimiento de distintos péptidos anfipáticos (Fitzgerald et al., 2004; Wang et al., 2007). Asimismo se ha determinado que la interacción de las apolipoproteínas con

este transportador dispara diversas vías de señalización en los macrófagos (Wang et al., 2007). Cabe mencionar que a diferencia de otros receptores de lipoproteínas mencionados anteriormente, como los SR, estos transportadores no son fagocíticos, por lo cual no involucran la internalización de las apolipoproteínas con las que interactúan, permitiendo que estas se carguen de ligandos. Este mecanismo podría ser importante considerando la hipótesis de que el EgAgB interactúe con distintos tipos de células para obtener los ligandos que son esenciales para el parásito, como podría ser el colesterol.

De acuerdo con las propiedades de reconocimiento de los distintos receptores discutidos previamente y teniendo en cuenta los datos preliminares obtenidos por nuestro grupo sobre la inhibición de la unión del EgAgB a monocitos THP-1 por HDL y LDL (Ramos, 2008), en este trabajo se intentó profundizar en este análisis. Cabe mencionar que en el trabajo de Ramos, la unión a las células se reveló empleando el anticuerpo monoclonal Mo-EB7, que reconoce específicamente a la subunidad EgAgB8/1 (Ramos, 2008). Dado que durante el desarrollo de este trabajo observamos que también la subunidad EgAgB8/3 participa de la interacción, para este análisis empleamos el EgAgB marcado con biotina con el fin de evaluar la unión a las células considerando las distintas subunidades que la partícula pueda contener. Para estos análisis se pre-incubaron monocitos THP-1 con HDL o LDL y posteriormente se evaluó la unión del EgAgB marcado a biotina a estas células, revelando la interacción con estreptavidina-FITC. Si bien en estos ensayos se observó una ligera disminución de la unión del EgAgB en las células pre-incubadas con LDL y en mayor medida con HDL, esta tendencia no mostró significancia a nivel estadístico para ninguna de las dos lipoproteínas plasmáticas. Estos resultados sugieren que la unión del EgAgB a los monocitos no involucraría receptores compartidos con HDL o LDL. No obstante, el diseño experimental para evaluar la competencia con las lipoproteínas plasmáticas no resulta sencillo. Por un lado, en estos ensayos el EgAgB y las lipoproteínas no se agregaron conjuntamente para evitar posibles interacciones entre ambos que inhibieran la unión del EgAgB a las células, ya que se conoce que interacciones entre diferente tipo de lipoproteínas ocurren en plasma, por ejemplo para intercambiar sus lípidos (Jonas & Phillips, 2008). Por otro lado, el hecho de pre-incubar las células con HDL o LDL y luego retirarlas para incubarlas con el EgAgB puede desplazar el equilibrio entre las lipoproteínas plasmáticas y sus receptores, llevando a que algunos receptores queden libres y disponibles para luego unirse al EgAgB. Además, diferencias en relación a los resultados obtenidos por Ramos podrían deberse a los distintos métodos que se emplearon para detectar la unión a los monocitos. Dado que

en el trabajo de Ramos las partículas de EgAgB nativo ricas en EgAgB8/3 podrían no ser detectadas, no se puede descartar que la subunidad EgAgB8/1 y EgAgB8/3 estén siendo reconocidas por distintas contrapartes moleculares, y que solo las partículas que contengan EgAgB8/1 sean reconocidas por receptores compartidos con la HDL o LDL. En conjunto, estos ensayos no son concluyentes y se requieren aproximaciones experimentales alternativas para elucidar la participación de este tipo de receptores en la unión del EgAgB a monocitos. Más aún, la participación de los receptores de lipoproteínas en la unión del EgAgB a macrófagos deberá ser explorada a futuro.

De la información discutida anteriormente se desprende que la diversidad de receptores potencialmente capaces de reconocer partículas lipoproteicas, y por tanto eventualmente al EgAgB, es muy amplia. Además, no puede descartarse que estén involucrados otros receptores no relacionados con el reconocimiento de lipoproteínas plasmáticas. Así, la identificación de la contraparte molecular del EgAgB en los monocitos y macrófagos es un objetivo particular que no llegamos a abordar en esta tesis y que está siendo abordado por la Lic. Maite Folle, en el marco de su trabajo de posgrado (Cátedra de Inmunología, UdelaR, Uruguay). Este análisis implica ensayos de competencia empleando ligandos de los receptores LRP1 y SR-AI en forma similar a lo descrito por Bejta y colaboradores (Bejta et al., 2007), así como ensayos de unión empleando macrófagos de ratones deficientes en el LDLr. Además se está desarrollando una estrategia de co-inmunoprecipitación del receptor empleando las subunidades recombinantes de EgAgB libres de lípidos, particularmente EgAgB8/3 dado que de acuerdo a los resultados presentados en esta tesis, es la subunidad que presenta mayor interacción con los monocitos y macrófagos. Esta aproximación experimental fue llevada a cabo anteriormente empleando EgAgB nativo, pero debido a la naturaleza lipídica de esta partícula y a su capacidad de establecer interacciones no específicas a través de estos lípidos, estos ensayos no brindaron buenos resultados (Ramos, 2008). Por ese motivo, a partir de la obtención de las subunidades libres de lípidos, se consideró la posibilidad de emplearlas en un ensayo similar que evite las interacciones inespecíficas dadas por los lípidos del EgAgB nativo.

Como resumen de los resultados discutidos en referencia al quinto objetivo de este trabajo, se logró determinar que los monocitos y macrófagos de la línea celular THP-1 son capaces de reconocer a las subunidades de EgAgB libres de lípidos, en particular EgAgB8/1 y EgAgB8/3, resultados que fueron confirmados utilizando macrófagos primarios de ratón. Asimismo, se pudo determinar que la PC posiblemente expuesta en la superficie de la partícula es un fosfolípido importante que podría modificar la interacción del EgAgB a las células. Los datos obtenidos sugieren que la

participación de la PC sería principalmente modificando la forma en que las subunidades se exponen en la partícula nativa, más que uniéndose directamente al receptor. Con el fin de aportar conocimiento sobre las posibles contrapartes moleculares que estén reconociendo al EgAgB en las células, consideramos el hecho de que el EgAgB podría adoptar una estructura similar a la de las lipoproteínas plasmáticas y que comparte similitudes con algunos motivos moleculares que los receptores de lipoproteínas reconocen en otras apolipoproteínas. Sumado a esto, los datos preliminares obtenidos por nuestro grupo nos llevaron a pensar que el EgAgB podría utilizar receptores compartidos con algunas de ellas. Sin embargo los ensayos de competencia con HDL y LDL llevados a cabo en este trabajo no brindaron resultados concluyentes en cuanto a la posible participación de estos receptores. Otras estrategias experimentales serán necesarias para elucidar que receptores están involucrados en la interacción del EgAgB con monocitos y macrófagos.

#### **4.6. Discusión general**

El presente trabajo ha permitido avanzar en el conocimiento estructural del EgAgB, determinando las posibles interacciones que las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 pueden establecer consigo mismas y con ácidos grasos y colesterol como ligandos, así como también en aspectos relacionados a la posible función de esta molécula, a través del análisis de la capacidad de dichas subunidades de transferir sus ligandos a membranas y de interactuar con monocitos y macrófagos.

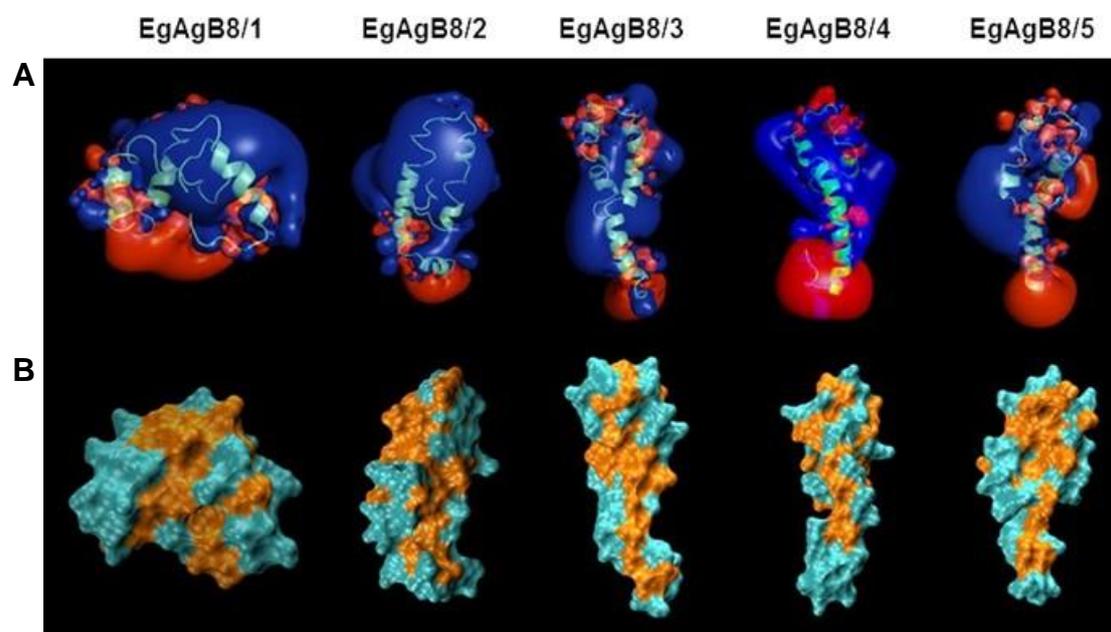
Respecto a los conocimientos generados sobre la estructura del EgAgB, ha sido un logro importante el ajuste de un método que permite obtener las subunidades recombinantes libres de los ligandos lipídicos bacterianos; esto abre la posibilidad de obtener información estructural de estas subunidades en su forma *apo* y *holo*, es decir libres de los lípidos o asociadas a sus ligandos nativos. En este sentido, durante el desarrollo de este trabajo de tesis se planteó la posibilidad de analizar estructuralmente estas subunidades mediante la técnica de resonancia magnética nuclear. Sin embargo, el hecho de que las subunidades no se encuentran en solución como monómeros, sino formando oligómeros de mayor tamaño dificultó este estudio.

Como alternativa para aportar información de estas subunidades a nivel estructural, como se comentó en los ítems anteriores, recientemente hemos establecido una colaboración con el grupo de Biofísica del Departamento de Física de la Universidad Nacional del Sur (UNS, Bahía Blanca, Argentina) dirigido por el Dr.

Marcelo Costabel con la finalidad de aproximarnos a la estructura de estas subunidades mediante modelado molecular. Las conformaciones de las distintas subunidades obtenidas mediante modelado por homología fueron construidas por el Dr. Costabel y el Lic. Fernando Zamarreño empleando el programa *Modeller9v3* y los perfiles electroestáticos e hidrofóbicos fueron obtenidos utilizando el programa *Adaptive Poisson–Boltzmann Solver*. Los modelos obtenidos para las cinco subunidades de EgAgB se observan en la Figura 4.6. Estos modelos muestran diferencias con los modelos determinados previamente, en donde las subunidades de EgAgB mostraron una estructura  $\alpha$ -helicoidal mayormente extendida (Monteiro et al., 2007). Como se observa en el panel A de la Figura 4.6, el modelado sugiere que las cinco subunidades presentan una estructura con un alto contenido  $\alpha$ -helicoidal, tal como se observó experimentalmente mediante CD para las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 libres de lípidos. Mediante el análisis de CD también se determinó la presencia de estructuras correspondientes a plegamiento al azar o *random coil*, lo cual concuerda con el hecho de que en estos modelos las subunidades muestran diversas regiones con este tipo de plegamiento. Asimismo, se puede observar que el modelado sugiere que la estructura adoptada por la subunidad EgAgB8/1 es distinta a la adoptada por las otras subunidades. Es interesante el hecho que experimentalmente observamos diferencias en el comportamiento en RP-HPLC de la subunidad EgAgB8/1 respecto de las subunidades EgAgB8/2 y EgAgB8/3, que sugería que la primera presenta un componente más hidrofóbico. Este comportamiento diferencial podría estar relacionado con la diferencia en la conformación adoptada por la subunidad EgAgB8/1, según los estudios *in silico* antes mencionados. En cualquier caso, estas diferencias en la conformación deberían ser comprobadas con otras herramientas de análisis estructural.

Los modelos de las subunidades de EgAgB también sugieren la presencia de regiones con densidad de carga claramente diferenciadas como positivas y negativas (indicadas en colores azul y rojo en el panel A de la Figura 4.6), así como también la presencia de regiones hidrofóbicas e hidrofílicas (indicadas en colores celeste y naranja en el panel B de la Figura 4.6). Estas características sugieren que los monómeros de estas subunidades son potencialmente capaces de establecer interacciones electrostáticas consigo mismas a través de estas regiones, lo cual concuerda con los resultados experimentales obtenidos en este trabajo, donde se observó que las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 forman oligómeros aún en ausencia de los lípidos.

Por otro lado, el hecho de que existan regiones hidrofóbicas también sugiere que estas subunidades son capaces de interactuar con ligandos hidrofóbicos. En este sentido, el uso de distintas sondas fluorescentes mostró que las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 son capaces de unir análogos de ácidos grasos de 16 y 18 carbonos (16-AP y 12-AS), mientras que no fueron capaces de unir análogos de 11 carbonos (DAUDA). Esto podría estar relacionado con el hecho de que el parásito está adaptado a expresar proteínas que unan aquellos ácidos grasos que se encuentran mayormente presentes en su entorno natural, es decir en el líquido hidático (Obal et al., 2012). Además, en este trabajo se encontró que estas subunidades no fueron capaces de unir el análogo de colesterol DHE, sugiriendo que en la partícula nativa estas subunidades no estarían involucradas en la interacción directa con el colesterol. Asimismo, el hecho de que las subunidades recombinantes purificadas a partir de *E. coli* presentaran principalmente PE y CL unidos, siendo éstos los lípidos polares mayoritarios en la bacteria, mostró que las tres subunidades también son capaces de unir fosfolípidos, lo que sugiere que en la partícula nativa los fosfolípidos y estas subunidades de EgAgB podrían interactuar entre sí.



