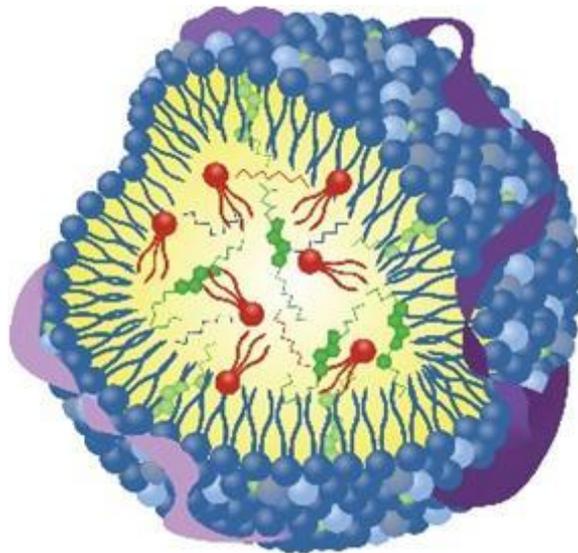


Tesina de la Licenciatura en Bioquímica

Estudio de la capacidad del Antígeno B nativo de *Echinococcus granulosus* de modular la inflamación mediada por macrófagos



Sofía Lagos

Tutora: Dra. Ana María Ferreira

Co-tutora: Lic. Ana Maite Folle

Laboratorio de Inmunología

Facultad de Ciencias

Enero 2018

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a Ana, mi tutora, que me dio la oportunidad de integrarme a su grupo de trabajo. Gracias por todas las enseñanzas, discusiones, correcciones que con tanta paciencia me brindaste. Te agradezco también por estar siempre pendiente, no solo de mí, sino de todos tus estudiantes. En segundo lugar, me gustaría agradecer a Maite, mi cotutora, quien con una paciencia interminable me guió y enseñó durante todo este tiempo, siempre dispuesta a despejar mis dudas. Ha sido un placer compartir tantas horas de trabajo contigo.

No puedo dejar de agradecer a toda la casita del medio, quienes me integraron e hicieron sentir cómoda desde el primer día. Agradezco todos sus consejos y ayudas cotidianas.

Gracias también a Uds., mis amigos, a los de siempre y a los que tuve la suerte de conocer por haberme metido en este mundo de la ciencia. Agradezco todos los días de estudio compartidos y también el escucharme, aconsejarme y acompañarme siempre.

Por supuesto, quiero agradecer a aquellas personas que me han acompañado durante toda la vida, mi familia. Estoy completamente segura que si hoy estoy culminando la licenciatura es por ellos, consecuencia de sus enseñanzas y de su apoyo y amor incondicionales. Porque han puesto todo a mi disposición para que yo pudiera estudiar esta carrera.

Sólo me resta agradecer a la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), Programa Grupos I+D 2014, Proyecto C646-348 y al Programa para el Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), programas que brindaron financiamiento que permitieron llevar a cabo este trabajo final.

A todos Uds. muchas gracias!!!

Resumen

El estadio larvario del parásito *Echinococcus granulosus* sensu lato (hidátide) es el agente causante de la hidatidosis quística. Esta infección se caracteriza por la formación de quistes uniloculares en órganos parenquimatosos, principalmente hígado y pulmones, que pueden alcanzar tamaños de decenas de milímetros y aún así, pasar desapercibidos por largos períodos de tiempo. Esto refleja la capacidad de la hidátide de desplegar mecanismos sumamente eficaces en controlar la respuesta inmune de su hospedero. En particular, se ha propuesto que el Antígeno B (AgB), lipoproteína mayoritaria producida por la hidátide, podría tener un rol en la inmunomodulación llevada a cabo por el parásito. Este trabajo se centró en el estudio del potencial inmunomodulador del AgB sobre los macrófagos, debido al importante papel de estas células en la eliminación de patógenos y reparación de tejidos. El AgB es una lipoproteína compleja (230kDa) perteneciente a la familia de proteínas de unión de ligandos hidrofóbicos (HLBP del inglés *Hydrophobic Ligand Binding Protein*). Su componente proteico está codificado por varios genes polimórficos (apolipoproteínas AgB8/1-5), mientras que su porción lipídica se compone de varias clases de lípidos tanto neutros como polares. Se trata de una molécula que es altamente inmunogénica pero a la vez podría estar involucrada en la modulación de la respuesta inmune del hospedero. De hecho, estudios *in vitro* sugieren que el AgB es capaz de interferir con diferenciación y maduración/activación de células dendríticas humanas, la quimiotaxis en neutrófilos y favorecer la generación de respuestas de tipo Th2. Sin embargo, estos estudios fueron llevados a cabo utilizando AgB desnaturalizado por lo que es cuestionable su relevancia en la situación fisiológica. Para avanzar en la comprensión del papel del AgB en la inmunobiología de la infección hidática, nuestro grupo desarrolló metodologías para purificar el AgB preservando sus propiedades fisicoquímicas, basadas en la cromatografía de inmunoafinidad (AgB inmunopurificado) o en la ultracentrifugación en gradiente de densidad. Así, se determinó que el AgB nativo se une a macrófagos inhibiendo la producción de citoquinas proinflamatorias inducida por LPS, aunque este último hecho sólo se observó con el AgB inmunopurificado, ya que las preparaciones obtenidas por ultracentrifugación indujeron *per se* la producción de citoquinas proinflamatorias en macrófagos. En el presente trabajo buscamos explorar las razones de estas diferencias entre las preparaciones de AgB, ajustando el protocolo de purificación basado en la ultracentrifugación, sobre el cual se hicieron modificaciones. Las modificaciones incluyeron un paso de filtrado del líquido hidático (LH), para eliminar posibles agregados del AgB con actividad proinflamatoria, y la adición de antibiótico/antimicótico (AbAm) durante la purificación para evitar el crecimiento de microorganismos. El paso de filtrado no cambió el tamaño de las partículas lipoproteicas ni modificó la capacidad de las preparaciones de AgB de inducir la producción de las citoquinas IL-1 β e IL-6. El uso de AbAm, en particular adicionándolo al LH, produjo una notable disminución de los niveles de IL-1 β e IL-6 secretados por macrófagos incubados con el AgB, sugiriendo la presencia de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs del inglés *Pathogen Associated Molecular Patterns*) bacterianos en las preparaciones de AgB preparadas a partir del LH. Esta modificación mejoró la calidad de las preparaciones aunque no eliminó completamente la actividad proinflamatoria. A continuación, se demostró que a pesar de la posible contaminación con PAMPs, la presencia del AgB durante la estimulación de macrófagos con diversos estímulos inflamatorios (LPS, LPS+ATP y zymosán) disminuyó la producción de IL-

1 β e IL-6, confirmando un efecto regulador sobre la producción de mediadores inflamatorios por macrófagos activados.

Listado de abreviaturas

AbAm: solución antibiótica y antimicótica

AgB: antígeno B

AgB_{A1}: antígeno B con agregado de antibiótico/antimicótico 1

AgB_{A2}: antígeno B con agregado de antibiótico/antimicótico 2

AgB_F: antígeno B filtrado

AgB_{S/F}: antígeno B sin filtrar

APCs: células presentadoras de antígeno

BHT: 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxytolueno

BSA: albúmina sérica bovina

DAMPs: patrones moleculares asociados al daño tisular (del inglés *Damage Associated Molecular Patterns*)

DCs: células dendríticas

DLS: dispersión dinámica de la luz (del inglés *Dynamic Light Scattering*)

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

FC ϵ : porción Fc del isotipo IgE

Hd_f: fracción de alta densidad

HDL: lipoproteína de alta densidad

HLBP: proteína de unión a ligandos hidrofóbicos (del inglés *Hydrophobic Ligand Binding Protein*)

iNOS: óxido nítrico sintetasa inducible (del inglés *Inducible Nitric Oxide Synthetase*)

LAL: lisado de amebocitos de *Limulus* (del inglés *Limulus Amebocyte Lysate*)

Ld_f: fracción de baja densidad

LDL: lipoproteína de baja densidad

LH: líquido hidático

LH_f: líquido hidático fértil

LPS: lipopolisacárido de *Escherichia coli*

LRR: repetidos ricos en leucina (del inglés *leucine reach repeats*)

mAb: anticuerpo monoclonal

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol thiazolyl

NOS2: óxido nítrico sintetasa-2

PAF: factor activador de plaquetas

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés *Pathogen Associated Molecular Patterns*)

PBMCs: células mononucleares de sangre periférica (del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

PBS: tampón fosfato salino (del inglés *Phosphate-Buffered Saline*)

PBS_{EB}: tampón fosfato salino conteniendo 5 mM EDTA y 20 μ M BHT

PD-L1: ligando de muerte programada 1 (del inglés *Programmed Death-Ligand 1*)

PD-L2: ligando de muerte programada 2 (del inglés *Programmed Death-Ligand 2*)
PE: protoscólicas
PEC: células de exudado del peritoneo
pLL: material particulado de capa laminar (del inglés *Particles from Laminated Layer*)
PMA: ésteres de forbol
PRRs: receptores de reconocimiento de patrones (del inglés *Pattern Recognition Receptor*)
QH: quiste hidático
QS-: Q-Sefarosa negativa
QS+: Q-Sefarosa positiva
rAgB8/1: apolipoproteína recombinante de la subunidad 1 del AgB
ROS: especies reactivas del oxígeno (del inglés *Reactive Oxygen Species*)
R_H: radio hidrodinámico
s.l.: sensu lato
s.s.: sensu stricto
SFB: suero fetal bovino
TAGs: triacilglicéridos
TLRs: receptores de tipo Toll (del inglés *Toll-Like Receptors*)
TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa
UE: unidad de endotoxina

Índice

Resumen.....	i
Listado de abreviaturas	iii
1. Introducción.....	1
1.1. El cestodo <i>Echinococcus granulosus</i> sensu lato	1
1.1.1. Generalidades del ciclo de vida.....	1
1.1.2. Características de la respuesta inmune del hospedero	3
1.2. El Antígeno B de <i>E. granulosus</i>	6
1.3. Macrófagos como células claves del desarrollo y resolución de la inflamación	10
2. Hipótesis de trabajo y objetivos	15
2.1. Objetivo general.....	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. Materiales y Métodos.....	17
3.1. Reactivos químicos y bioquímicos	17
3.2. Material parasitario	17
3.3. Purificación del AgB	17
3.3.1. Purificación 1.....	18
3.3.2. Purificación 2.....	18
3.3.3. Purificación 3.....	18
3.4. Determinación de proteínas	18
3.5. Análisis de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	19
3.6. Determinación del radio hidrodinámico por análisis de dispersión dinámica de la luz (DLS) ..	19
3.7. Detección de endotoxinas bacterianas mediante el ensayo del lisado de amebocitos de <i>Limulus polyphemus</i> (LAL).....	19
3.8. Línea celular THP-1 y su diferenciación a macrófagos	19
3.9. Preparaciones de agonistas de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) para estimulación de los macrófagos.....	20
3.9.1. Zymosán	20
3.9.2. LPS	20
3.9.3. ATP	20
3.10. Estimulación de macrófagos THP-1 con AgB y/o agonistas de PRRs	20
3.11. Evaluación de la viabilidad celular por ensayo MTT	21
3.12. Determinación de nitritos por el método de Greiss	21
3.13. Cuantificación de citoquinas por ELISA	21
4. Resultados	23

4.1. Modificaciones en el protocolo de purificación del AgB nativo para su uso en ensayos funcionales.....	23
4.1.1. Obtención y caracterización de preparaciones de AgB obtenidas utilizando un paso de filtración del LH _f	23
4.1.2. Caracterización de preparaciones de AgB obtenidas con el adición de antibiótico y antimicótico durante su purificación a partir de LH _f	27
4.2. Análisis del efecto del AgB sobre la activación de macrófagos frente a la estimulación con agonistas de PRRs	31
4.2.1. Ensayos utilizando LPS como agonista	32
4.2.2. Ensayo utilizando LPS + ATP como agonista	36
4.2.3. Ensayos utilizando zymosán como agonista	37
5. Discusión.....	41
6. Conclusiones y perspectivas	49
7. Referencias	51

1. Introducción

1.1. El cestodo *Echinococcus granulosus* sensu lato

1.1.1. Generalidades del ciclo de vida

La hidatidosis o echinococcosis quística es la infección provocada por las larvas de parásitos platelmintos pertenecientes al género *Echinococcus granulosus* sensu lato (s.l.), que afectan a animales ungulados domésticos así como también al ser humano¹. Las especies incluidas en este género son *E. sensu stricto* (s.s.), *E. equinus*, *E. ortleppi*, *E. canadensis*, *E. shiquicus* y *E. felidis*². Este conjunto de especies divergen en la dinámica de transmisión, ritmo de desarrollo, antigenicidad, sensibilidad a drogas y en su infectividad y patogenicidad en humanos. Dentro de las especies de *E. granulosus* s.l. que afectan a humanos se ha reportado, según estudios epidemiológicos, que las más importantes son *E. granulosus* s.s. y *E. granulosus canadensis*, ambas con una extensa distribución geográfica y causantes del 73% y 12% de los casos de echinococcosis humana, respectivamente³.

La echinococcosis quística se caracteriza por la formación de quistes uniloculares principalmente en órganos parenquimatosos. Aún cuando los quistes pueden alcanzar un tamaño de decenas de centímetros, la infección suele pasar desapercibida y establecerse de forma crónica⁴. Esto es debido al lento crecimiento (de milímetros a decenas de milímetros por año) de la larva y principalmente a la excelente adaptación del parásito a su hospedero reflejada en la mínima respuesta inflamatoria producida⁵. Los síntomas, que a veces se presentan en pacientes hidáticos, son producto de la compresión de órganos generada por el crecimiento de la larva o por ruptura de los quistes hidáticos. Por este motivo, la sintomatología es variable dependiendo del órgano en el cual se establece el parásito.

E. granulosus s.l. posee un ciclo de vida complejo que involucra hospederos intermediarios y hospederos definitivos^{1,6,7}. En la Figura 1 se esquematiza este ciclo para *E. granulosus* s.s.. El estadio adulto del parásito es un gusano que habita el intestino delgado del perro, su hospedero definitivo. El perro libera, a través de la materia fecal, huevos embrionados que son ingeridos por el hospedero intermediario. Éstos últimos son animales ungulados domésticos, siendo los ovinos los hospederos intermediarios a los cuales el parásito está mejor adaptado. Sin embargo, es posible también la infección parasitaria en bovinos, constituyendo una situación común en nuestro medio, aunque en este caso existe una menor adaptación del parásito al hospedero. Una vez alcanzado el intestino del hospedero intermediario se produce la eclosión del huevo que libera al embrión u oncósfera, la cual atraviesa las paredes intestinales y viaja, vía sanguínea y/o linfática, hacia los órganos en los cuales se establece y desarrolla al estadio larvario. Comúnmente la oncósfera se instala en hígado y pulmones aunque no son excluyentes otras localizaciones. La oncósfera se desarrolla formando quistes uniloculares de contenido líquido (hidátide), que aumentan de tamaño progresivamente. Cuando el quiste alcanza madurez genera protoscólices (PE) que son liberados en su interior, transformándose en fértil. La generación de quistes fértiles se relaciona con la adaptación que posee el parásito a su hospedero intermediario; así en los ovinos los quistes suelen ser fértiles mientras que en los bovinos existe una mayor proporción de quistes no fértiles (observación

que proviene del procesamiento de vísceras infectadas en la Cátedra de Inmunología de la Facultad de Química y Ciencias a lo largo de varias décadas). El ciclo de vida del parásito se completa cuando los perros ingieren vísceras de los hospederos intermedios que están infectadas con quistes fértiles (contienen PE). En el tracto digestivo del perro, los PE se evaginan y se adhieren a la mucosa intestinal continuando su desarrollo al estadio de gusano adulto. El hombre representa un hospedero intermedio accidental ya que interrumpe el ciclo de vida del parásito. La infección en humanos está asociada a malas prácticas sanitarias y se produce cuando se ingiere en forma accidental agua y/o vegetales contaminados con huevos de *E. granulosus*.