**Figura 4.6. Modelos de las subunidades de EgAgB.** Se muestran los modelos estructurales para las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/2, EgAgB8/3, EgAgB8/4 y EgAgB8/5 obtenidas mediante modelado por homología tal como se detalló en el texto. **(A)** Se muestran los perfiles electrostáticos positivos (azul) y negativos (rojo). **(B)** Se muestran las regiones hidrofílicas (naranja) e hidrofóbicas (celeste). Estos modelos respaldan la formación de oligómeros y la interacción con ligandos hidrofóbicos observada experimentalmente para las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3. Imagen gentilmente cedida por el Dr. Marcelo Costabel y el Lic. Fernando Zamarreño (Universidad Nacional del Sur).

En relación al papel del EgAgB en la biología de *E. granulosus*, como se ha comentado a lo largo de este trabajo nuestra hipótesis es que esta molécula podría participar en el transporte de lípidos entre distintos tejidos del parásito, así como también en la captación de lípidos desde el hospedador hacia el parásito, como se ha sugerido para otras HLBP (Lee et al., 2007). Si bien esto no ha sido comprobado en el caso de EgAgB, nuestra hipótesis se sustenta en varias evidencias. Primeramente, el EgAgB nativo contiene una amplia variedad de lípidos, muchos de los cuales son esenciales para el parásito, como el colesterol y los ácidos grasos (Obal et al., 2012). En segundo lugar, esta molécula se encuentra presente en la interfaz con el hospedador. Se desconoce si existe un mecanismo específico por el cual el EgAgB es transportado al exterior del metacestodo o si cambios en la pared de la hidátide durante su crecimiento en el órgano hospedador, tales como microfisuras, puedan facilitar su salida. De cualquier modo, el hecho de que el EgAgB esté presente en la interfaz con el hospedador permite suponer que esta molécula podría interactuar con distintos blancos moleculares para obtener sus ligandos. Al menos existirían dos clases de blancos posibles para esta interacción: las lipoproteínas plasmáticas y las células del hospedador que rodean al metacestodo. Los posibles mecanismos a través de los cuales el EgAgB podría participar en la adquisición y transporte de lípidos se ilustran en la Figura 4.7 y se discuten en detalle a continuación.

La idea de que el EgAgB interactúe directamente con las lipoproteínas plasmáticas del hospedador para obtener sus ligandos se desprende del hecho que las lipoproteínas plasmáticas de vertebrados tienen capacidad de intercambiar lípidos entre ellas (Fielding & Fielding, 2008). Esta interacción podría ocurrir tanto en la interfaz con el hospedador, como dentro del metacestodo, ya que se han encontrado algunas apolipoproteínas que forman parte de las lipoproteínas plasmáticas en el líquido hidático, como la apolipoproteína AI (Aziz et al., 2011) y la apolipoproteína E (Lic. Maite Folle, UdelaR, comunicación personal). La interacción entre el EgAgB y lipoproteínas plasmáticas de sus hospederos no ha sido analizada aún. Por otro lado, dado que las lipoproteínas del hospedero están en el líquido hidático, no se debe descartar la posibilidad de que ellas puedan transferir algunos ligandos hacia las células del parásito, quizás empleando los receptores de lipoproteínas que estas células expresarían (Zheng H. et al., 2013).

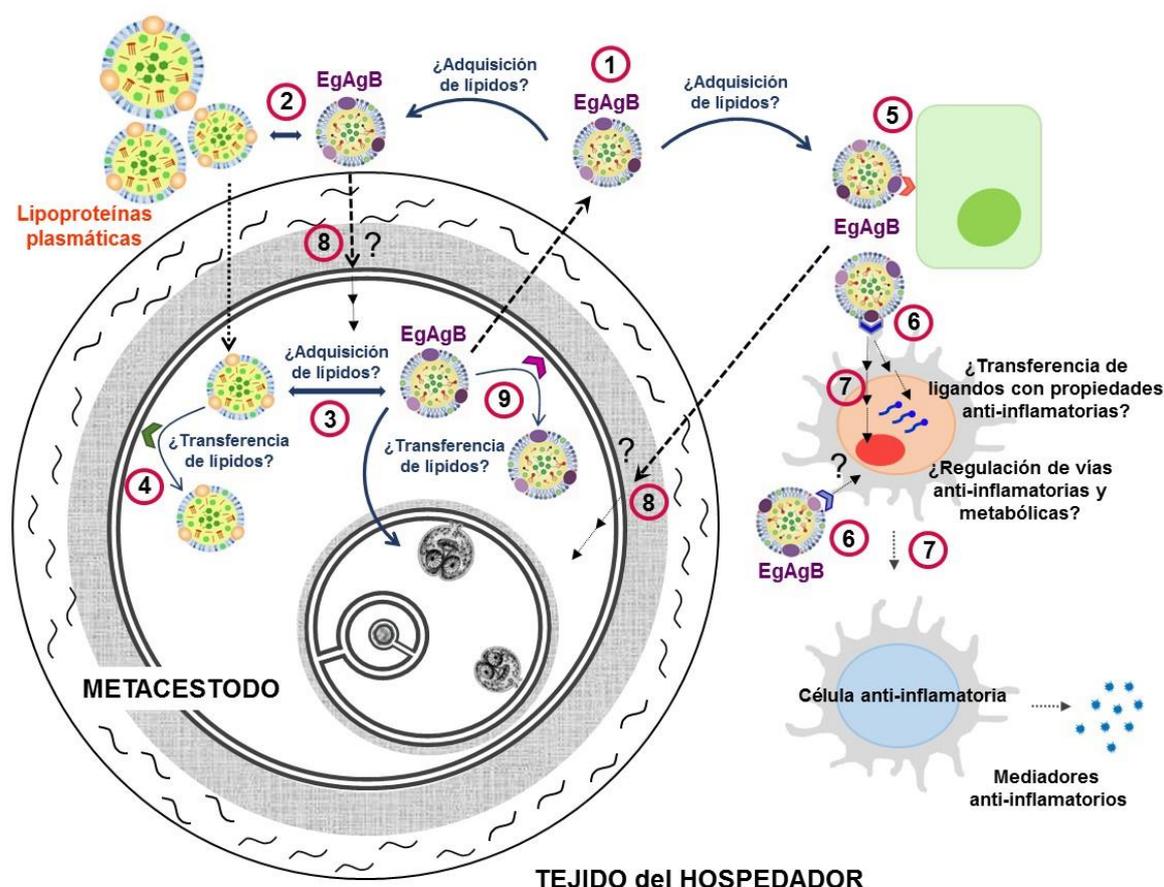
La interacción del EgAgB con células del hospedador se apoya en los efectos descritos del EgAgB sobre células de la línea mieloide (Ramos, 2008; Siracusano et al., 2008); sería posible que las interacciones que establece con estas células también le permitieran unir ligandos esenciales para el parásito. Células de origen mieloide,

como macrófagos residentes, monocitos inflamatorios o células dendríticas (ver Figura 1.15) se encuentran presentes en el entorno del metacestodo, tal como se muestra en el esquema de la Figura 4.7. La información obtenida en este trabajo apoya la idea de que el EgAgB, posiblemente a través de algunas de sus subunidades, como EgAgB8/1 y EgAgB8/3, es capaz de interactuar con monocitos y macrófagos. No obstante, teniendo en cuenta los sitios más frecuentes de localización del metacestodo, las células hepáticas o pulmonares serían los blancos más relevantes para esta interacción, pero la unión y los efectos del EgAgB sobre estos tipos celulares no han sido explorados aún.

Como se discutió en la sección anterior, aún no se ha podido determinar cuál es/son el/los receptor(es) involucrado(s) en la interacción del EgAgB con los monocitos y macrófagos. Como ya se argumentó, parecía posible suponer que receptores evolutivamente diseñados para reconocer lipoproteínas puedan estar involucrados en este reconocimiento. Dado que estas lipoproteínas intervienen en procesos metabólicos que mantienen la homeostasis del organismo en condiciones de salud, las interacciones que ellas median con los receptores no son de tipo inflamatorio, tal como se ha descrito para la HDL (Kimura et al., 2008; Murphy et al., 2012; De Nardo et al., 2014). Por esa razón sería posible que si el EgAgB emplea este tipo de receptores, esta molécula pueda ejercer una función moduladora en estas células a través de ellos. Por otro lado, también es posible que el EgAgB ejerza su función moduladora en los monocitos y macrófagos transfiriendo ligandos con propiedades anti-inflamatorias, como se muestra en el esquema de la Figura 4.7. En este trabajo se obtuvo evidencia experimental donde se observó que las subunidades de EgAgB8/2 y EgAgB8/3 son capaces de transferir sus ligandos hacia membranas artificiales. Como se ha discutido previamente, si bien estos ensayos *in vitro* seguramente difieren con el escenario en el que el EgAgB nativo se encuentra en el parásito, los resultados obtenidos sugieren que en determinadas condiciones estas subunidades de EgAgB son potencialmente capaces de transferir sus ligandos en la proximidad de una membrana fosfolipídica. Por tanto, es posible pensar que mediante la interacción con las células, algunas subunidades de EgAgB puedan transferir sus ligandos al aproximarse a la membrana plasmática. Sería importante analizar con más profundidad los lípidos del EgAgB, ya que si bien en trabajos previos hemos determinado las distintas clases que componen la partícula nativa (Obal et al., 2012), no se ha establecido si esta molécula puede contener lípidos que presenten propiedades anti-inflamatorias.

Por otra parte, debe considerarse que para que el EgAgB cumpla su función como transportador de lípidos entre diferentes tejidos del parásito, sería necesario que establezca interacciones con las células del propio parásito, como se muestra en el esquema de la Figura 4.7. En este sentido, es interesante el hecho de que el análisis del genoma de *E. granulosus* mostró que flanqueando los genes del EgAgB se encuentran genes que codifican para proteínas que presentan homología con los dominios LDL-A presentes la familia de receptores de LDL (ver Figura 4.3) (Zheng H. et al., 2013). Como se discutió anteriormente, aún no se ha podido determinar que receptores están involucrados en el reconocimiento del EgAgB en los monocitos y macrófagos, pero dentro de los posibles receptores se encuentran receptores de la familia de los receptores de LDL, ya que las subunidades de EgAgB comparten algunas características con las apolipoproteínas que estos receptores reconocen a través de los dominios LDL-A (ver ítem 4.5). Teniendo en cuenta esta información, y considerando los resultados obtenidos en este trabajo, es posible pensar que el EgAgB pueda interactuar con las células del parásito empleando este tipo de receptores y que en la cercanía de la membrana plasmática algunas subunidades puedan transferir sus ligandos hacia estas células.

A partir de los datos discutidos anteriormente, se desprende que los mecanismos involucrados en la captación y el transporte de lípidos en *E. granulosus* posiblemente son numerosos y complejos. Para elucidar la participación del EgAgB en este transporte es necesario abordar la problemática desde distintos puntos de vista. En este trabajo se encontró que el EgAgB es capaz de interactuar con monocitos y macrófagos a través de algunas de sus subunidades y que estas subunidades en la cercanía de la membrana plasmática de las células serían potencialmente capaces de transferir ligandos, particularmente ácidos grasos. Como se ha discutido, este mecanismo podría ser de importancia, teniendo en cuenta que el EgAgB podría transferir ligandos con propiedades anti-inflamatorias a las células del sistema inmune imprimiéndoles un perfil más tolerante que favorezca la permanencia del parásito en el hospedador. Asimismo, esta transferencia de ligandos sería relevante considerando que el EgAgB une lípidos que el parásito no puede sintetizar y de esta forma le suministraría bloques biosintéticos necesarios para que el parásito sintetice lípidos más complejos que necesita para su desarrollo y crecimiento.



**Figura 4.7. Hipótesis sobre la función del EgAgB en la biología de *E. granulosus*.** Dado que el EgAgB es capaz de unir una amplia variedad de lípidos que el parásito no puede sintetizar por sí mismo y que se encuentra presente en la interfaz con el hospedador (1), es posible pensar que participe en la adquisición de lípidos desde el hospedador. Para ello el EgAgB también podría interactuar directamente con lipoproteínas del hospedador para obtener algunos de sus ligandos, tanto en la interfaz con el hospedador (2) como dentro del metacestodo (3). Por otra parte, las propias lipoproteínas plasmáticas también podrían transferir ligandos hacia las células del parásito empleando receptores para lipoproteínas expresados en las células de *E. granulosus* (4). Por otro lado, el EgAgB podría interactuar con células del hospedador, tanto con las células del parénquima del órgano afectado (5), como con células de la línea mieloide (6), como macrófagos residentes, monocitos inflamatorios o células dendríticas. En paralelo, la interacción con las células del sistema inmune, ya sea por la activación de cascadas de señalización anti-inflamatorias tras la unión a través de receptores o por la transferencia de lípidos con propiedades anti-inflamatorias hacia estas células podría influenciar el fenotipo adoptado por estas células y modular su respuesta (7). Asimismo, para cumplir su función como transportador de lípidos hacia el parásito, el EgAgB debería interactuar con las células del propio parásito. Desde la interfaz, este mecanismo podría involucrar interacciones con la cara externa de la capa germinativa o involucrar el transporte de estos ligandos a través de la pared del metacestodo (8). Asimismo, la transferencia de lípidos hacia las células del parásito podría involucrar interacciones con los receptores relacionados con la familia de receptores de LDL que expresarían las células del parásito (9). Dentro de esta hipótesis, es posible pensar que distintas subunidades de EgAgB estén involucradas en distintos tipos de interacciones con los diferentes blancos moleculares mencionados, tanto en las células del hospedador, como del propio parásito.