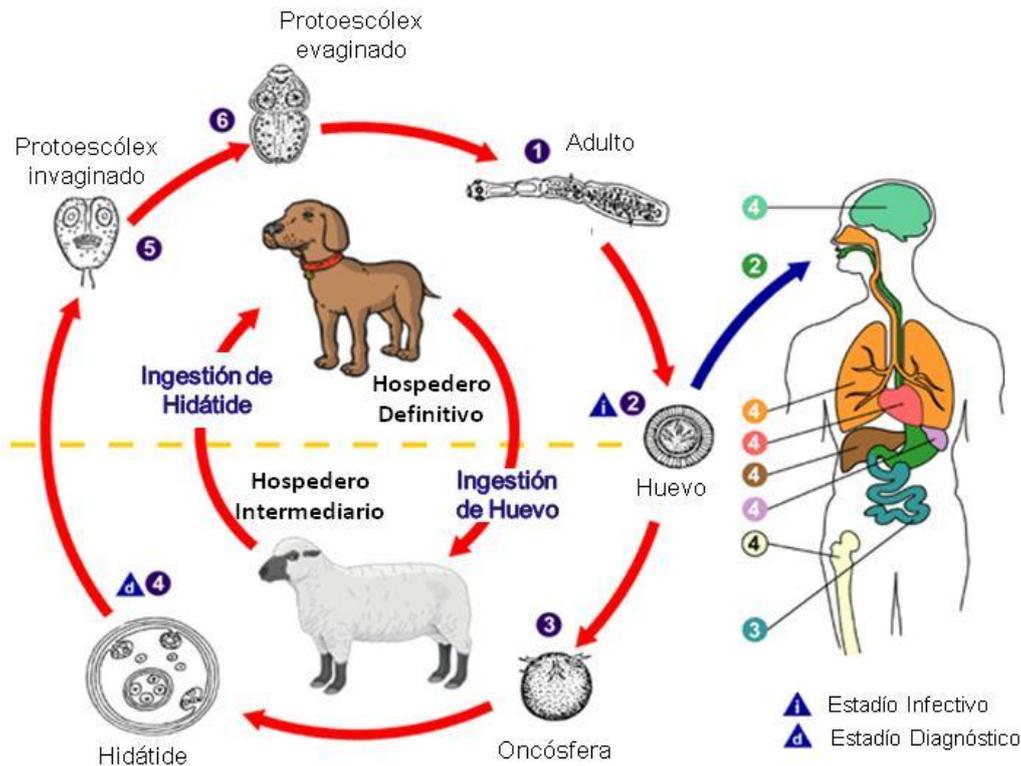


Figura 1: Ciclo de vida de *E. granulosus s.s.* Tomado y adaptado del sitio web de Centers for Disease Control and Prevention de Estados Unidos <https://www.cdc.gov/parasites/echinococcus/biology.html>.

Como fue previamente mencionado, la larva o hidátide se establece en órganos parenquimatosos comúnmente hígado y pulmones; es una estructura subsférica de contenido líquido (líquido hidático, LH). El LH contiene productos de excreción-secreción del parásito así como también moléculas derivadas del hospedero, principalmente albúmina e inmunoglobulinas^{8,9}. La pared de la hidátide (ver Figura 2) está formada por dos capas: una capa interna, celular, denominada capa germinativa y una capa externa, acelular, llamada laminar. Esta última es permeable, rica en carbohidratos y puede alcanzar varios milímetros de grosor¹⁰. La capa germinativa constituye la estructura viva de la larva a partir de la cual se generan los PE por brotamiento (reproducción asexual). En ocasiones los PE quedan recubiertos por una capa germinativa dentro de la cavidad de la hidátide, formando lo que se denomina vesícula hija. Además, se pueden formar hidátides hijas cuando la vesícula hija adquiere una capa laminar, sintetizada por las células de la capa germinativa. La infección temprana con *E. granulosus* genera una reacción inflamatoria local con infiltrado de leucocitos.

Esta respuesta inflamatoria inicial es controlada en los hospederos intermediarios a los cuales el parásito muestra mejor adaptación y una vez resuelta la inflamación, las hidátides quedan rodeadas por una capa fibrosa, denominada adventicia, proveniente del hospedero^{1,11}. La hidátide en conjunto con la capa adventicia conforman lo que se conoce como quiste hidático (QH) (ver Figura 2). En contraste, cuando el parásito no está bien adaptado a su hospedero se forma un granuloma, es decir una reacción inflamatoria que presenta gran infiltrado de células entre ellas se destacan eosinófilos y células mononucleares¹². Así, en los ovinos suele hallarse una capa de colágeno recubriendo la hidátide mientras que los bovinos, hospederos a los cuales *E. granulosus* s.s. no se encuentra óptimamente adaptado, se suelen observar infiltrados inflamatorios de tipo granulomatoso.

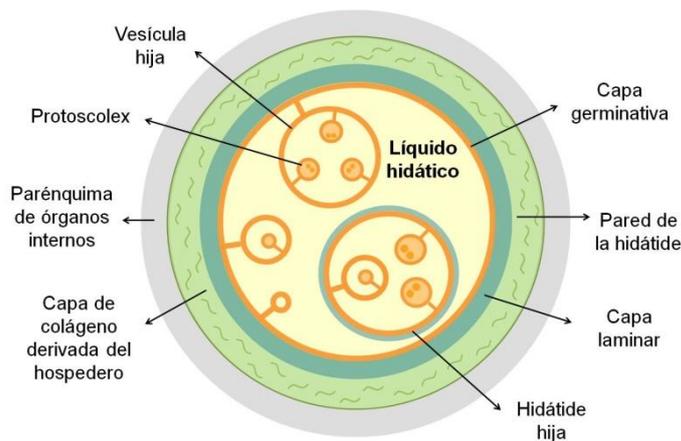


Figura 2: Esquema de un quiste hidático. Se representan las principales estructuras de la hidátide. Tomado y adaptado de ¹³.

La infección por este parásito no presenta una alta mortalidad pero si constituye un problema de salud pública ya que los índices de morbilidad son altos, sobretudo en países con gran actividad ganadera. La larva se establece en un hospedero inmunocompetente, por lo tanto se genera una respuesta inmune contra el parásito. De hecho, se ha reportado la presencia de anticuerpos específicos¹⁴, unión de componentes del complemento a la capa laminar¹⁵ e infiltrados inflamatorios tempranos en modelos experimentales^{16,17}. Aún así, esta respuesta no logra eliminar al parásito y se establecen infecciones crónicas lo que refleja una gran adaptación del parásito a sus hospederos intermediarios.

1.1.2. Características de la respuesta inmune del hospedero

Para comprender la gran adaptación de *E. granulosus* a sus hospederos intermediarios es necesario conocer la respuesta inmune que es montada contra los parásitos helmintos. La respuesta de tipo 2 ha sido evolutivamente seleccionada para lidiar contra este tipo de parásitos¹⁸. El fin de esta respuesta es la eliminación del patógeno (a través del daño o expulsión fuera del organismo), aunque en caso de no ser posible se busca contener al parásito mediante su encapsulación. La respuesta de tipo 2 se caracteriza por la activación celular de eosinófilos, basófilos y mastocitos, y por la proliferación de células T secretoras de IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13¹⁸. La respuesta de anticuerpos involucra altos niveles de IgE, IgG1 e IgG4 específicas contra el parásito. Los eosinófilos, basófilos y mastocitos presentan en su superficie receptores que reconocen la porción Fc del isotipo IgE (Fcε). Así, utilizando estos receptores

estas células pueden reconocer específicamente componentes del parásito y activarse, liberando mediadores inflamatorios y gránulos con propiedades citotóxicas. En el caso de los eosinófilos, además de poseer receptores para la porción Fc de la IgE, también poseen receptores para IgG que les permiten llevar a cabo la citotoxicidad mediada por anticuerpos. Las citoquinas que son secretadas por las células T median diversas funciones efectoras y particularmente útiles para parásitos que habitan en el tracto digestivo (intestino delgado). La IL-13 aumenta la producción de mucus en células de Goblet, activa las células musculares lisas en tejidos mucosos para producir hipermotilidad y aumenta el recambio de células en la mucosa. La IL-3 e IL-9 producen en la mucosa el reclutamiento, expansión y activación de la población especializada de mastocitos de mucosa. Estas células liberan grandes cantidades de mediadores inflamatorios como prostaglandinas, leucotrienos y proteasas. La IL-5 producida por las células Th2 recluta y activa los eosinófilos, que liberan moléculas citotóxicas almacenadas en sus gránulos, como la proteína básica mayor. Por otro lado, otras citoquinas como la IL-4 e IL-13 se encuentran asociadas a las funciones de reparación tisular y contención del parásito a través de su encapsulamiento. Esto es porque, entre otras acciones, estas citoquinas inducen la diferenciación de los macrófagos a un fenotipo de activación denominado alternativo o M2. Los macrófagos alternativamente activados producen ornitina a partir de arginina a través de la actividad de la enzima arginasa-1. La ornitina aumenta la contractilidad del músculo liso de las mucosas y promueve la reparación y remodelación tisular. Asociado también a sus funciones de reparación tisular, los macrófagos M2 estimulan la producción de colágeno cuya formación requiere del aminoácido prolina que es generado a partir de la ornitina sintetizada.

Es así que, acorde a la típica respuesta de tipo 2 producida por los parásitos helmintos, los pacientes infectados con *E. granulosus* s.l. presentan anticuerpos específicos contra el parásito de los isotipos IgE, IgG1 e IgG4¹⁴. Aún así, ha sido determinado que la respuesta inmune contra *E. granulosus* s.l. no es exclusivamente del tipo 2, existe también un componente Th1 y fundamentalmente un componente regulador¹⁹. La existencia del componente Th1 se ha documentado en un modelo murino de infección secundaria con *E. granulosus* s.l., en donde se observó en el peritoneo durante la fase temprana de la infección (hasta el día 5 post-infección) la expresión a nivel de ARNm de citoquinas del perfil Th1 (IFN- γ e IL-2) con un posterior cambio hacía el perfil Th2 (expresión de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13). Vale la pena destacar que el modelo murino no es un modelo de infección natural y además reproduce la infección secundaria con *E. granulosus* (que deriva de la ruptura del quiste en su hospedero intermediario) pero no la infección primaria. Respecto al componente regulador observado en la respuesta inmune de las infecciones con parásitos helmintos, su presencia ha llevado a la descripción de la respuesta de tipo 2 modificada¹⁸. Se ha planteado que el componente regulador/antiinflamatorio representa una adaptación de los parásitos para evadir la respuesta inmune del tipo 2¹⁸. Es así que algunos trabajos demostraron la presencia del componente regulador/antiinflamatorio y su importancia en la infección con *Echinococcus*. Un estudio en el cual se analizaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)²⁰ reveló que los pacientes infectados con *E. granulosus* mostraron un porcentaje menor de células T CD4⁺IL-17⁺, asociadas al perfil Th17, en comparación con los individuos sanos (control). Además, encontraron que el porcentaje de células T CD4⁺CD25⁺ (el marcador CD25 se asocia a las células T reguladoras) fue mayor en pacientes con hidatidosis recurrente. Por otra parte, los

niveles de expresión de factor ROR γ t, clave en dirigir la diferenciación hacia el perfil Th17, fue menor en los grupos de pacientes con hidatidosis o hidatidosis recurrente respecto al grupo de individuos sanos (control). Similarmente, los niveles séricos de IL-17 e IL-23 mostraron una tendencia a ser menores en los grupos de pacientes con hidatidosis e hidatidosis recurrente (sin alcanzar una diferencia significativa) respecto a los niveles en individuos sanos. A pesar de que no encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de Foxp3, factor de transcripción expresado en células T reguladoras Foxp3⁺, la relación ROR γ t/Foxp3 fue significativamente menor en los pacientes con hidatidosis y los niveles de las citoquinas reguladoras IL-10 y TGF- β 1 fueron mayores en los pacientes que presentaban hidatidosis o hidatidosis recurrente.

Por otra parte, existen evidencias de inmunorregulación en la infección con *Echinococcus multilocularis*. Si bien provoca una infección con características diferentes a la hidatidosis, por su cercanía filogenética resulta importante mencionar que en un modelo murino se determinó la relevancia de las células T reguladoras Foxp3⁺ para la regulación llevada a cabo por este parásito²¹. En primer lugar, hallaron que la infección aumentó la frecuencia de células T CD4⁺Foxp3⁺ y T CD4⁺IL-10⁺ en los exudados de células del peritoneo (PEC) y células de bazo. Además, para evaluar el rol de las células T CD4⁺Foxp3⁺, se tomó ventaja de un modelo murino en el cual se indujo la depleción de esta población celular (ratones DREG). Utilizando este modelo, encontraron que la carga parasitaria fue significativamente menor en el grupo de ratones DREG respecto al grupo control. Por otra parte, al examinar el rol de las células T reguladoras sobre las células presentadoras de antígeno (APCs), hallaron que la depleción de T reguladoras aumentó la expresión de la molécula presentadora MHC-II y de la molécula CD40 en las células CD11b⁺ del bazo y de la molécula coestimuladora CD86 en las células CD11b⁺ y CD11c⁺ del PEC. Además, esta depleción condujo a un aumento en la expresión de CD86 en las células CD11b⁺ y CD11c⁺ del bazo. La evaluación del perfil de respuesta Th desencadenado por la infección, sugirió que las células T Foxp3 reguladoras contribuyen a suprimir los perfiles de respuesta del tipo Th1 y Th17 así como también a disminuir las propiedades coestimuladoras en APCs. El uso de mecanismo reguladores por parte de *E. granulosus* también quedó evidenciado en un modelo murino de asma²². En este modelo se observó que la inflamación local del tejido pulmonar (principalmente mediada por eosinófilos) y el número de eosinófilos en el fluido broncoalveolar de los ratones con asma infectados con *E. granulosus* fueron significativamente menores que en los ratones asmáticos no infectados. En concordancia con esto, el análisis de la presencia de proteínas en el tejido pulmonar mostró que la infección en los ratones con asma produjo una reducción en los niveles de la proteína básica mayor de los eosinófilos y de IL-5, citoquina fundamental para la infiltración y activación de eosinófilos, en comparación con los ratones asmáticos control. Además, la infección con *E. granulosus* disminuyó el número de células de Globet inducidas por el asma. Al evaluar los efectos de la infección con el parásito sobre la inmunidad sistémica, determinaron que la infección se asoció con niveles menores de la citoquina proinflamatoria IL-17A tanto en el suero como producidos por la activación *in vitro* de esplenocitos, y aumentó el nivel de IL-10 en el sobrenadante de esplenocitos. Finalmente, al observar los perfiles de las células T CD4⁺ en células del bazo hallaron que existía un porcentaje mayor de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ reguladoras y menor de T CD4⁺IL-17A⁺ Th17 en los ratones asmáticos infectados en comparación con sus controles (asmáticos no infectados). Este conjunto de evidencia demuestra la fuerte regulación llevada a

cabo por el parásito *Echinococcus* sobre el desarrollo y los mecanismos efectores de la respuesta mediada por linfocitos T. En este sentido, es importante considerar que la generación de circuitos de regulación y/o antiinflamatorios depende de la activación de las células presentadoras y por esto la relevancia de comprender cómo los componentes del parásito logran condicionar a las APCs, principalmente células dendríticas (DCs) y macrófagos. Existen pocos trabajos que documentan este condicionamiento de las células innatas por componentes de *E. granulosus*, ya sea durante la infección o por componentes parasitarios (en estudios *in vitro* o *in vivo*). En la infección murina con PE de *E. granulosus* se describió un incremento en el porcentaje de células mieloides supresoras, definidas como CD11b⁺GR-1⁺, tanto en las PBMCs como en las células del bazo de los ratones infectados²³. Estas células constituyen una población heterogénea que abarca a los progenitores y precursores mieloides de DCs, macrófagos, granulocitos y células mieloides, con un rol en la inducción de células T reguladoras. Por otra parte, un material particulado derivado de la capa laminar de *E. granulosus* (pLL del inglés, *Particles from Laminated Layer*) mostró capacidad para inducir, en presencia de LPS, la diferenciación de DCs hacia un fenotipo semi-maduro²⁴. Este fenotipo se caracterizó por una expresión alta de CD86 y de la citoquina IL-10 y una baja expresión de CD40 y de IL-12 y se propuso su asociación con la inducción de células T reguladoras Foxp3⁺IL-10⁺. Con respecto al condicionamiento de macrófagos, la información también es escasa. Estudios realizados por nuestro grupo mostraron que durante las primeras semanas de la infección secundaria en ratón, se detectan en el peritoneo células adherentes con alta expresión de arginasa-1, compatibles con la presencia de macrófagos M2 (Ana Lía Ramos, Cátedra de Inmunología, datos no publicados). Por otra parte, estudios de interacción entre pLL y macrófagos mostraron que estas partículas son capaces de inhibir la proliferación de macrófagos residentes y reclutados inducida por IL-4 y M-CSF a través de un mecanismo que posiblemente implique la inhibición de la vía de PI3K/Akt²⁵. Otro componente parasitario con potencial para modular la activación de monocitos/macrófagos y la diferenciación de DCs es una lipoproteína conocida como antígeno B¹³, sobre la cual nos extenderemos en la siguiente sección por ser centro de estudio de esta tesina. Apoyando el concepto de la fuerte interferencia ejercida a nivel de las APCs y la activación de las células T, también vale la pena mencionar que en la infección con el helminto *T. crassiceps*, se ha observado la inducción de macrófagos M2, capaces de suprimir *in vitro* las respuestas proliferativas de células T vírgenes provocadas por la estimulación con un anticuerpo anti CD3/CD28 a través de un mecanismo dependiente de los PD-L1 y PD-L2 (del inglés *Programmed Death-Ligands 1 y 2*)²⁶. Es más, la presencia de estos macrófagos M2 inhibió la proliferación de linfocitos T CD4⁺ en un ensayo de cultivo mixto linfocitario con DCs. En suma, los antecedentes demuestran la relevancia del condicionamiento de las células innatas por componentes de parasitarios helmintos, incluyendo a *E. granulosus*, dada su repercusión sobre la respuesta inmune global que monta el hospedero.