**CONCLUSIONES**

Durante el transcurso de este trabajo se logró poner a punto un método efectivo para obtener las subunidades recombinantes EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 libres de lípidos mediante RP-HPLC. Esto permitió analizar propiedades estructurales y funcionales de estas subunidades y evaluar la participación de los lípidos en algunas de las propiedades descritas para el EgAgB nativo.

Se demostró que las subunidades de EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 libres de lípidos no se encuentran en forma de monómeros en solución, sino que son capaces de interactuar consigo mismas para formar oligómeros de mayor tamaño. La estimación del tamaño molecular de estos oligómeros sugiere que la subunidad EgAgB8/3 formaría oligómeros de menor tamaño (aproximadamente 40 kDa) en comparación con las subunidades EgAgB8/1 y EgAgB8/2 (aproximadamente 60 kDa). Asimismo, mediante ensayos de entrecruzamiento químico, se encontró que la subunidad EgAgB8/3 tiene tendencia a formar oligómeros más heterogéneos, y que los oligómeros formados por estas subunidades en ausencia de lípidos tienen un tamaño menor que los formados por las subunidades sin deslipidizar. Estos últimos presentaron un tamaño similar a los oligómeros formados por el EgAgB nativo. Estos datos sugieren que los lípidos participarían en la organización estructural de la molécula. La formación de estos oligómeros aún en ausencia de los lípidos está de acuerdo con los datos obtenidos mediante modelado molecular por homología de las subunidades de EgAgB, donde la presencia de regiones con densidades de carga positivas y negativas favorecería la agregación de estos monómeros.

El análisis de la capacidad de interactuar con distintos tipos de ligandos hidrofóbicos demostró que las subunidades EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 son capaces de unir el análogo fluorescente 12-AS con afinidad submicromolar, pero no la sonda DAUDA. Estas propiedades de unión son similares a las propiedades descritas para algunas las HLBP de otros cestodos. Asimismo, por primera vez se evaluó la capacidad de estas subunidades de unir otros ligandos hidrofóbicos distintos a los ácidos grasos. Se encontró que ninguna de las tres subunidades unió el análogo de colesterol DHE, sugiriendo que en la partícula nativa estas subunidades no interactuarían directamente con el colesterol. Por otra parte, los datos obtenidos al analizar los lípidos unidos por las subunidades de EgAgB recombinantes en *E. coli*, mostraron que estas subunidades son capaces de unir fosfolípidos, particularmente en el entorno de la bacteria unen PE y CL, debido a que éstos son los fosfolípidos mayoritarios en *E. coli*.

Además, demostramos que las subunidades EgAgB8/2 y EgAgB8/3 tienen el potencial de transferir ácidos grasos a membranas de fosfolípidos. En particular, los

estudios de este trabajo mostraron que estas subunidades son capaces de transferir el ligando 12-AS a vesículas conteniendo NBD-PC, lo cual fue evidenciado por el fenómeno de FRET que ocurre entre ambas moléculas. Los mecanismos de transferencia empleados por ambas subunidades parecerían ser diferentes. Los resultados sugieren que para la subunidad EgAgB8/2 el paso limitante de la transferencia es el contacto directo con la vesícula; mientras que para la subunidad EgAgB8/3 la cinética de la transferencia estaría dada por la disociación del complejo proteína-ligando. Asimismo, los resultados mostraron que para ambas subunidades la velocidad de transferencia fue mucho mayor al emplear vesículas ricas en CL, sugiriendo que las interacciones electroestáticas podrían tener un papel importante en la interacción con la membrana. En este sentido, el hecho de que los modelos estructurales de estas subunidades sugieran la presencia de regiones con densidades de cargas claramente diferenciadas apoya esta hipótesis. Estos ensayos representan la primera evidencia de que las subunidades de EgAgB presentan capacidad de transferir ligandos, paso que podría ser importante considerando la hipótesis de que esta partícula pueda participar en la adquisición, el transporte y/o la distribución de lípidos entre distintos tejidos del parásito.

Por último, en este trabajo demostramos que las subunidades de EgAgB, principalmente las subunidades EgAgB8/1 y EgAgB8/3, se unen de forma selectiva a monocitos y macrófagos. Estos resultados sugieren que el reconocimiento de la partícula nativa de EgAgB por estas células descrito previamente, es principalmente mediado por su porción proteica. Asimismo, los fosfolípidos, en particular la PC, participarían en esta interacción, posiblemente modificando la forma en que se exponen estas subunidades en la superficie de la partícula. Por otro lado, se encontró que la unión a los macrófagos fue mayor en comparación con la unión a los monocitos, sugiriendo una mayor expresión de la molécula capaz de reconocer al EgAgB en estas células, o la presencia de nuevos receptores tras la diferenciación. Si bien no se ha determinado aún que moléculas son capaces de reconocer al EgAgB en estas células, es posible pensar que receptores de lipoproteínas puedan estar involucrados. Es posible que el uso de este tipo de receptores explique la modulación que el EgAgB ejerce en las células mieloides reportada en la literatura, de forma similar a la modulación ejercida por otras lipoproteínas, como la HDL.

En conjunto, este trabajo aportó nuevos conocimientos, que contribuyen a una mayor comprensión de la estructura y posibles funciones del EgAgB. Estos conocimientos contribuirán al diseño de nuevas estrategias experimentales para la elucidación del papel de esta lipoproteína en la biología de *E. granulosus*.

**PERSPECTIVAS  
FUTURAS**

Como se discutió a lo largo de este trabajo, muchos interrogantes pueden ser planteados dentro de la hipótesis general en la cual se enmarcó esta tesis. Asimismo, a partir de los resultados obtenidos durante su desarrollo, también es posible plantear nuevos interrogantes. A continuación se describen las perspectivas futuras que darán continuidad a este trabajo y son de interés para nuestro grupo de investigación.

A partir de la obtención de las subunidades de EgAgB libres de lípidos una perspectiva futura que nos interesa abordar es la obtención de información estructural de estas subunidades. Dado que la técnica de resonancia magnética nuclear no se ha podido aplicar a estas proteínas, otra estrategia sería la obtención de cristales para su determinación estructural mediante rayos X. La obtención de cristales para algunas subunidades recombinantes de EgAgB sin deslipidizar ha sido reportada previamente (Monteiro et al., 2008), por lo que sería necesario investigar qué condiciones son necesarias para la obtención de los cristales en el caso de las subunidades libres de lípidos.

Empleando las subunidades recombinantes libres de lípidos, también es de nuestro interés analizar la formación de complejos lipoproteicos similares a los formados por las lipoproteínas plasmáticas; ya que como se ha comentado previamente, algunas propiedades de la partícula nativa de EgAgB sugieren que ésta adoptaría una estructura similar a la de la HDL, en particular a las partículas de HDL<sub>3</sub> (Obal et al., 2012). Para analizar esta posibilidad sería posible aplicar técnicas descritas previamente para la reconstitución de HDL a partir de apolipoproteína AI mediante diálisis con colato y/o microsolvubilización de fosfolípidos a su temperatura de transición de fase gel a fase líquida (Cuellar et al., 2014).

Por otro lado, un aspecto que es relevante dentro de la hipótesis planteada y que nos interesa abordar es la capacidad del EgAgB de interactuar con lipoproteínas del hospedador para intercambiar lípidos, intercambio que ocurre en varias lipoproteínas plasmáticas (Fielding & Fielding, 2008). Como se ha mencionado previamente, este intercambio podría ocurrir tanto fuera, como dentro del quiste, dado que el análisis proteómico del líquido hidático mediante espectrometría de masas determinó la presencia de diversas apolipoproteínas provenientes del hospedador en este líquido (Aziz et al., 2011; Lic. Maite Folle, UdelaR, comunicación personal).

En el mismo sentido a lo anteriormente planteado, también es interesante analizar si el EgAgB puede establecer interacciones con células del parénquima en donde el quiste hidático se establece, en general hígado y pulmón. Este análisis podría llevarse a cabo mediante citometría de flujo, siguiendo una estrategia similar a la desarrollada en este trabajo para el análisis de la unión a monocitos y macrófagos. En caso de

encontrar que el EgAgB nativo interacciona con estas células, sería interesante emplear las subunidades de EgAgB libres de lípidos para evaluar si esta interacción está mediada por las mismas subunidades que en el caso de los monocitos y los macrófagos. Actualmente este análisis se está llevando a cabo con células hepáticas de la línea Hep G2 (ATCC, *American Type Culture Collection*).

Otro aspecto relevante y que permitirá comprender en más detalle la interacción con las células del hospedador es la elucidación del/los receptor(es) involucrado(s) en el reconocimiento del EgAgB en los monocitos y los macrófagos. Para ello, como se comentó en las secciones previas, actualmente se están llevando a cabo ensayos de co-inmunoprecipitación con la subunidad recombinante EgAgB8/3 libre de lípidos. La elucidación de estos receptores permitirá una mejor comprensión de las vías de señalización activadas tras la unión del EgAgB a las células, que puedan explicar la modulación que esta molécula ejerce en las células mieloides (Ramos, 2008; Siracusano et al., 2008). En este trabajo se realizaron ensayos preliminares para evaluar si las subunidades libres de lípidos son capaces de imitar algunas de las propiedades descritas para el EgAgB nativo en los monocitos y macrófagos, en particular en cuanto a la secreción de distintos tipos de interleuquinas. Sin embargo, para poder hacer este análisis de manera correcta, teniendo en cuenta que estas proteínas son expresadas en bacterias, es necesario primero asegurar que las mismas no contengan lipopolisacáridos bacterianos que podrían llevar a conclusiones erróneas en cuanto al fenotipo celular obtenido.

Por otra parte, para comprender el rol del EgAgB en el metabolismo lipídico de *E. granulosus*, también es importante determinar si esta molécula es capaz de transportar lípidos hacia las células del parásito. Como se discutió en los capítulos previos, en este trabajo se logró determinar que las subunidades EgAgB8/2 y EgAgB8/3 son capaces de transferir análogos de ácidos grasos hacia vesículas fosfolipídicas modelo. Si bien estos ensayos mostraron que estas subunidades son potencialmente capaces de transferir sus ligandos, resultaría importante evaluar el transporte de lípidos hacia el parásito utilizando análogos fluorescentes y protoescolices o microquistes como modelo, de forma similar a los ensayos realizados con la proteína TsM150 de *T. solium* (Lee et al., 2007). Asimismo, dada la reciente obtención de líneas celulares de *E. granulosus* (Echeverría et al., 2010; Albani et al., 2013), sería interesante analizar la transferencia de lípidos hacia las células del parásito.

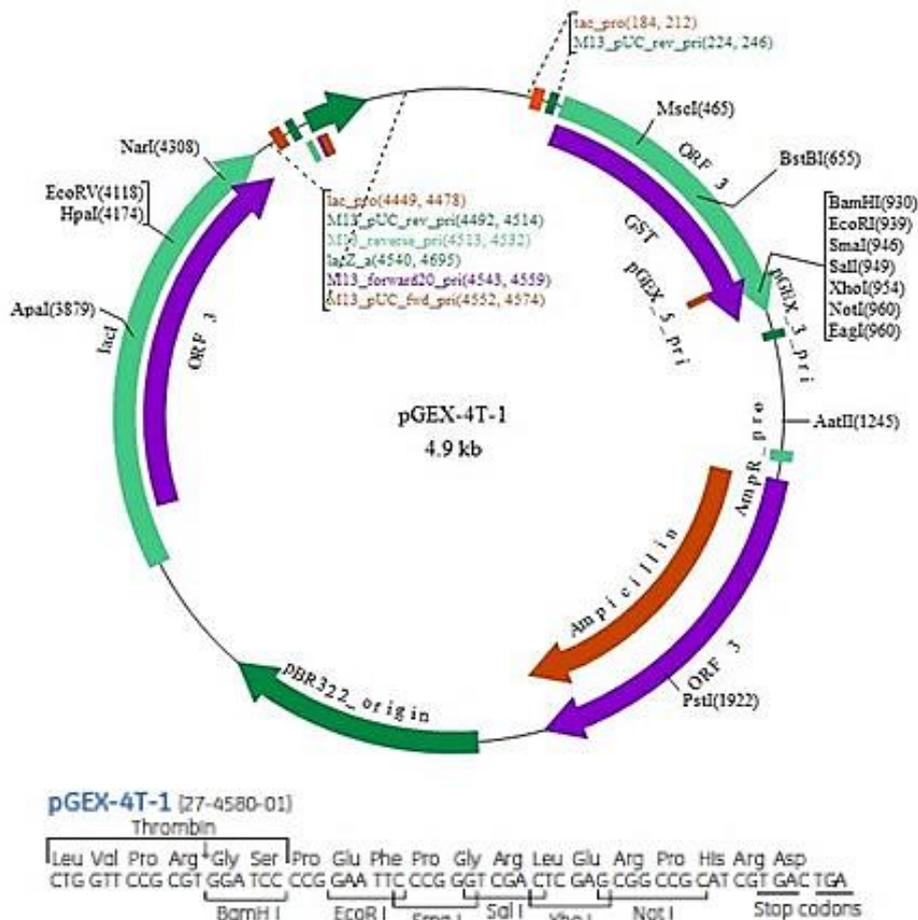
Finalmente, otro aspecto que para nuestro grupo es interesante abordar es el análisis de las proteínas con homología a los dominios LDL-A presentes en la familia

de receptores de LDL que se expresarían en el parásito. A partir de los datos del genoma de *E. granulosus* es posible determinar cuál es la secuencia de estas proteínas y clonarlas para expresarlas de forma recombinante. Sin embargo, dado que se han encontrado al menos diez posibles proteínas con similitud a receptores de LDL en el genoma de *E. granulosus* (Zheng H. et al., 2013) es posible que esta estrategia no resulte adecuada. Como se comentó anteriormente, dada la reciente obtención de líneas celulares de *E. granulosus* (Echeverría et al., 2010; Albani et al., 2013), también sería posible analizar la unión del EgAgB y de las distintas subunidades empleando estas células. Este análisis también se podría desarrollar empleando la técnica de citometría de flujo y dependiendo de los resultados que se obtengan, los posibles receptores se podrían identificar mediante co-inmunoprecipitación con las subunidades de EgAgB.

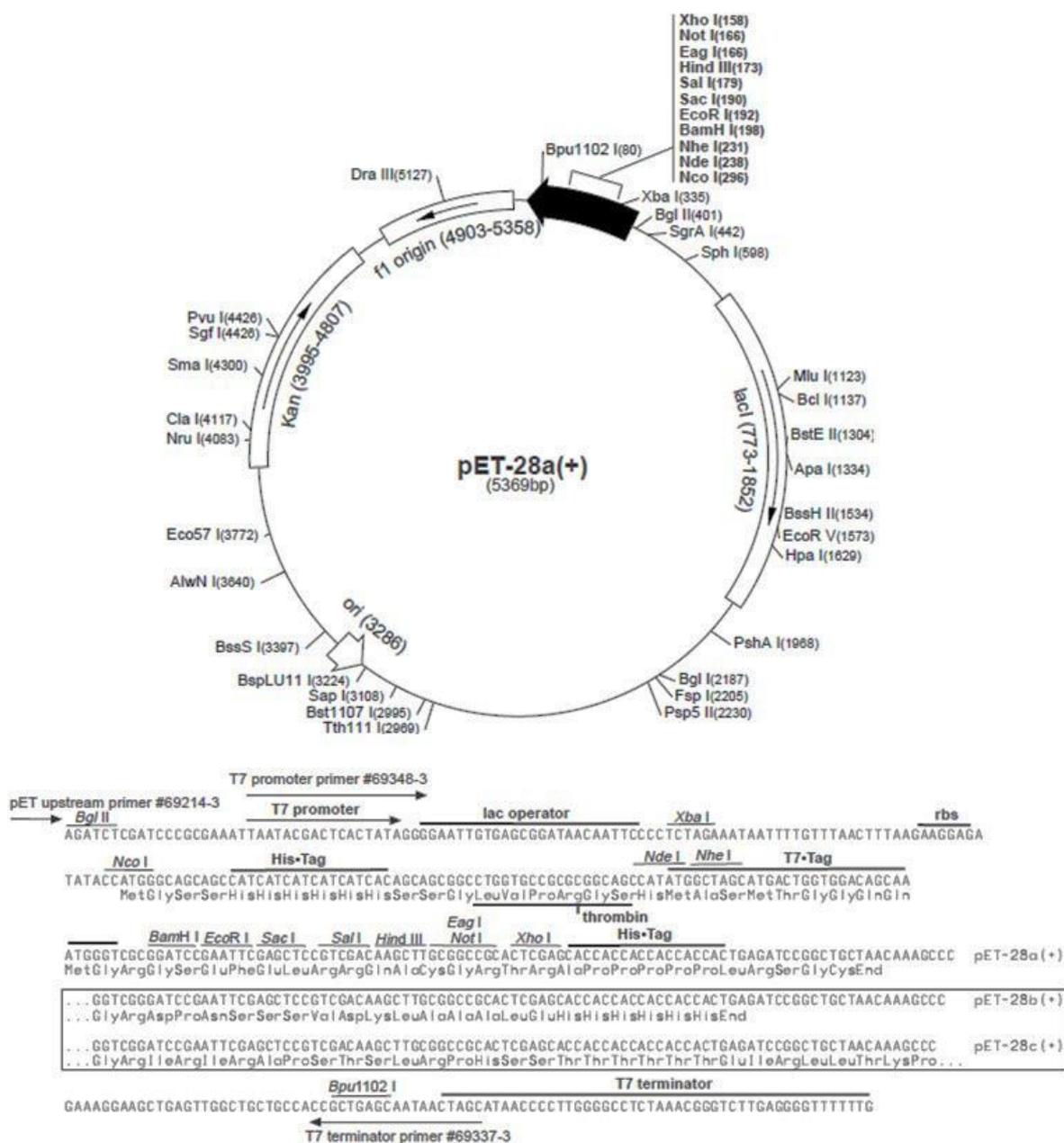
En conjunto, estas estrategias permitirán avanzar en el análisis de la participación del EgAgB en el metabolismo lipídico de *E. granulosus*. Esta información aportará conocimientos novedosos sobre la biología de este parásito en aquellos aspectos que son fundamentales para su supervivencia en el hospedador.

# APÉNDICES

### 7.1. Mapas de los plásmidos pGEX4-T-1 y pET28b



**Figura 7.1. Mapa del plásmido pGEX-4T-1.** Se observa la ubicación del gen que codifica para la proteína GST seguido del sitio de clonado múltiple donde se inserta el gen de interés para obtener la proteína de fusión a GST. También se observan los sitios de apareamiento de los *primers* pGEX 3' y pGEX 5' empleados en este trabajo para la secuenciación nucleotídica. En este plásmido también se ubica un gen que codifica una proteína que le brinda resistencia al antibiótico ampicilina. En la parte inferior de la figura se observa el sitio de corte específico para la trombina, así como los sitios de corte de algunas enzimas de restricción. Adaptado de manual de pGEX System (GE-Healthcare)



**Figura 7.2. Mapa del plásmido pET28b.** Se observa la ubicación del sitio de clonado múltiple donde se inserta el gen de interés. En este plásmido también se ubica un gen que codifica una proteína que le brinda resistencia al antibiótico kanamicina. En la parte inferior de la figura se observa una porción de la secuencia nucleotídica del plásmido donde se observan los sitios de corte de algunas enzimas de restricción, entre ellas las enzimas NdeI y BamHI empleadas en este trabajo, así como la ubicación de la cola de histidinas (His-tag), el sitio de corte con trombina y el sitio de apareamiento de los primers genéricos T7 promotor y T7 terminador empleados en este trabajo para la secuenciación nucleotídica. Adaptado del manual de pET System (Novagen, Promega)

## 7.2. Verificación de la secuencia nucleotídica de los genes de EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 clonados en el plásmido pGEX

Las secuencias nucleotídicas de los genes EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 clonados en el plásmido pGEX-4-T-1 (Fernández et al., 1996; Rott et al., 2000; Monteiro et al., 2007) que fueron generosamente donados por el Dr. Zaha fueron verificadas mediante secuenciación nucleotídica previo a su utilización. Como se observa en la Figura 7.3, para los tres genes las secuencias nucleotídicas obtenidas alinearon correctamente con las secuencias clonadas originalmente (números de acceso en *Genbank* AF143813, U15001 y AF361934 para EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3, respectivamente). Las secuencias más confiables, es decir aquellas que presentaron mayores valores de puntuación, presentaron un 100% de alineamiento con las secuencias originalmente clonadas en el plásmido pGEX-4-T-1, mientras que aquellas que presentan algunas bases nucleotídicas diferentes corresponden a las secuencias menos confiables, lo que podría explicar estas diferencias.

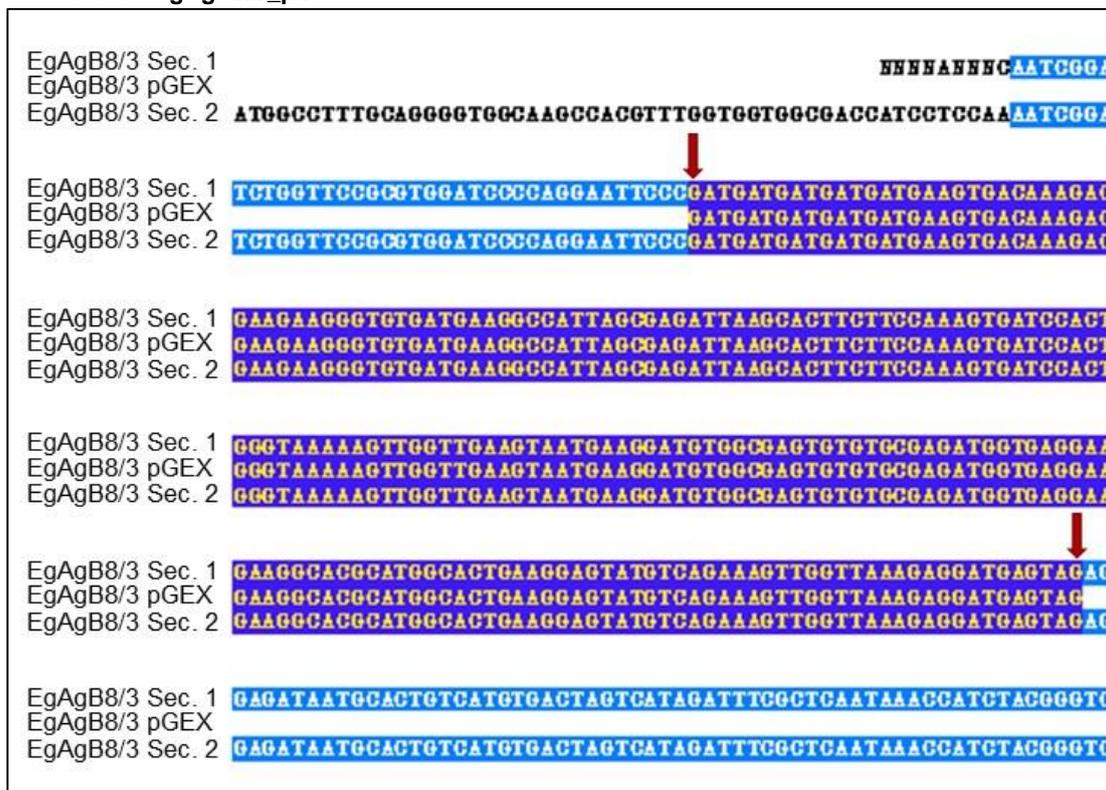
### Verificación EgAgB8/1\_pGEX

EgAgB8/1 Sec. 1	CATGGCCCTTTGCAGGGCTGGCAAAGCCACGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTCBAAAAATCGG
EgAgB8/1 pGEX	HHHHAACNNTCAA .TCGG
EgAgB8/1 Sec. 2	
EgAgB8/1 Sec. 1	ATCTGGTTCcCGGTGGATCCGTGGTGGTACTCAGGCTGATGATGGCCCTCACCTCGACGT
EgAgB8/1 pGEX	GTGGTGGTACTCAGGCTGATGATGGCCCTCACCTCGACGT
EgAgB8/1 Sec. 2	ATCTGGTTC .CGGTGGATCCGTGGTGGTACTCAGGCTGATGATGGCCCTCACCTCGACGT
EgAgB8/1 Sec. 1	CGAGGAGTGTGATGAAAA TGTTTGGCGAA GTGAAGTACTTCTTCGAACGTGATCCGTTGG
EgAgB8/1 pGEX	CGAGGAGTGTGATGAAAA TGTTTGGCGAA GTGAAGTACTTCTTCGAACGTGATCCGTTGG
EgAgB8/1 Sec. 2	CTAGGAGTGTGATGAAAA TGTTTGGCGAA .TGAAGTACTTCTTC CAACGTGATCCGTTGG
EgAgB8/1 Sec. 1	GTCAGAAAAGTGGTTGACCTCTTAAAGGAACTGGAAGAAGTGTTCAGTTGTTGAGGAAGA
EgAgB8/1 pGEX	GTCAGAAAAGTGGTTGACCTCTTAAAGGAACTGGAAGAAGTGTTCAGTTGTTGAGGAAGA
EgAgB8/1 Sec. 2	GTCAGAAAAGTGGTTGACCTCTTAAAGGAACTGGAAGAAGTGTTCAGTTGTTGAGGAAGA
EgAgB8/1 Sec. 1	AGCTACGCATGGCACTCAGGTCCCACCTCAGAGGGTTGATTGCTGAAGGTGAATAGAGGT
EgAgB8/1 pGEX	AGCTACGCATGGCACTCAGGTCCCACCTCAGAGGGTTGATTGCTGAAGGTGAATAG
EgAgB8/1 Sec. 2	AGCTACGCATGGCACTCAGGTCCCACCTCAGAGGGTTGATTGCTGAAGGTGAATAGAGGT
EgAgB8/1 Sec. 1	GCCAATACACTGTTCATGTGACTAGTCATAGATTTTGCTCGAATTCCCGGGTCCACTCGAG
EgAgB8/1 pGEX	GCCAATACACTGTTCATGTGACTAGTCATAGATTTTGCTCGAATTCCCGGGTCCACTCGAG
EgAgB8/1 Sec. 2	GCCAATACACTGTTCATGTGACTAGTCATAGATTTTGCTCGAATTCCCGGGTCCACTCGAG
EgAgB8/1 Sec. 1	CGGCCGCATCGTGA CTGACTGACGATCTG CCTCGCCCGTTCGGTATNNNNH
EgAgB8/1 pGEX	CGGCCGCATCGTGA CTGACTGACGATCTG CCTCGCCCGTTCGGCTGATGACGGCGAAAAAC
EgAgB8/1 Sec. 2	CGGCCGCATCGTGA CTGACTGACGATCTG CCTCGCCCGTTCGGCTGATGACGGCGAAAAAC