1.2. El Antígeno B de *E. granulosus*

El antígeno B (AgB) es la principal lipoproteína de origen parasitario presente en el LH⁹. Es una macromolécula de 230 kDa relevante por su valor para el diagnóstico de la enfermedad²⁷. El componente proteico del AgB (apolipoproteína) es codificado por una familia multigénica y polimórfica, que agrupa a los genes *EgAgB1-5*²⁸. Con la reciente secuenciación del genoma de

Echinococcus granulosus s.s., se ha observado la presencia de un cluster con 7 genes del AgB que incluyen tres copias similares del *EgAgB3* y una de cada uno de los restantes. Se ha visualizado una expresión diferencial de los genes *EgAgB1-5* en los diferentes estadios del parásito. En particular, se ha estudiado su expresión a nivel del ARNm en los estadios de oncósfera, hidátide, PE, gusano adulto inmaduro y gusano adulto maduro²⁹. Mientras que los genes *EgAgB1*, *EgAgB2*, *EgAgB3* y *EgAgB5* fueron expresados en todos los estadios; la expresión de *EgAgB4* fue restringida a los estadios de hidátide, gusano adulto inmaduro y maduro. Además, fueron observadas diferencias cuantitativas en los niveles de expresión, por ejemplo la expresión del gen *EgAgB3* fue entre tres a diez veces mayor en el gusano adulto maduro respecto a los otros estadios. Los productos proteicos maduros que derivan de estos genes tienen ~ 8 kDa (AgB8/1-5) y pueden formar oligómeros de mayor peso molecular. Esta capacidad se evidencia en el perfil característico -en escalera- que muestra el AgB analizado por electroforesis (SDS-PAGE) y que es resistente a las condiciones desnaturalizantes aplicadas³⁰. Por otro lado, se ha visto que estas apolipoproteínas pertenecen a una familia de proteínas específica de los cestodos con capacidad de unir ligandos hidrofóbicos, conocidas como HLBP (del inglés, *Hydrophobic Ligand Binding Proteins*) de función desconocida³¹. Con respecto a la porción lipídica del AgB, ha sido determinado mediante gravimetría que los componentes lipídicos constituirían entre un 40-50% de la masa total del AgB³². En relación a la composición de los lípidos que conforman a la lipoproteína, se reportó un contenido heterogéneo con lípidos polares así como también lípidos neutros. Se identificaron entre los lípidos polares fosfolípidos como ser fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina, glucolípidos y trazas de cardiolipina, siendo la fosfatidilcolina el componente lipídico polar mayoritario. Respecto a los lípidos neutros, fueron identificados esteroides libres, colesterol, ésteres de esteroles, ácidos grasos libres y triacilglicéridos (TAGs) siendo estos últimos el componente más abundante dentro de los lípidos neutros. Acorde a estos hallazgos y a otros datos previamente descritos sobre las propiedades fisicoquímicas del AgB se propuso que éste podría adoptar una estructura similar a la lipoproteína plasmática de alta densidad (HDL) más pequeña (HDL₃). Esto es porque que ambas lipoproteínas presentarían una relación lípido:proteína cercana a 1³² y un volumen específico parcial³³, tamaño³² y composición lipídica similares³². En consecuencia, para poder acomodar una cantidad de lípidos tan grande en una partícula es necesario que el AgB adopte una organización compleja mediante la cual los lípidos hidrofóbicos queden resguardados de la superficie y los lípidos hidrofílicos sean los expuestos al solvente acuoso, de forma similar a la organización que toman las lipoproteínas plasmáticas. De esta forma, los lípidos hidrofóbicos del AgB como los TAGs y ésteres de colesterol se dispondrían en un núcleo central rodeados de una capa externa hidrofílica compuesta por las apolipoproteínas del AgB en conjunto con lípidos anfipáticos como los fosfolípidos y el colesterol libre (ver Figura 3).

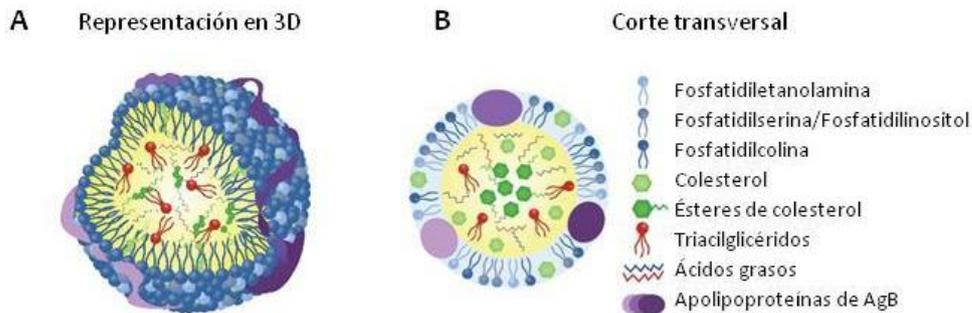


Figura 3: Modelado de la organización estructural del AgB. En el panel A se muestra la representación tridimensional de la organización estructural propuesta para el AgB. En B se muestra un corte transversal de la partícula de AgB. Tomado y adaptado de ¹³

El AgB es un componente parasitario muy estudiado por su valor diagnóstico, pero no se conoce su función biológica. Se ha propuesto que cumple un papel en el metabolismo lipídico del parásito¹³. Esto es porque *E. granulosus* s.l. carece de algunas enzimas necesarias para la síntesis *de novo* de colesterol y ácidos grasos³⁴, e interesantemente, estos componentes lipídicos han sido encontrados en la fracción lipídica del AgB³². Así, sería posible que esta lipoproteína actuara como un transportador, capturando lípidos del hospedero y entregándolos a la hidátide. Por otra parte, se ha propuesto un rol inmunomodulador para el AgB^{14,35}. Como ya se mencionó el uso de mecanismos inmunomoduladores por *E. granulosus* es indudable ya que si bien el hospedero monta una respuesta inmune ésta no logra eliminar al parásito, estableciéndose una infección crónica y en la mayoría de los casos asintomática (al menos por largos períodos)¹⁸. Un papel inmunomodulador del AgB requeriría que tome contacto con las células inmunes del hospedero. Estudios mediante inmunohistoquímica buscando localizar el AgB en la pared de la hidátide mostraron que se encuentra en una región desorganizada que bordea los cuerpos celulares tegumentarios de la capa germinativa, pero fue dudosa su presencia en la capa externa laminar³⁶. Aunque no existe evidencia de un mecanismo de transporte del AgB fuera de la hidátide, el hecho que los hospederos generen una respuesta de anticuerpos específica contra este antígeno demuestra que esta lipoproteína efectivamente logra interactuar con células inmunes, al menos en la interfaz hospedero-parásito. Por otro lado, la idea de que el AgB contribuya a la inmunomodulación encuentra cierto apoyo en evidencias experimentales ya que se han descrito actividades inmunomoduladoras sobre diferentes tipos celulares *in vitro*³⁷⁻³⁹. Es importante señalar que estas evidencias provienen de ensayos que utilizaron preparaciones de AgB que difícilmente reflejen su estado fisiológico por involucrar pasos desnaturizantes (calentamiento del LH a 100°C o elución de la lipoproteína a partir de un gel de poliacrilamida desnaturizante) durante su purificación. Es así que Rìgano y colaboradores³⁹ han descrito que el AgB (eluído de un gel de poliacrilamida con SDS) inhibió la quimiotaxis de neutrófilos inducida por componentes bacterianos y promovió la secreción por PBMCs de pacientes hidáticos de citoquinas características de una respuesta inmune tipo Th2 (principalmente IL-13 e IL-4). También se han estudiado los efectos del AgB sobre DCs³⁷, observándose un efecto sobre la diferenciación y maduración de dichas células. El AgB (posiblemente desnaturizado por un paso de calentamiento a 100°C) no logró producir la maduración/activación completa de DCs humanas. Si bien indujo un aumento del porcentaje de células CD83+ (marcador de maduración) y la expresión de la molécula coestimuladora CD40, no aumentó la expresión de

otras moléculas coestimuladoras como CD86, CD80 y HLA-DR, marcadores característicos del fenotipo maduro activado. Además, el patrón de citoquinas producido por DCs condicionadas por el AgB (aumento de TNF- α , IL-10, IL-6 pero no de IL-12p70 en comparación con las células control) sugiere que el AgB no favorecería un perfil de activación Th1. Por otro lado, los mismos autores mostraron que la presencia de AgB durante la diferenciación de DCs alteró la respuesta frente a la estimulación con LPS, disminuyendo la expresión de moléculas esenciales para cumplir su función presentadora (HLA-DR) e inmunoestimuladora (CD80, CD86) y modulando la producción de citoquinas que afectan el tipo de respuesta Th que se establece (TNF- α , IL-10, IL-6 e IL-12p70). Una modulación similar fue observada sobre la maduración/activación de las DCs cuando el AgB fue adicionado conjuntamente con LPS. Estos efectos del AgB están de acuerdo con su capacidad para inhibir la proliferación de linfocitos T y promover un perfil de activación Th2 (relación IL-4/ IFN- γ mayor en comparación con el perfil inducido por el LPS) en ensayos de cultivo mixto linfocitario. En adición a estos estudios existen escasos trabajos que documentan una actividad inmunomoduladora del AgB utilizando la lipoproteína en su forma nativa. Por un lado, Virginio y colaboradores³⁸ estudiaron los efectos del AgB nativo sobre neutrófilos humanos. Observaron que el AgB nativo no indujo *per se* la secreción de la quimioquina IL-8 ni la expresión del receptor de superficie CD11b, asociado a la activación de estas células. Además, al evaluar el estallido respiratorio, observaron que el AgB no estimuló la producción de H₂O₂ en neutrófilos pre-estimulados con el factor activador de plaquetas (PAF) o IFN- γ e inhibió la producción de H₂O₂ en neutrófilos pre-estimulados con PAF frente al estímulo de ésteres de forbol. Nuestro grupo, por su parte, también ha encontrado evidencia a favor del posible rol inmunomodulador del AgB⁴⁰. Fue prioridad para el grupo el desarrollo de metodologías de purificación que preservaran a la lipoproteína en su estado nativo buscando estudiar la interacción entre el AgB y las células inmunes en una forma más fisiológica y representativa del contexto de la infección. La metodología desarrollada para purificar AgB nativo se basó en una cromatografía de intercambio aniónico sobre Q-Sefarosa seguida de un paso de cromatografía de inmunoafinidad, utilizando el anticuerpo monoclonal (mAb) EB7 específico para la subunidad AgB8/1⁴¹. Dicha preparación (AgB inmunopurificado) fue capaz de interactuar específicamente con monocitos y macrófagos *in vitro*⁴⁰. Asimismo, el AgB inmunopurificado inhibió la secreción de IL-1 β y TNF- α inducida por LPS en macrófagos derivados de la línea celular THP-1⁴⁰, revelando de esta forma una actividad moduladora de la inflamación mediada por macrófagos.

Desafortunadamente la pérdida de la clona del mAb EB7, llevó al grupo a optimizar una nueva metodología de purificación del AgB^{40,42} que permitiera continuar los estudios, al menos, mientras no se lograra preparar nuevamente reactivos para realizar la cromatografía de inmunoafinidad. La metodología desarrollada acopló al paso inicial de fraccionamiento por cromatografía de intercambio aniónico sobre Q-Sefarosa, un segundo paso de ultracentrifugación en un gradiente de KBr. La ultracentrifugación en gradiente de KBr constituye una metodología ampliamente utilizada para la purificación de lipoproteínas plasmáticas, razón por la cual el grupo optó por emplearla para purificar AgB. El análisis por SDS-PAGE de la fracción obtenida luego de una ultracentrifugación reveló la presencia de otras proteínas. Por tal motivo, se realizaron ultracentrifugaciones sucesivas para purificar el AgB, obteniendo de esta forma, fracciones altamente enriquecidas con la lipoproteína parasitaria⁴². Estas preparaciones de AgB no lograron reproducir los efectos del AgB inmunopurificado sobre

macrófagos THP-1; indujeron una alta producción de IL-1 β y TNF- α , a diferencia del AgB inmunopurificado y no lograron inhibir la producción de citoquinas proinflamatorias inducida por LPS. Esta diferencia en los efectos biológicos del AgB podría deberse a varios factores. En primer lugar a diferencias en la composición proteica del AgB obtenido debido a la variabilidad biológica producto del trabajo con LH proveniente de diferentes quistes. Además la purificación con el mAb EB7 produce un sesgo ya que dicho anticuerpo reconoce la subunidad AgB8/1, pero no la AgB8/2 ni AgB8/3. En segundo lugar podrían existir diferencias en el tamaño de las partículas obtenidas por implicar la inmunopurificación un paso de filtrado del LH. Finalmente, las diferencias en los efectos biológicos observados podrían derivar de la presencia de motivos moleculares conservados en patógenos (PAMPs del inglés *Pathogen Associated Molecular Patterns*) en las preparaciones. Respecto a esta última posibilidad, en ensayos preliminares se intentó remover el LPS de las preparaciones utilizando polimixina B, resultando un método ineficaz para dicho fin.

1.3. Macrófagos como células claves del desarrollo y resolución de la inflamación

Este trabajo de tesis se centró en el estudio de las interacciones del AgB con macrófagos. Por esa razón, en esta sección revisamos los aspectos más importantes de las propiedades de estas células referidas a su papel en la respuesta inflamatoria, sobre todo innata.

Los macrófagos son células del sistema inmune innato fundamentales para las funciones de destrucción de patógenos y homeostasis del tejido. Constituyen una población de células heterogénea tanto ontogénica como funcionalmente⁴³⁻⁴⁵. Los macrófagos residentes de tejidos, suelen tener funciones altamente especializadas asociadas al tejido que pueblan, y en su mayoría tienen un origen embrionario y capacidad de autorenovación. Una propiedad que caracteriza a estas células es su capacidad para internalizar componentes vía macropinocitosis y/o fagocitosis. La macropinocitosis es un mecanismo que permite internalizar fluido o partículas en vesículas citoplasmáticas y está asociada a la formación de grandes extensiones de membrana plasmática (*ruffling*) pero no requiere del reconocimiento por receptores. En contraste, la fagocitosis es un mecanismo mediante el cual la célula captura una partícula o microorganismo a través de la emisión de pseudópodos de membrana, produciendo su internalización para su posterior destrucción en fagolisosomas. La fagocitosis, a diferencia de la macropinocitosis, implica un reconocimiento específico mediado por la interacción de receptores. Así, es que los macrófagos presentan en su superficie una diversidad de receptores que inducen a la fagocitosis, como por ejemplo los receptores pertenecientes a la familia tipo lectina de tipo C que reconocen estructuras glucídicas conservadas en organismos patógenos⁴⁶.

Además de su actividad fagocítica, los macrófagos llevan a cabo otras funciones que derivan de su capacidad de reconocimiento de diferentes moléculas en el tejido. Así es que los macrófagos presentan en su superficie receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Estos receptores reconocen PAMPs así como también motivos moleculares asociados al daño tisular (DAMPs, del inglés *Damage Associated Molecular Patterns*). Según las propiedades que adquieren los macrófagos por la estimulación de los diferentes PRRs es que han sido descritos dos fenotipos principales de macrófagos: el clásico y el alternativo. El fenotipo clásico se genera en respuesta a la estimulación por agonistas de receptores tipo Toll (TLRs) e IFN- γ , y

está asociado a una potente actividad microbicida (alta capacidad fagocítica) relevante en la defensa contra bacterias extracelulares. Además, mediante la producción de citoquinas como la IL-1 β , IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), este fenotipo sostiene una fuerte respuesta inflamatoria que recluta y activa células efectoras. Como fue previamente mencionado, el fenotipo denominado alternativo es producto de la diferenciación inducida por otro tipo de señales que incluyen a las citoquinas asociadas a las respuestas de tipo 2 IL-4 y/o IL-13 y, en contraste con lo descrito para el fenotipo clásico, juega un papel antiinflamatorio⁴⁷⁻⁴⁹. Este fenotipo está especializado en controlar la diseminación de patógenos no fagocitables⁵⁰ y persistentes así como también de limitar el desarrollo de respuestas exacerbadas asociadas a este tipo de agentes que tiene como consecuencia el daño tisular. Así, los macrófagos M2 son capaces de sintetizar citoquinas antiinflamatorias (IL-10), moléculas involucradas en la reparación del tejido (RELM α , Ym1, Ym2) y la enzima arginasa-1. Esta enzima comparte con la enzima óxido nítrico sintetasa-2 (NOS2) el sustrato arginina, a partir del cual cataliza la formación de urea y ornitina, y de esta manera es capaz de limitar la síntesis de óxido nítrico y los efectos tóxicos del mismo⁵¹. Además el gran consumo de arginina por esta enzima es capaz de causar una depleción de la misma en el medio, inhibiendo así la proliferación de linfocitos T⁵². Por otro lado, la ornitina producida es metabolizada por la enzima ornitina descarboxilasa, catalizando su conversión en poliaminas, que estimulan la proliferación celular. La ornitina también es sustrato de la ornitina aminotransferasa, la primer enzima de la vía de síntesis de la prolina, un aminoácido esencial en la síntesis de colágeno⁵³.