Verificación EgAgB8/2\_pGEX

EgAgB8/2 Sec. 1	HHHFCGGHCHNANFCAATCGGATCTGGTTCCGCGTGGATCCCAGGAATTCCCCCGCCCGT
EgAgB8/2 pGEX	GGCCGT
EgAgB8/2 Sec. 2	
EgAgB8/2 Sec. 1	CGTTCAAGCTAAAGATGAGCCAAAAGCACACATGGGGCAAGTGGTAAAAAAAAGATGGGG
EgAgB8/2 pGEX	CGTTCAAGCTAAAGATGAGCCAAAAGCACACATGGGGCAAGTGGTAAAAAAAAGATGGGG
EgAgB8/2 Sec. 2	
EgAgB8/2 Sec. 1	TGAACTTCGAGACTTCTTTAGAAAATGATCGACTGGGTCAAAGACTTGTGGCTCTTGGCAA
EgAgB8/2 pGEX	TGAACTTCGAGACTTCTTTAGAAAATGATCGACTGGGTCAAAGACTTGTGGCTCTTGGCAA
EgAgB8/2 Sec. 2	AAGATCCAATAGGTCAAAGCGTTGTGGATAATTCCAA
EgAgB8/2 Sec. 1	TGACCTAACTGCCATTTGCCAGAAGCTGCAATTGAAGATTCCGTAGGTGCTGAAGAAAGTA
EgAgB8/2 pGEX	TGACCTAACTGCCATTTGCCAGAAGCTGCAATTGAAGATTCCGTAGGTGCTGAAGAAAGTA
EgAgB8/2 Sec. 2	TGACCTAACTGCCATTTGCCAGAAGCTGCAATTGAAGATTCCGTAGGTGCTGAAGAAAGTA
EgAgB8/2 Sec. 1	TGTTAAGAATTTGGTGGAAAGAAAAAGATGATGATTCAAAGTAAATCATGCCGTCGGGACAC
EgAgB8/2 pGEX	TGTTAAGAATTTGGTGGAAAGAAAAAGATGATGATTCAAAGTAA
EgAgB8/2 Sec. 2	TGTTAAGAATTTGGTGGAAAGAAAAAGATGATGATTCAAAGTAAATCATGCCGTCGGGACAC
EgAgB8/2 Sec. 1	ATGATTTGCCTGAATTGGGGTCCGACTCGAGCGGCCGCATCGTGAAGTACTGACGATCTG
EgAgB8/2 pGEX	
EgAgB8/2 Sec. 2	ATGATTTGCCTGAATTGGGGTCCGACTCGAGCGGCCGCATCGTGAAGTACTGACGATCTG
EgAgB8/2 Sec. 1	CCTCGGCCGTTTCCTGCTGACGGCTGAAAACTCTGATACATGCAGCTCCCGGAGACGGT
EgAgB8/2 pGEX	
EgAgB8/2 Sec. 2	CCTCGGCCGTTTCCTGCTGACGGCTGAAAACTCTGATACATGCAGCTCCCGGAGACGGT

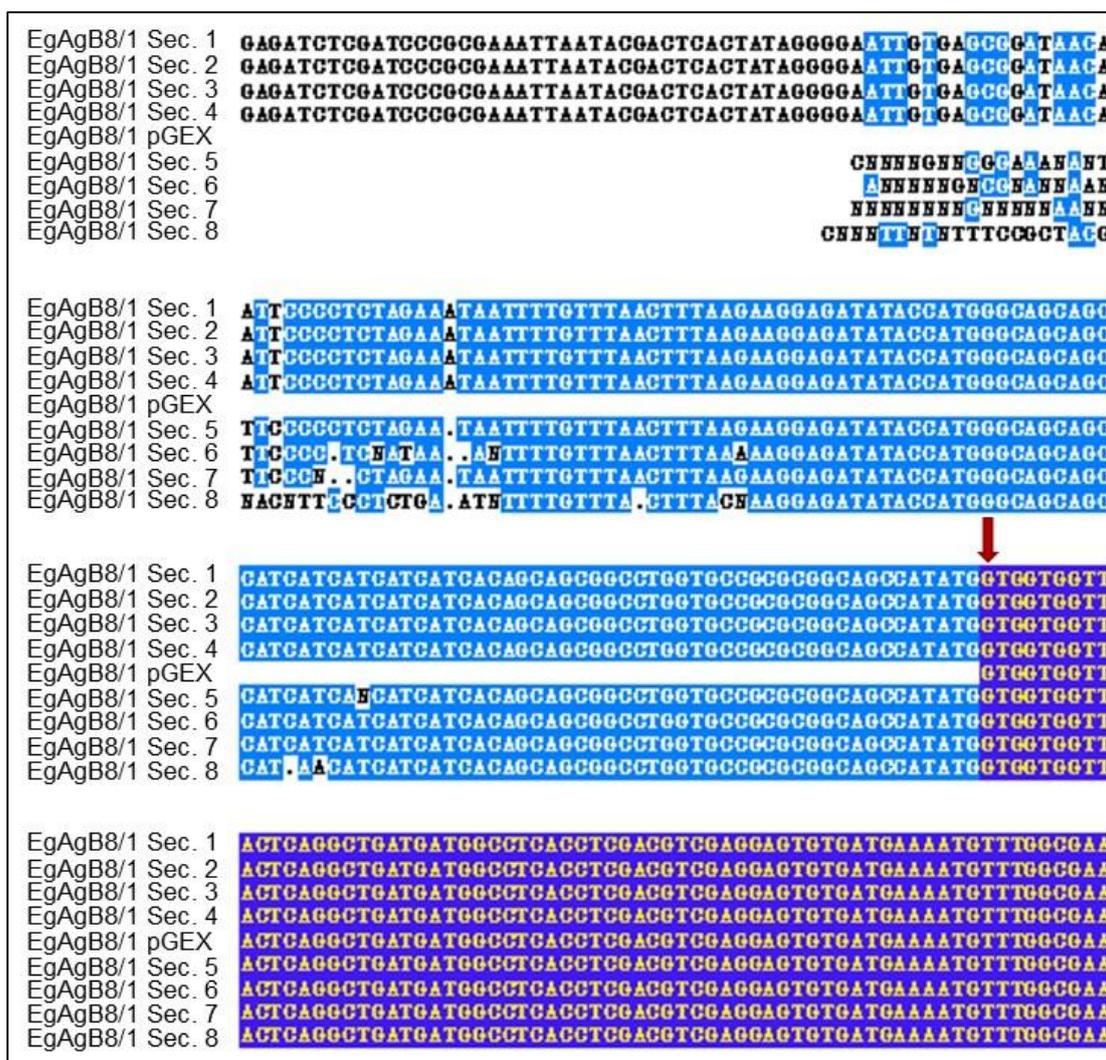
**Verificación EgAgB8/3\_pGEX**

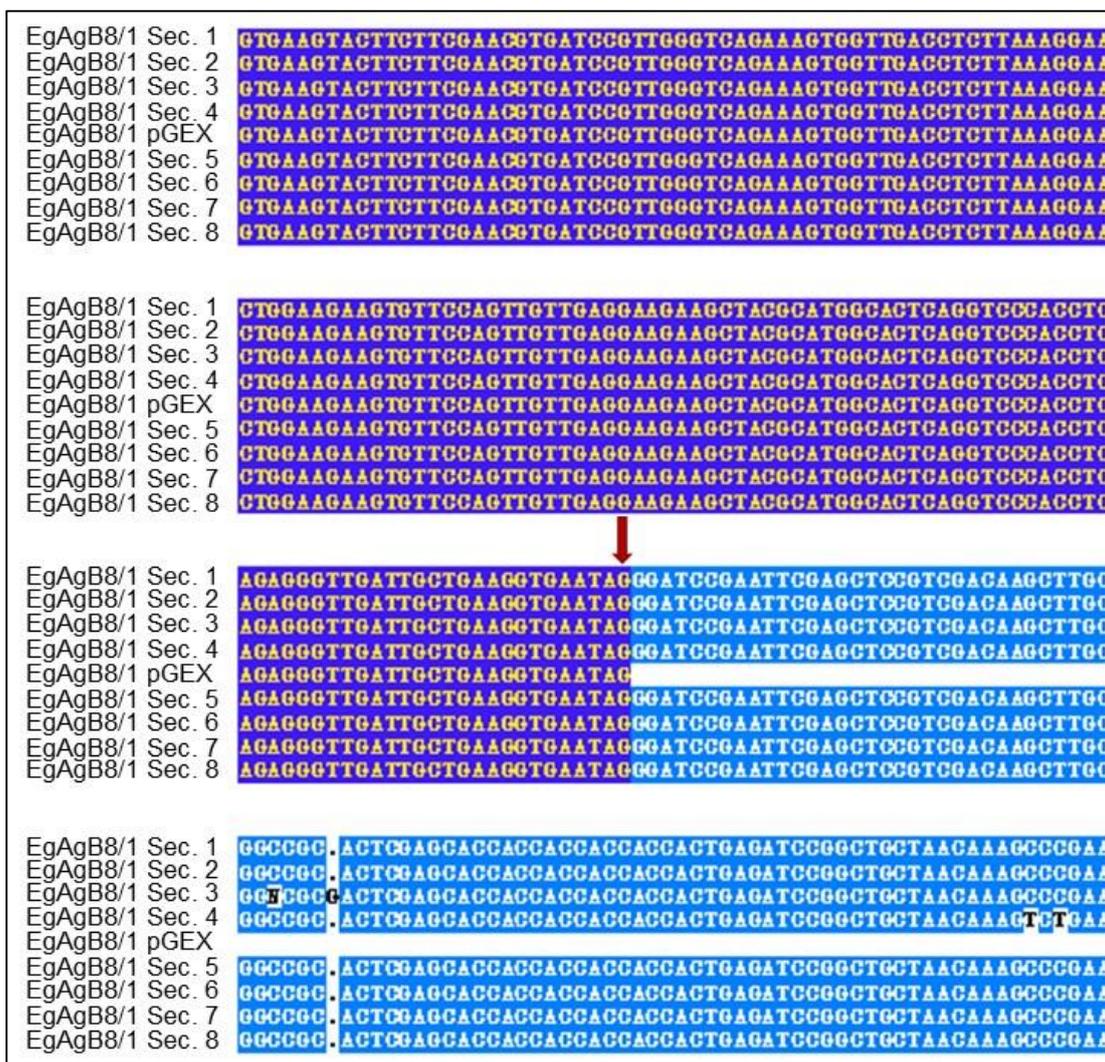


**Figura 7.3. Verificación de la secuencia nucleotídica de los genes de EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 clonados en el plásmido pGEX.** Se muestra el alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los genes EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3 originalmente clonados en el plásmido pGEX y las obtenidas mediante secuenciación de dichos plásmidos. Las secuencias originalmente clonadas están nombradas como EgAgB8/1 pGEX, EgAgB8/2 pGEX y EgAgB8/3 pGEX y son indicadas en la figura con una flecha roja. Las secuencias nucleotídicas obtenidas con mayor valor de puntuación se denominan Secuenciado 1 y Secuenciado 2 (Sec. 1 y Sec. 2). El secuenciado se realizó empleando los *primers* pGEX 3' y pGEX 5' específicos para los plásmidos pGEX (ver Figura 7.1), empleando el servicio de la empresa Macrogen (Corea). Las secuencias obtenidas fueron alineadas empleando la herramienta ClustalW del programa *Biology Workbench*.

### 7.3. Verificación de la secuencia nucleotídica del producto de subclonado pET28b-EgAgB8/1

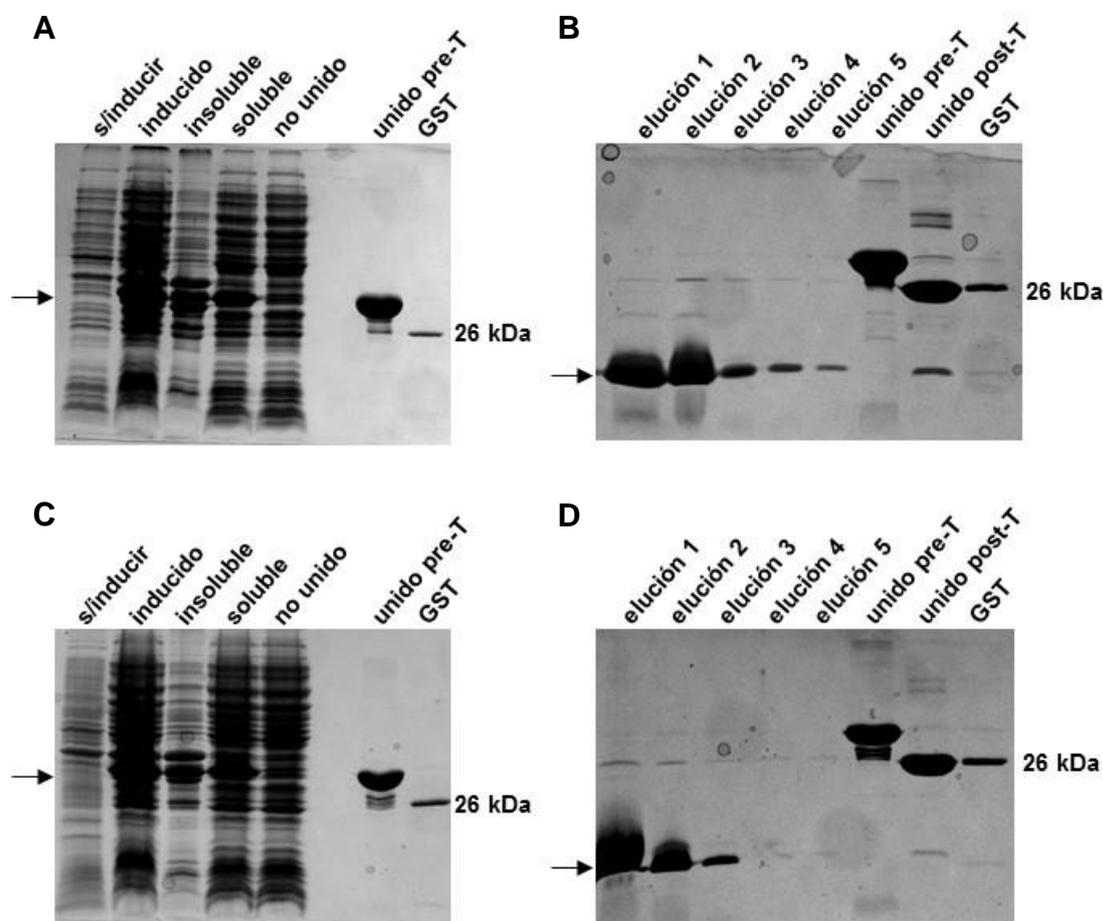
La construcción pET28b-EgAgB8/1 obtenida en este trabajo fue verificada mediante secuenciación nucleotídica. Como se observa en la Figura 7.4, las secuencias obtenidas en las distintas muestras analizadas mostraron un 100% de alineamiento con la secuencia de EgAgB8/1 clonada originalmente en el plásmido pGEX que se utilizó para el subclonado en pET28b. Este resultado indica que el subclonado del gen EgAgB8/1 en el plásmido pET28b fue correcto.