En cuanto a los receptores y señales que producen la activación de los macrófagos, la vía de activación que genera el fenotipo clásico es la que se encuentra mejor caracterizada. La interacción a través de los TLRs es uno de los mecanismos que produce este tipo de activación. Estos receptores adoptaron su nombre por su homología con el receptor de la proteína Toll encontrado en *D. melanogaster*⁵⁴ y ha sido reportado que en humanos existen diez TLRs (enumerados del uno al diez TLR1-TLR10) con la capacidad de reconocer diferentes ligandos. Los TLRs son proteínas transmembrana que atraviesan una única vez la bicapa lipídica de la célula. Estructuralmente, cuentan con una región extracelular que posee entre 18 a 25 copias de un dominio de repetidos ricos en leucina (LRR del inglés, *Leucine Rich Repeats*) y una porción citoplasmática con un dominio TIR (*Toll-IL-1 receptor*). El conjunto de dominios LRR en el exterior, se disponen en forma de herradura, que se adapta al reconocimiento y unión del ligando específico. La unión del ligando a los diferentes TLRs provoca la dimerización de los receptores o el cambio conformacional en los dímeros pre-formados, desencadenando así una cascada de señalización intracelular. Esto es así porque la dimerización de receptores provoca el acercamiento de los dominios TIR, permitiendo así su interacción con los dominios TIR de moléculas adaptadoras que continúan la señalización intracelular. Existen cuatro moléculas adaptadoras: Myd88, TIRAP, TRIF y TRAM, que interactúan con diferentes TLRs. Las vías de señalización desencadenadas generan la activación de diferentes factores de transcripción (ver Figura 4). Mientras que algunos receptores provocan la activación del factor IRF-3 que induce la expresión de interferones del tipo I, esenciales para la respuesta antiviral, otros activan NF κ B que induce la expresión de citoquinas proinflamatorias. En particular, la activación del factor NF κ B implica la degradación de un complejo inhibidor IKK (del inglés *Inhibitor of nuclear factor κ B Kinase complex*) que lo retiene en el citosol. Así, en su forma libre del inhibidor, NF κ B se transloca al núcleo y activa la transcripción de genes involucrados en la respuesta

inflamatoria, como las citoquinas IL-1 β , TNF- α e IL-6 y la enzima NOS2, también conocida como iNOS (del inglés, *Inducible Nitric Oxide Synthetase*). Las citoquinas mencionadas son potentes mediadores inflamatorios ya que actúan a nivel endotelial incrementando la permeabilidad, generan vasodilatación e inducen a las células del endotelio a sintetizar moléculas de adhesión celular. Estos efectos favorecen el reclutamiento de leucocitos de la sangre al tejido, promoviendo la inflamación.

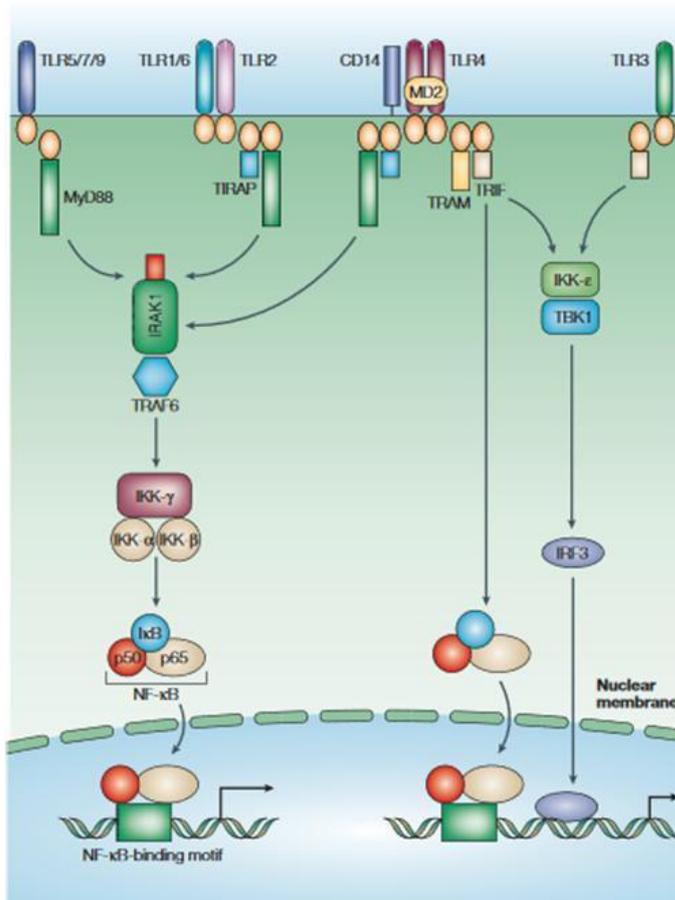


Figura 4: Vías de señalización por TLRs. Se esquematizan los receptores TLRs y su interacción con las diferentes moléculas adaptadoras que dan lugar a la activación de factores de transcripción. Tomado de ⁵⁵.

Aún cuando la señalización por TLRs induce la transcripción de genes de las citoquinas proinflamatorias, no todas las citoquinas sintetizadas son secretadas. En particular, la liberación de IL-1 β fuera de la célula requiere del ensamblaje de una estructura denominada inflamasoma⁵⁶. Como se mencionó, la señalización por TLRs induce la expresión del ARNm del gen de la IL-1 β y su posterior traducción generando un producto inactivo denominado pro-IL-1 β que carece de un péptido señal en la secuencia aminoacídica que dirija su transporte. De esta forma es que, una vez sintetizada, la pro-IL-1 β permanece en el citosol y no puede ser secretada por la célula. Así, la estimulación por los TLRs es un estímulo insuficiente para la maduración y secreción de IL-1 β y es considerada una “primera señal” o “priming”. La síntesis de la citoquina madura requiere de un paso posterior asociado a la formación del inflamasoma, un complejo multiproteico constituido por las proteínas de la familia NLRP, la proteína adaptadora ASC y la pro-caspasa 1 (ver Figura 5). Los mecanismos por los cuales se genera el inflamasoma no están perfectamente dilucidados. Se ha propuesto que podría

generarse en respuesta a una disminución del K^+ intracelular, que sería inducida por ejemplo por la interacción de ATP extracelular con el receptor P2X7. El receptor es un canal de K^+ que se activa por el ATP conduciendo a un eflujo de este catión⁵⁷. En este modelo, el ATP sería el estímulo que constituiría entonces la denominada “segunda señal”. Se ha postulado que el descenso de los niveles de K^+ intracelular provocaría la oligomerización de la proteína NLRP3 como consecuencia de su disociación de las chaperona HSP90 y co-chaperona SGT1. Las proteínas NLRP3 oligomerizan a través de sus dominios LRR y esto provoca la interacción entre los dominios pirina de estas proteínas con los dominios pirina de la proteína ASC, formando polímeros filamentosos de ASC. La proteína ASC, además de su dominio pirina, posee un dominio CARD el cual interacciona con el dominio CARD de la pro-caspasa 1, iniciando así la polimerización de la pro-caspasa 1. Esta agregación desencadena el autoclívaje de la pro-caspasa 1 a su forma activa caspasa 1. Finalmente esta proteasa realiza el corte proteolítico en la pro-IL-1 β , necesario para la activación y secreción de la citoquina activa (IL-1 β).

Existen, además del ATP, otros estímulos que han sido propuestos como mediadores de la “segunda señal”. Uno de ellos son las especies reactivas del oxígeno (ROS del inglés *Reactive Oxygen Species*) que oxidan blancos moleculares asociados a la regulación del inflamasoma. Se postula que la oxidación de tioredoxinas llevaría a la disociación de las moléculas asociadas a estas enzimas que son capaces de desplazar a HSP-90 y SGT1 de las proteínas NLRP3⁵⁶. Este desplazamiento permitiría la consecuente oligomerización de NLRP3 y la activación del inflamasoma. Por otra parte, se ha propuesto que la fagocitosis de materiales particulados como la alúmina provocaría la disrupción de lisosomas con la liberación de la catepsina B que activaría e inflamasoma⁵⁸.

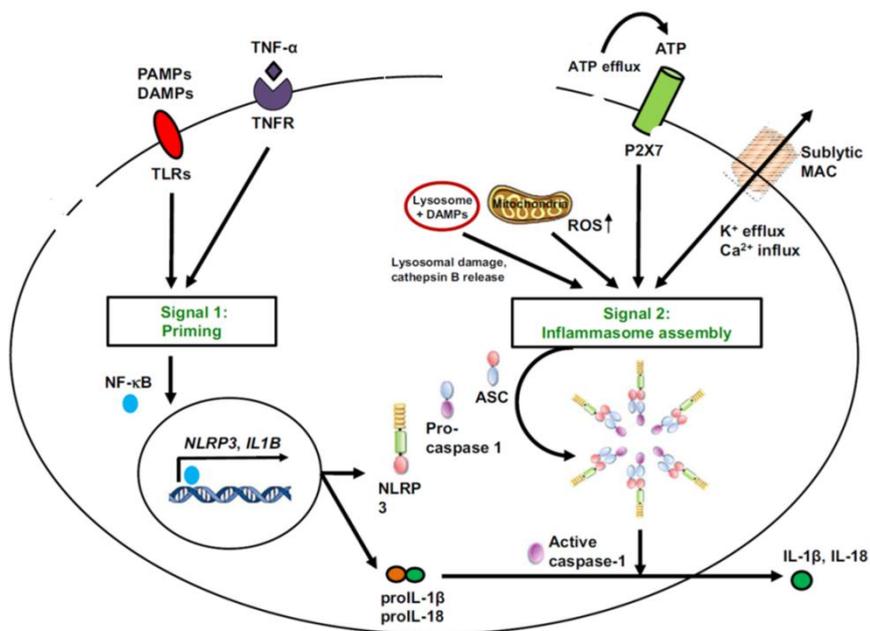


Figura 5: Mecanismos de síntesis y secreción de la IL-1 β . Se esquematizan las señales necesarias para la síntesis y secreción de la IL-1 β al medio extracelular. Tomado de ⁵⁹.