**Figura 7.4. Verificación de la secuencia nucleotídica del producto de subclonado pET28b-EgAgB8/1.** Se muestra el alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen EgAgB8/1 originalmente clonado en el plásmido pGEX y las obtenidas mediante secuenciación de la construcción pET28b-EgAgB8/1. La secuencia originalmente clonada está nombrada como EgAgB8/1 pGEX y es indicada en la figura con una flecha roja. Las secuencias nucleotídicas obtenidas mediante la secuenciación se denominan Secuenciado 1 al 8 (Sec. 1 a Sec. 8). El secuenciado se realizó empleando los *primers* T7 promotor y T7 terminador presentes en los plásmidos pET (ver Figura 7.2), empleando el servicio de la empresa Macrogen (Corea). Las secuencias obtenidas fueron alineadas empleando la herramienta ClustalW del programa *Biology Workbench*.

#### 7.4. Análisis mediante SDS-PAGE de los productos obtenidos durante la purificación de EgAgB8/2 y EgAgB8/3



**Figura 7.5. Purificación de EgAgB8/2 y EgAgB8/3.** Análisis mediante SDS-PAGE de los productos obtenidos a lo largo de los distintos pasos en la purificación de las proteínas EgAgB8/2 y EgAgB8/3. La obtención y purificación de las proteínas de fusión EgAgB8/2-GST (**A**) y EgAgB8/3-GST (**C**) se siguió mediante SDS-PAGE 12.5 % (m/v) y tinción con azul de *Coomassie*. En los carriles del gel se sembraron los lisados de bacterias sin inducir e inducidas, las fracciones insoluble y soluble luego de la lisis de las bacterias inducidas y las fracciones no unida y unida a la columna de glutatión previo al tratamiento con trombina (pre-T). Ésta última corresponde al análisis directo de la resina con agregado de solución siembra y hervido durante 5 minutos. Se indica con la flecha la posición de la banda correspondiente a las proteínas de fusión (~ 34 kDa). La obtención de la subunidades EgAgB8/2 (**B**) y EgAgB8/3 (**D**) se realizó mediante tratamiento de la fracción unida a la columna de glutatión con trombina y posterior elución de proteína. Estos pasos se verificaron mediante SDS-PAGE 15% (m/v) seguidos de tinción con azul de *Coomassie*. En los carriles del gel se sembraron las distintas eluciones de cada subunidad, la fracción que se mantuvo unida a la columna luego del tratamiento con trombina (post-T) y su comparación con la fracción unida previo a este tratamiento (pre-T). Éstas últimas corresponden al análisis directo de la resina con agregado de solución siembra y hervido durante 5 minutos. Se indica con la flecha la posición de las bandas correspondientes a las proteínas EgAgB8/2 y EgAgB8/3. En todos los casos se corrió en paralelo la proteína GST (26 kDa), cuya banda se indica en la figura.

## 7.5. Datos bioquímicos de las proteínas recombinantes EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3

rEgAgB8/1: VVVTQADDGLTSTSRVSMKMFGEVVKYFFERDPLGQKVVDLLKELEEVFQLLRKKLRMALRSHLRGLIAEGE

rEgAgB8/2: AVVQAKDEPKAHMGQVVKKRWGELRDFFRNDPLGQRLVALGNDLTAICQKLQLKIREVLKKYVKNLVEEKDDDSK

rEgAgB8/3: DDDEVTKTKKGVKMAISEIKHFFQSDPLGKKLVEVMKDVASVCEMVRKKARMALKEYVRKLVKED

**Tabla 7.1. Datos bioquímicos de las proteínas recombinantes EgAgB8/1, EgAgB8/2 y EgAgB8/3.** El coeficiente de extinción molar (E) y el punto isoeléctrico (pI) teórico de cada proteína fueron calculados empleando las herramientas *EXTCOEF-Extinction coefficient calculation* e *PI-Isoelectric point determination* del programa Biology Workbench.

	<b>rEgAgB8/1</b>	<b>rEgAgB8/2</b>	<b>rEgAgB8/3</b>
Aminoácidos	71	75	68
MW (Da)	8154	8663	7859
E (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	1280	7030	1340
pI Teórico	9.4	9.8	8.6
Trp	0	1	0
Tyr	1	1	1
Cys	0	1	1

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Albani, C.M., Cumino, A.C., Elissondo, M.C., Denegri, G.M., 2013. Development of a cell line from *Echinococcus granulosus* germinal layer. *Acta Trop.* 128, 124–9.
- Al-Haideri, M., Goldberg, I.J., Galeano, N.F., Gleeson, a, Vogel, T., Gorecki, M., Sturley, S.L., Deckelbaum, R.J., 1997. Heparan sulfate proteoglycan-mediated uptake of apolipoprotein E-triglyceride-rich lipoprotein particles: a major pathway at physiological particle concentrations. *Biochemistry* 36, 12766–72.
- Alvite, G., Di Pietro, S.M., Santomé, J.A., Ehrlich, R., Esteves, A., 2001. Binding properties of *Echinococcus granulosus* fatty acid binding protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1533, 293–302.
- Alvite, G., Esteves, A., 2012. Lipid binding proteins from parasitic platyhelminthes. *Front. Physiol.* 3, 363.
- Ames, G.F., 1968. Lipids of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: structure and metabolism. *J. Bacteriol.* 95, 833–43.
- Anderson, R.C., Chabaud, A.G., Willmott, S., 2009. Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates: Archival volume. CABI, Wallingford (UK).
- Andrade, M.A., Chacón, P., Merelo, J.J., Morán, F., 1993. Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Eng.* 6, 383–90.
- Arend, A.C., Zaha, A., Ayala, F.J., Haag, K.L., 2004. The *Echinococcus granulosus* antigen B shows a high degree of genetic variability. *Exp. Parasitol.* 108, 76–80.
- Aziz, A., Zhang, W., Li, J., Loukas, A., McManus, D.P., Mulvenna, J., 2011. Proteomic characterisation of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid from sheep, cattle and humans. *J. Proteomics* 74, 1560–72.
- Barbieri, M., Fernández, V., González, G., Luaces, V.M., Nieto, A., 1998. Diagnostic evaluation of a synthetic peptide derived from a novel antigen B subunit as related to other available peptides and native antigens used for serology of cystic hydatidosis. *Parasite Immunol.* 20, 51–61.
- Barbieri, M., Sterla, S., Battistoni, J., Nieto, A., 1993. High performance latex reagent for hydatid serology using an *echinococcus granulosus* lipoprotein antigen fraction purified from cyst fluid in one step. *Int. J. Parasitol.* 23, 565–572.
- Barrett, J., Saghir, N., Timanova, A., Clarke, K., Brophy, P.M., 1997. Characterisation and properties of an intracellular lipid-binding protein from the tapeworm *Moniezia expansa*. *Eur. J. Biochem.* 250, 269–75.
- Bejta, F., Moore, E.H., Avella, M., Gough, P.J., Suckling, K.E., Botham, K.M., 2007. Oxidation of chylomicron remnant-like particles inhibits their uptake by THP-1 macrophages by apolipoprotein E-dependent processes. *Biochim. Biophys. Acta* 1771, 901–10.
- Bhattacharya, S.K., Dubey, A.K., 1997. Effects of dissolved oxygen and oxygen mass transfer on overexpression of target gene in recombinant *E. coli*. *Enzyme Microb. Technol.* 20, 355–360.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J., 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93–99.

- Breijo, M., Spinelli, P., Sim, R.B., Ferreira, A.M., 1998. Echinococcus granulosus: an intraperitoneal diffusion chamber model of secondary infection in mice. *Exp. Parasitol.* 90, 270–6.
- Brusca, R.C., Brusca, G.J., 2003. *Invertebrates*, 2nd Ed. ed, Invertebrates. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Buteau, G.H., Fairbairn, D., 1969. Lipid metabolism in Helminth parasites. 8. Triglyceride synthesis in *Hymenolepis diminuta* (cestoda). *Exp. Parasitol.* 25, 265–75.
- Camicia, F., Herz, M., Prada, L.C., Kamenetzky, L., Simonetta, S.H., Cucher, M.A., Bianchi, J.I., Fernández, C., Brehm, K., Rosenzvit, M.C., 2013. The nervous and prenervous roles of serotonin in *Echinococcus* spp. *Int. J. Parasitol.* 43, 647–59.
- Castro GA, 1996. Helminths: Structure, Classification, Growth, and Development, in: Baron, S. (Ed.), *Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston.
- Ceballos, L., Elissondo, C., Sánchez Bruni, S., Denegri, G., Lanusse, C., Alvarez, L., 2011. Comparative performances of flubendazole and albendazole in cystic echinococcosis: ex vivo activity, plasma/cyst disposition, and efficacy in infected mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 5861–7.
- Chemale, G., Ferreira, H., Barrett, J., 2005. Echinococcus granulosus antigen B hydrophobic ligand binding properties. *Biochim. Biophys. Acta* 1747, 189–94.
- Chemale, G., Haag, K., Ferreira, H., Zaha, A., 2001. Echinococcus granulosus antigen B is encoded by a gene family. *Mol. Biochem. Parasitol.* 116, 233–237.
- Coltorii, E.A., Varela-Díaz, V.M., 1974. Echinococcus granulosus: penetration of macromolecules and their localization on the parasite membranes of cysts. *Exp. Parasitol.* 35, 225–31.
- Córsico, B., Cistola, D.P., Frieden, C., Storch, J., 1998. The helical domain of intestinal fatty acid binding protein is critical for collisional transfer of fatty acids to phospholipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 12174–8.
- Córsico, B., Franchini, G.R., Hsu, K.-T., Storch, J., 2005. Fatty acid transfer from intestinal fatty acid binding protein to membranes: electrostatic and hydrophobic interactions. *J. Lipid Res.* 46, 1765–72.
- Córsico, B., Liou, H.L., Storch, J., 2004. The alpha-helical domain of liver fatty acid binding protein is responsible for the diffusion-mediated transfer of fatty acids to phospholipid membranes. *Biochemistry* 43, 3600–7.
- Cuellar, L.Á., Prieto, E.D., Cabaleiro, L.V., Garda, H.A., 2014. Apolipoprotein A-I configuration and cell cholesterol efflux activity of discoidal lipoproteins depend on the reconstitution process. *Biochim. Biophys. Acta* 1841, 180–9.
- Datta, G., Chaddha, M., Garber, D.W., Chung, B.H., Tytler, E.M., Dashti, N., Bradley, W. a, Gianturco, S.H., Anantharamaiah, G.M., 2000. The receptor binding domain of apolipoprotein E, linked to a model class A amphipathic helix, enhances internalization and degradation of LDL by fibroblasts. *Biochemistry* 39, 213–20.
- De Gerónimo, E., Hagan, R.M., Wilton, D.C., Córsico, B., 2010. Natural ligand binding and transfer from liver fatty acid binding protein (LFABP) to membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1801, 1082–9.

- De Nardo, D., Labzin, L.I., Kono, H., Seki, R., Schmidt, S. V., Beyer, M., Xu, D., Zimmer, S., Lahrmann, C., Schildberg, F. a, Vogelhuber, J., Kraut, M., Ulas, T., Kerksiek, A., Krebs, W., Bode, N., Grebe, A., Fitzgerald, M.L., Hernandez, N.J., Williams, B.R.G., Knolle, P., Kneilling, M., Röcken, M., Lütjohann, D., Wright, S.D., Schultze, J.L., Latz, E., 2014. High-density lipoprotein mediates anti-inflammatory reprogramming of macrophages via the transcriptional regulator ATF3. *Nat. Immunol.* 15, 152–60.
- De Siervo, a J., 1969. Alterations in the phospholipid composition of *Escherichia coli* B during growth at different temperatures. *J. Bacteriol.* 100, 1342–9.
- Díaz, A., Casaravilla, C., Irigoín, F., Lin, G., Previato, J.O., Ferreira, F., 2011. Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* I: structure. *Trends Parasitol.* 27, 204–13.
- Dyer, C.A., Cistola, D.P., Parry, G.C., Curtiss, L.K., 1995. Structural features of synthetic peptides of apolipoprotein E that bind the LDL receptor. *J. Lipid Res.* 36, 80–8.
- Dyer, C.A., Curtiss, L.K., 1991. A synthetic peptide mimic of plasma apolipoprotein E that binds the LDL receptor. *J. Biol. Chem.* 266, 22803–6.
- Echeverría, C.I., Isolabella, D.M., Prieto Gonzalez, E. a, Leonardelli, A., Prada, L., Perrone, A., Fuchs, A.G., 2010. Morphological and biological characterization of cell line developed from bovine *Echinococcus granulosus*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 46, 781–92.
- Edwards, I.J., Xu, H., Obunike, J.C., Goldberg, I.J., Wagner, W.D., 1995. Differentiated Macrophages Synthesize a Heparan Sulfate Proteoglycan and an Oversulfated Chondroitin Sulfate Proteoglycan That Bind Lipoprotein Lipase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15, 400–409.
- Edwards, R., 1999. *Immunodiagnosics : A Practical Approach*. Oxford University Press, UK.
- Esteves, A., Dallagiovanna, B., Ehrlich, R., 1993. A developmentally regulated gene of *Echinococcus granulosus* codes for a 15.5-kilodalton polypeptide related to fatty acid binding proteins. *Mol. Biochem. Parasitol.* 58, 215–222.
- Falomir Lockhart, L.J., 2009. Estudio de Proteínas Solubles que Unen Lípidos intracelulares expresadas en sistemas que metabolizan grandes cantidades de lípidos. Caracterización biofísicoquímica, estructural y funcional de IFABP y LFABP de mamíferos e YLSCP2 de *Yarrowia lipolytica*. Universidad Nacional de La Plata.
- Falomir Lockhart, L.J., Burgardt, N.I., Ferreyra, R.G., Ceolin, M., Ermácora, M.R., Córscico, B., 2009. Fatty acid transfer from *Yarrowia lipolytica* sterol carrier protein 2 to phospholipid membranes. *Biophys. J.* 97, 248–56.
- Falomir-Lockhart, L.J., Franchini, G.R., Guerbi, M.X., Storch, J., Córscico, B., 2011. Interaction of enterocyte FABPs with phospholipid membranes: clues for specific physiological roles. *Biochim. Biophys. Acta* 1811, 452–9.
- Falomir-Lockhart, L.J., Laborde, L., Kahn, P.C., Storch, J., Córscico, B., 2006. Protein-membrane interaction and fatty acid transfer from intestinal fatty acid-binding protein to membranes. Support for a multistep process. *J. Biol. Chem.* 281, 13979–89.
- Fernández, V., Ferreira, H., Fernández, C., 1996. Molecular characterisation of a novel 8-kDa subunit of *Echinococcus granulosus* antigen B. *Mol. Biochem. Parasitol.* 77, 247–250.

- Fielding, C.J., Fielding, P.E., 2008. Dynamics of lipoprotein transport in the circulatory system, in: Vance, D.E.V. and J.E. (Ed.), *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Elsevier B.V., pp. 533–553.
- Fitzgerald, M.L., Morris, a L., Chroni, a, Mendez, a J., Zannis, V.I., Freeman, M.W., 2004. ABCA1 and amphipathic apolipoproteins form high-affinity molecular complexes required for cholesterol efflux. *J. Lipid Res.* 45, 287–94.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Franchini, G.R., 2006. Análisis estructura-función de proteínas que unen ácidos grasos (FABP) de intestino de rata (*Rattus norvegicus*). Universidad Nacional de La Plata.
- Franchini, G.R., Córscico, B., Pórfido, J.L., Silva, V., Ibañez Shimabukuro, M., Burusco, F.R., 2013. Análisis estructural y funcional de proteínas solubles que unen lípidos de parásitos helmintos. *Acta bioquímica clínica Latinoam.* 47, 377–384.
- Frayha, G., 1968. A study on the synthesis and absorption of cholesterol in hydatid cysts (*Echinococcus granulosus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 27, 875–878.
- Frayha, G., 1974. Synthesis of certain cholesterol precursors by hydatid protoscolexes of *Echinococcus granulosus* and *cysticerci* of *Taenia hydatigena*. *Comp. Biochem. Physiol.* 49, 93–98.
- Frosch, P., Hartmann, M., Mühlischlegel, F., Frosch, M., 1994. Sequence heterogeneity of the echinococcal antigen B. *Mol. Biochem. Parasitol.* 64, 171–5.
- Furuhashi, M., Hotamisligil, G.S., 2008. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 489–503.
- Galindo, M., Gonzalez, M.J., Galanti, N., 2002. *Echinococcus granulosus* protoscolex formation in natural infections. *Biol. Res.* 35, 365–71.
- Geissmann, F., Auffray, C., Palframan, R., Wirrig, C., Ciocca, A., Campisi, L., Narni-Mancinelli, E., Lauvau, G., 2008. Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunol. Cell Biol.* 86, 398–408.
- Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., Ley, K., 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327, 656–61.
- Gomori, G., 1942. A modification of the colorimetric phosphorus determination for use with the photo-electric colorimeter. *J. Lab. Clin. Med.* 27, 955.
- González, G., Nieto, A., Fernández, C., Orn, A., Wernstedt, C., Hellman, U., 1996. Two different 8 kDa monomers are involved in the oligomeric organization of the native *Echinococcus granulosus* antigen B. *Parasite Immunol.* 18, 587–96.
- González-Sapienza, G., Cachau, R.E., 2003. Identification of critical residues of an immunodominant region of *Echinococcus granulosus* antigen B. *J. Biol. Chem.* 278, 20179–84.

- González-Sapienza, G., Lorenzo, C., Nieto, A., 2000. Improved immunodiagnosis of cystic hydatid disease by using a synthetic peptide with higher diagnostic value than that of its parent protein, *Echinococcus granulosus* antigen B. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3979–83.
- Gordon, S., Hamann, J., Lin, H.-H., Stacey, M., 2011. F4/80 and the related adhesion-GPCRs. *Eur. J. Immunol.* 41, 2472–6.
- Harper, S., Speicher, D.W., 2011. Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. *Methods Mol. Biol.* 681, 259–80.
- Holcman, B., Heath, D., Shaw, R., 1994. Ultrastructure of oncosphere and early stages of metacystode development of *Echinococcus granulosus*. *Int. J. Parasitol.* 24, 623–635.
- Hotez, P.J., Brindley, P.J., Bethony, J.M., King, C.H., Pearce, E.J., Jacobson, J., 2008. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *J. Clin. Invest.* 118, 1311–21.
- Hsu, K.T., Storch, J., 1996. Fatty acid transfer from liver and intestinal fatty acid-binding proteins to membranes occurs by different mechanisms. *J. Biol. Chem.* 271, 13317–23.
- Huang, C., Thompson, T.E., 1974. Preparation of homogeneous, single-walled phosphatidylcholine vesicles. *Methods Enzymol.* 32, 485–9.
- Ibañez Shimabukuro, M., 2014. Estudio estructural y biofísico de As-p18, una proteína de unión a lípidos novedosa, perteneciente al grupo de las FABP de nematodos. Universidad Nacional de La Plata.
- Jabbar, A., Jenkins, D.J., Crawford, S., Walduck, A.K., Gauci, C.G., Lightowlers, M.W., 2011. Oncospheral penetration glands are the source of the EG95 vaccine antigen against cystic hydatid disease. *Parasitology* 138, 89–99.
- Jakobsson, E., Alvite, G., Bergfors, T., Esteves, A., Kleywegt, G.J., 2003. The crystal structure of *Echinococcus granulosus* fatty-acid-binding protein 1. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1649, 40–50.
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M., 2001. *Immunobiology*, 5th Editio. ed. Garland Science, New York.
- Janssen, D., Barrett, J., 1995. A novel lipid-binding protein from the cestode *Moniezia expansa*. *Biochem. J.* 311, 49–57.
- Jeon, H., Blacklow, S.C., 2005. Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 535–62.
- Jonas, A., Phillips, M.C., 2008. Lipoprotein structure, in: Vance, D.E.V. and J.E. (Ed.), *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Elsevier B.V., pp. 485–506.
- Kamenetzky, L., 2007. Variabilidad genética y expresión del antígeno B de *Echinococcus granulosus* y sus implicancias en el diagnóstico de la hidatidosis. Universidad de Buenos Aires.
- Kamenetzky, L., Muzulin, P.M., Gutierrez, A.M., Angel, S.O., Zaha, A., Guarnera, E.A., Rosenzvit, M.C., 2005. High polymorphism in genes encoding antigen B from human infecting strains of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 131, 805–15.

- Kim, S.-H., Bae, Y.-A., Yang, Y., Hong, S.-T., Kong, Y., 2011. Paralogous proteins comprising the 150 kDa hydrophobic-ligand-binding-protein complex of the *Taenia solium* metacestode have evolved non-overlapped binding affinities toward fatty acid analogs. *Int. J. Parasitol.* 41, 1207–15.
- Kimura, T., Mogi, C., Tomura, H., Kuwabara, A., Im, D.-S., Sato, K., Kurose, H., Murakami, M., Okajima, F., 2008. Induction of scavenger receptor class B type I is critical for simvastatin enhancement of high-density lipoprotein-induced anti-inflammatory actions in endothelial cells. *J. Immunol.* 181, 7332–7340.
- Koziol, U., Krohne, G., Brehm, K., 2013. Anatomy and development of the larval nervous system in *Echinococcus multilocularis*. *Front. Zool.* 10, 24.
- Kumaratilake, L.M., Thompson, R.C.A., Eckert, J., Alessandro, A.D., 1986. Sperm transfer in *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). *Zeitschrift für Parasitenkd. Parasitol. Res.* 72, 265–269.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–5.
- Lakowicz, J.R., 2007. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd Ed. ed. Springer, Baltimore, USA.
- Larrieu, E., Belloto, A., Arambulo, P.I., Tamayo, H., 2004. Echinococcosis quística: epidemiología y control en América del Sur. *Parasitol. Latinoam.* 59, 82–89.
- Larrieu, E., Zanini, F., 2012. Critical analysis of cystic echinococcosis control programs and praziquantel use in South America, 1974–2010. *Rev. Panam. Salud Pública* 31, 81–87.
- Lee, E.-G., Bae, Y., Jeong, Y.-T., Chung, J.-Y., Je, E.-Y., Kim, S.-H., Na, B.-K., Ju, J.-W., Kim, T.-S., Ma, L., Cho, S.-Y., Kong, Y., 2005. Proteomic analysis of a 120 kDa protein complex in cyst fluid of *Taenia solium* metacestode and preliminary evaluation of its value for the serodiagnosis of neurocysticercosis. *Parasitology* 131, 867–79.
- Lee, E.-G.E., Kim, S.S.-H., Bae, Y.Y.-A., Chung, J.-Y.J., Suh, M., Na, B.-K., Kim, T.-S., Kang, I., Ma, L., Kong, Y., 2007. A hydrophobic ligand-binding protein of the *Taenia solium* metacestode mediates uptake of the host lipid: Implication for the maintenance of parasitic cellular. *Proteomics* 7, 4016–30.
- Lightowers, M.W., Liu, D.Y., Haralambous, A., Rickard, M.D., 1989. Subunit composition and specificity of the major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 37, 171–82.
- Littlewood, D.T.J., 2006. The Evolution of Parasitism in Flatworms, in: Maule, A.G., Marks, N.J. (Eds.), *Parasitic Flatworms: Molecular Biology, Biochemistry, Immunology and Physiology*. CABI, Wallingford, UK, p. 448.
- Macpherson, C.N., 1983. An active intermediate host role for man in the life cycle of *Echinococcus granulosus* in Turkana, Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32, 397–404.
- Mahley, R.W., Ji, Z.S., Brecht, W.J., Miranda, R.D., He, D., 1994. Role of heparan sulfate proteoglycans and the LDL receptor-related protein in remnant lipoprotein metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 737, 39–52.

- Mamuti, W., Sako, Y., Xiao, N., Nakaya, K., Nakao, M., Yamasaki, H., Lightowlers, M.W., Craig, P.S., Ito, A., 2006. Echinococcus multilocularis: developmental stage-specific expression of Antigen B 8-kDa-subunits. *Exp. Parasitol.* 113, 75–82.
- Massey, J.B., Bick, D.H., Pownall, H.J., 1997. Spontaneous transfer of monoacyl amphiphiles between lipid and protein surfaces. *Biophys. J.* 72, 1732–43.
- McDermott, L., Kennedy, M.W., McManus, D.P., Bradley, J.E., Cooper, A., Storch, J., 2002. How helminth lipid-binding proteins offload their ligands to membranes: differential mechanisms of fatty acid transfer by the ABA-1 polyprotein allergen and Ov-FAR-1 proteins of nematodes and Sj-FABPc of schistosomes. *Biochemistry* 41, 6706–13.
- McDermott, L., Moore, J., Brass, a, Price, N.C., Kelly, S.M., Cooper, a, Kennedy, M.W., 2001. Mutagenic and chemical modification of the ABA-1 allergen of the nematode *Ascaris*: consequences for structure and lipid binding properties. *Biochemistry* 40, 9918–26.
- McIntosh, A.L., Atshaves, B.P., Huang, H., Gallegos, A.M., Kier, A.B., Schroeder, F., 2008. Fluorescence techniques using dehydroergosterol to study cholesterol trafficking. *Lipids* 43, 1185–208.
- McManus, D.P., Zhang, W., Li, J., Bartley, P.B., 2003. Echinococcosis. *Lancet* 362, 1295–304.
- Meenan, N.A.G., Ball, G., Bromek, K., Uhrin, D., Cooper, A., Kennedy, M.W., Smith, B.O., 2011. Solution structure of a repeated unit of the ABA-1 nematode polyprotein allergen of *Ascaris* reveals a novel fold and two discrete lipid-binding sites. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1040.
- Merelo, J.J., Andrade, M.A., Prieto, A., Morán, F., 1994. Proteinotopic feature maps. *Neurocomputing* 6, 443–454.
- Monteiro, K., Zaha, A., Ferreira, H., 2008. Recombinant subunits as tools for the structural and functional characterization of *Echinococcus granulosus* antigen B. *Exp. Parasitol.* 119, 490–8.
- Monteiro, K.M., Cardoso, M.B., Follmer, C., da Silveira, N.P., Vargas, D.M., Kitajima, E.W., Zaha, A., Ferreira, H.B., 2012. *Echinococcus granulosus* antigen B structure: subunit composition and oligomeric states. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1551.
- Monteiro, K.M., Scapin, S.M.N., Navarro, M.V.A.S., Zanchin, N.I.T., Cardoso, M.B., da Silveira, N.P., Gonçalves, P.F.B., Stassen, H.K., Zaha, A., Ferreira, H.B., 2007. Self-assembly and structural characterization of *Echinococcus granulosus* antigen B recombinant subunit oligomers. *Biochim. Biophys. Acta* 1774, 278–85.
- Moore, K.J., Freeman, M.W., 2006. Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 1702–11.
- Moral, M., 2012. Enfermedades Infecciosas: Hidatidosis. Guía Para el Equipo de Salud (<http://www.msal.gov.ar/images/stories/epidemiologia/pdf/guia-medica-hidatidosis>). Buenos Aires, Argentina.
- Murphy, A.J., Westerterp, M., Yvan-Charvet, L., Tall, A.R., 2012. Anti-atherogenic mechanisms of high density lipoprotein: Effects on myeloid cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1821, 513–521.
- Murphy, J.E., Tedbury, P.R., Homer-Vanniasinkam, S., Walker, J.H., Ponnambalam, S., 2005. Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors. *Atherosclerosis* 182, 1–15.

- Muzulin, P.P.M., Kamenetzky, L., Gutierrez, A.M., Guarnera, E.A., Rosenzvit, M.C., 2008. *Echinococcus granulosus* antigen B gene family: Further studies of strain polymorphism at the genomic and transcriptional levels. *Exp. Parasitol.* 118, 156–64.
- Nakajima, N., Ikada, Y., 1995. Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media. *Bioconjug. Chem.* 6, 123–30.
- Nakao, M., Lavikainen, A., Yanagida, T., Ito, A., 2013. Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). *Int. J. Parasitol.* 43, 1017–29.
- Nie, H.-M., Xie, Y., Fu, Y., Yang, Y.-D., Gu, X.-B., Wang, S.-X., Peng, X., Lai, W.-M., Peng, X.-R., Yang, G.-Y., 2013. Cloning and characterization of the fatty acid-binding protein gene from the protoscolex of *Taenia multiceps*. *Parasitol. Res.* 112, 1833–9.
- Obal, G., Ramos, A.L., Silva, V., Lima, A., Batthyany, C., Bessio, M.I., Ferreira, F., Salinas, G., Ferreira, A.M., 2012. Characterisation of the native lipid moiety of *Echinococcus granulosus* antigen B. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1642.
- Odegaard, J.I., Chawla, A., 2013. The immune system as a sensor of the metabolic state. *Immunity* 38, 644–54.
- Oren, Z., Shai, Y., 1998. Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 47, 451–63.
- Oriol, C., Oriol, R., 1975. Physiocochemical properties of a lipoprotein antigen of *Echinococcus granulosus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24, 96–100.
- Oriol, R., Williams, J.F., Pérez Esandi, M. V., Oriol, C., 1971. Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20, 569–74.
- Ortona, E., Riganò, R., Margutti, P., Notargiacomo, S., Ioppolo, S., Vaccari, S., Barca, S., Buttari, B., Profumo, E., Teggi, A., Siracusano, A., 2000. Native and recombinant antigens in the immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. *Parasite Immunol.* 22, 553–9.
- Ortona, E., Siracusano, A., Castro, A., Rigano, R., Mühlischlegel, F., Ioppolo, S., Notargiacomo, S., Frosch, M., 1995. Use of a monoclonal antibody against the antigen B of *Echinococcus granulosus* for purification and detection of antigen B. *Appl. Parasitol.* 36, 220–5.
- Pan, S.H., Malcolm, B.A., 2000. Reduced background expression and improved plasmid stability with pET vectors in BL21 (DE3). *Biotechniques* 29, 1234–8.
- Parkinson, J., Wasmuth, J.D., Salinas, G., Bizarro, C. V., Sanford, C., Berriman, M., Ferreira, H.B., Zaha, A., Blaxter, M.L., Maizels, R.M., Fernández, C., 2012. A transcriptomic analysis of *Echinococcus granulosus* larval stages: implications for parasite biology and host adaptation. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1897.
- Plüddemann, A., Neyen, C., Gordon, S., 2007. Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands. *Methods* 43, 207–17.
- Porfido, J.L., Alvite, G., Silva, V., Kennedy, M.W., Esteves, A., Corsico, B., 2012. Direct interaction between EgFABP1, a fatty acid binding protein from *Echinococcus granulosus*, and phospholipid membranes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1893.

- Rahman, M., Lee, E.-G., Kim, S.-H., Bae, Y.-A., Wang, H., Yang, Y., Kong, Y., 2012. Characterization of hydrophobic-ligand-binding proteins of *Taenia solium* that are expressed specifically in the adult stage. *Parasitology* 139, 1361–74.
- Ramos, A.L., 2008. Avances en la estructura y función de la lipoproteína B (Antígeno B) de *Echinococcus granulosus*. Universidad de la República.
- Rey Burusco, M.F., 2014. Estudio biofísico y estructural de NaFAR1, miembro de una nueva familia de proteínas de nematodos que unen ácidos grasos y retinol. Universidad Nacional de La Plata.
- Richieri, G. V., Ogata, R.T., Kleinfeld, A.M., 1992. A fluorescently labeled intestinal fatty acid binding protein. Interactions with fatty acids and its use in monitoring free fatty acids. *J. Biol. Chem.* 267, 23495–501.
- Rigano, R., Buttari, B., Profumo, E., 2007. *Echinococcus granulosus* antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response. *Infect. Immun.* 75, 1667–78.
- Riganò, R., Profumo, E., Bruschi, F., Carulli, G., Azzarà, A., Ioppolo, S., Buttari, B., Ortona, E., Margutti, P., Teggi, A., Siracusano, A., 2001. Modulation of human immune response by *Echinococcus granulosus* antigen B and its possible role in evading host defenses. *Infect. Immun.* 69, 288–96.
- Rott, M., Fernández, V., Farias, S., Ceni, J., 2000. Comparative analysis of two different subunits of antigen B from *Echinococcus granulosus*: gene sequences, expression in *Escherichia coli* and serological evaluation. *Acta Trop.* 75, 331–340.
- Saghir, N., Conde, P.J., Brophy, P.M., Barrett, J., 2000. A new diagnostic tool for neurocysticercosis is a member of a cestode specific hydrophobic ligand binding protein family. *FEBS Lett.* 487, 181–4.
- Saghir, N., Conde, P.J., Brophy, P.M., Barrett, J., 2001. Biochemical characterisation of a hydrophobic ligand binding protein from the tapeworm *Hymenolepis diminuta*. *Int. J. Parasitol.* 31, 653–60.
- Schlame, M., Rua, D., Greenberg, M.L., 2000. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog. Lipid Res.* 39, 257–88.
- Schmid, F., 1997. Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational change: 4. Circular dichroism, in: Creighton (Ed.), *Protein Structure: A Practical Approach*. Oxford University Press, New York, pp. 261–297.
- Schneider, W.J., 2008. Lipoprotein receptors, in: Dennis E. Vance and Jean E. Vance (Ed.), *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Elsevier B.V., pp. 555–578.
- Schroeder, F., 1984. Fluorescent sterols: Probe molecules of membrane structure and function. *Prog. Lipid Res.* 23, 97–113.
- Shai, Y., 2002. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* 66, 236–48.
- Shepherd, J.C., Aitken, A., McManus, D.P., 1991. A protein secreted in vivo by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44, 81–90.

- Siracusano, A., Margutti, P., Delunardo, F., Profumo, E., Riganò, R., Buttari, B., Teggi, A., Ortona, E., 2008. Molecular cross-talk in host–parasite relationships: The intriguing immunomodulatory role of *Echinococcus* antigen B in cystic echinococcosis. *Int. J. Parasitol.* 38, 1371–6.
- Smutzer, G., Crawford, B.F., Yeagle, P.L., 1986. Physical properties of the fluorescent sterol probe dehydroergosterol. *Biochim. Biophys. Acta* 862, 361–71.
- Smyth, J.D., McManus, D.P., 1989. *The Physiology and Biochemistry of Cestodes*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Spickler, A.R., 2011. *Echinococcosis* (<http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/echinococcosis.pdf>), CFSPH. Iowa, USA.
- Sporstøl, M., Mousavi, S.A., Eskild, W., Roos, N., Berg, T., 2007. ABCA1, ABCG1 and SR-BI: hormonal regulation in primary rat hepatocytes and human cell lines. *BMC Mol. Biol.* 8, 5.
- Storch, J., 1993. Diversity of fatty acid-binding protein structure and function: studies with fluorescent ligands. *Mol. Cell. Biochem.* 123, 45–53.
- Storch, J., Bass, N.M., 1990. Transfer of fluorescent fatty acids from liver and heart fatty acid-binding proteins to model membranes. *J. Biol. Chem.* 265, 7827–31.
- Storch, J., Bass, N.M., Kleinfeld, A.M., 1989. Studies of the fatty acid-binding site of rat liver fatty acid-binding protein using fluorescent fatty acids. *J. Biol. Chem.* 264, 8708–13.
- Storch, J., Corsico, B., 2008. The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid-binding proteins. *Annu. Rev. Nutr.* 28, 73–95.
- Storch, J., Kleinfeld, A.M., 1986. Transfer of long-chain fluorescent free fatty acids between unilamellar vesicles. *Biochemistry* 25, 1717–26.
- Storch, J., Thumser, A.E., 2000. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1486, 28–44.
- Studier, F.W., 1991. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J. Mol. Biol.* 219, 37–44.
- Studier, F.W., Moffatt, B.A., 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113–30.
- Thompson, R.C.A., 1986. *Echinococcus and Hydatid Disease*. George Allen & Unwin, London.
- Tielens, A.G.M., Hellemond, J.J. van, 2006. Unusual Aspects of Metabolism in Flatworm Parasites, in: Marks, A.G.M., J., N. (Eds.), *Parasitic Flatworms: Molecular Biology, Biochemistry, Immunology and Physiology*. CABI, Wallingford, UK, p. 448.
- Tsai, I.J., Zarowiecki, M., Holroyd, N., Garcarrubio, A., Sanchez-Flores, A., Brooks, K.L., Tracey, A., Bobes, R.J., Fragoso, G., Scitutto, E., Aslett, M., Beasley, H., Bennett, H.M., Cai, J., Camicia, F., Clark, R., Cucher, M., De Silva, N., Day, T. a, Deplazes, P., Estrada, K., Fernández, C., Holland, P.W.H., Hou, J., Hu, S., Huckvale, T., Hung, S.S., Kamenetzky, L., Keane, J. a, Kiss, F., Koziol, U., Lambert, O., Liu, K., Luo, X., Luo, Y., Macchiaroli, N., Nichol, S., Paps, J., Parkinson, J., Pouchkina-Stantcheva, N., Riddiford, N., Rosenzvit, M., Salinas, G., Wasmuth, J.D., Zamanian, M., Zheng, Y., Cai, X., Soberón, X., Olson, P.D., Laclette,

- J.P., Brehm, K., Berriman, M., 2013. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature* 496, 57–63.
- Uversky, V.N., 1993. Use of fast protein size-exclusion liquid chromatography to study the unfolding of proteins which denature through the molten globule. *Biochemistry* 32, 13288–98.
- Van der Vusse, G.J., van Bilsen, M., Glatz, J.F.C., Hasselbaink, D.M., Luiken, J.J.F.P., 2002. Critical steps in cellular fatty acid uptake and utilization. *Mol. Cell. Biochem.* 239, 9–15.
- Voelker, D.R., 2008. Lipid assembly into cell membranes, in: Vance, D.E.V. and J.E. (Ed.), *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Elsevier B.V., pp. 441–484.
- Wang, X., Collins, H.L., Ranalletta, M., Fuki, I. V, Billheimer, J.T., Rothblat, G.H., Tall, A.R., Rader, D.J., 2007. Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J. Clin. Invest.* 117, 2216–24.
- Williams, J.F., Pérez Esandi, M. V, Oriol, R., 1971. Evaluation of purified lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* in the immunodiagnosis of human infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20, 575–9.
- Wüstner, D., 2007. Fluorescent sterols as tools in membrane biophysics and cell biology. *Chem. Phys. Lipids* 146, 1–25.
- Yang, D., Chen, L., Xie, Y., Wu, X., Nong, X., Peng, X., Lai, W., Gu, X., Wang, S., Peng, X., Yang, G., 2013. Expression and immunolocalisation of TpFABP as a candidate antigen for the serodiagnosis of rabbit *Taenia pisiformis* cysticercosis. *Parasite* 20, 53.
- Zhang, W., Li, J., Jones, M.K., Zhang, Z., Zhao, L., Blair, D., McManus, D.P., 2010. The *Echinococcus granulosus* antigen B gene family comprises at least 10 unique genes in five subclasses which are differentially expressed. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e784.
- Zheng, H., Zhang, W., Zhang, L., Zhang, Z., Li, J., Lu, G., Zhu, Y., Wang, Y., Huang, Y., Liu, J., Kang, H., Chen, J., Wang, L., Chen, A., Yu, S., Gao, Z., Jin, L., Gu, W., Wang, Z., Zhao, L., Shi, B., Wen, H., Lin, R., Jones, M.K., Brejova, B., Vinar, T., Zhao, G., McManus, D.P., Chen, Z., Zhou, Y., Wang, S., 2013. The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. *Nat. Genet.* 45, 1168–77.
- Zheng, Y., Blair, D., Bradley, J.E., 2013. Phyletic distribution of fatty acid-binding protein genes. *PLoS One* 8, e77636.
- Zhu, Y., Kodvawala, A., Hui, D.Y., 2010. Apolipoprotein E inhibits toll-like receptor (TLR)-3- and TLR-4-mediated macrophage activation through distinct mechanisms. *Biochem. J.* 428, 47–54.