En suma, los macrófagos son células que presentan en su superficie una diversidad de receptores que les permiten censar el tejido y desencadenar respuestas apropiadas para

mantener la homeostasis. Durante un proceso infeccioso son capaces de participar en la fase temprana o de inicio de la respuesta, conduciendo a la eliminación directa de los patógenos, pero también participan en las etapas ligadas a la resolución de la inflamación y la reparación de tejidos⁶⁰. Dado que, como ya se mencionó, *E. granulosus* realiza un control eficiente de la respuesta inflamatoria de su hospedero, los macrófagos representan una población relevante a ser considerada en el estudio de la inmunobiología de la infección hidática.

2. Hipótesis de trabajo y objetivos

El parásito *E. granulosus* se encuentra excelentemente adaptado a sus hospederos, razón por la cual las infecciones con este parásito suelen establecerse de forma crónica y pasar desapercibidas por la ausencia de síntomas. Para sobrevivir en sus hospederos intermediarios, *E. granulosus* despliega mecanismos de modulación del sistema inmune que son llevados a cabo por diversos componentes del parásito¹⁹. Como ya se introdujo, uno de los componentes que ha sido asociado con la modulación inmune es el AgB, lipoproteína mayoritaria producida por la hidátide. Diversos estudios con esta lipoproteína han revelado su potencial inmunomodulador, aunque la mayoría de los estudios fueron llevados a cabo con preparaciones de AgB desnaturalizado. Nuestro grupo de investigación ha planteado la hipótesis que el AgB podría actuar como transportador de lípidos esenciales para el parásito pero a la vez imprimir señales en células del hospedero que favorezcan la diferenciación de

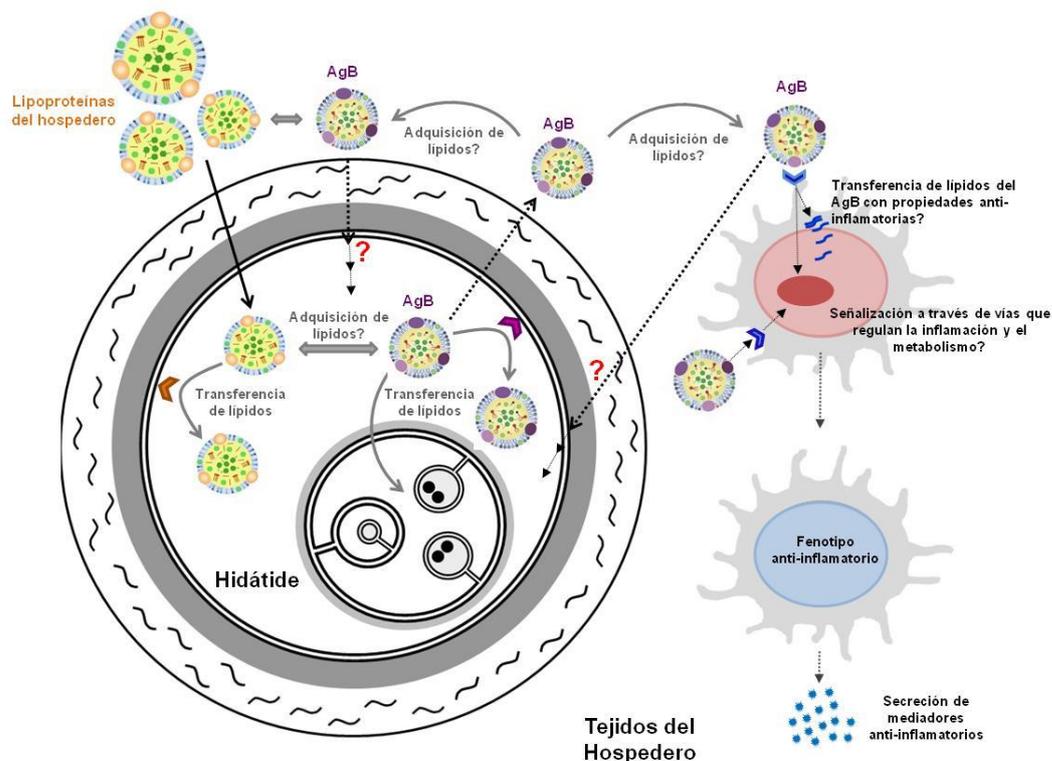


Figura 6: Hipótesis planteada para el rol del AgB en la biología del parásito. Dado que existe evidencia que demuestra la presencia de algunas apolipoproteínas del hospedero en el LH, el AgB podría adquirir lípidos de las lipoproteínas del hospedero dentro de la hidátide y transferir lípidos esenciales para el parásito a la capa germinativa a través de receptores similares a los receptores de mamíferos para lipoproteínas (marcado en violeta). En paralelo, las lipoproteínas plasmáticas podrían transferir directamente los lípidos a la hidátide a través de receptores (marcado en naranja). Por otra parte, la presencia de anticuerpos anti-AgB demuestra que el AgB es capaz de alcanzar la interfaz hospedero-parásito. Allí podría interactuar con lipoproteínas del hospedero o con APCs de forma de intercambiar lípidos. La interacción con las APCs podría dar lugar a la generación de fenotipos antiinflamatorios por la transferencia de lípidos del AgB capaces de modular la inflamación o por el contacto con receptores que transduzcan señales antiinflamatorias a la vez que medien el eflujo de lípidos desde las células al AgB. La transferencia de los lípidos adquiridos a la hidátide requeriría un transporte reverso del AgB, aunque este hecho no ha sido evidenciado.

fenotipos antiinflamatorios. Tal como se muestra en la Figura 6, la toma de lípidos requeriría la interacción del AgB con las lipoproteínas o con células del hospedero en la interfaz parásito-hospedero. Entre otros tipos celulares, sería posible la interacción del AgB con células inmunes del hospedero, particularmente APCs, ya que durante la infección se generan anticuerpos anti-AgB. La interacción del AgB con estas células conduciría a un intercambio de lípidos que podría incluir: liberación de lípidos capaces de modular la inflamación o secuestro de lípidos de *lipid rafts* (balsas lipídicas), principalmente colesterol que modifique la señalización celular. Por otra parte, también sería posible el contacto del AgB con receptores capaces de transducir señales antiinflamatorias a la vez que medien el eflujo de lípidos desde la célula hacia la lipoproteína parasitaria, tal como sucede con la HDL⁶¹.

Para poder explorar esta hipótesis es fundamental obtener AgB en cantidad y calidad adecuada para los estudios celulares. La pérdida del mAb Eb7 condicionó estos estudios y condujo al planteo de métodos de purificación alternativos. En este sentido, nuestro grupo desarrolló una metodología de purificación que preserva a la lipoproteína en su forma nativa basada en la ultracentrifugación en gradiente de densidad. El estudio de la lipoproteína nativa es fundamental para confirmar si los efectos del AgB previamente estudiados serían factibles de ocurrir durante la infección hidática. Las preparaciones de AgB nativos así obtenidas mostraron capacidad de interactuar de forma específica con macrófagos, células de la inmunidad innata que constituyen la primera barrera de defensa celular, fundamentales en los procesos de eliminación de patógenos y reparación tisular. Sin embargo no reprodujeron las actividades del AgB inmunopurificado. Frente a estos resultados contrastantes y en base a los factores que podrían explicarlos (tamaño de las partículas y presencia de PAMPs) nos planteamos los siguientes objetivos general y específicos.

2.1. Objetivo general

Estudiar la capacidad del AgB nativo de *E. granulosus* de modular la inflamación mediada por macrófagos

2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1.** Optimizar la metodología de purificación del AgB nativo para obtener preparaciones aptas para realizar ensayos funcionales con macrófagos, incluyendo pasos que permitan seleccionar las partículas por su tamaño y/o evitar contaminación por productos bacterianos. Este objetivo implicó la caracterización de las partículas lipoproteicas en término de su tamaño y composición de la fracción proteica, así como también el análisis de la capacidad del AgB nativo de inducir *per se* la expresión de citoquinas inflamatorias en macrófagos. Además, se buscó evidencia de la presencia de LPS.
- 2.2.2.** Analizar la capacidad del AgB nativo de modular la expresión de IL-1 β e IL-6 inducida por agonistas de PRRs (LPS, ATP y zymosán) en macrófagos.

3. Materiales y Métodos

3.1. Reactivos químicos y bioquímicos

Los siguientes reactivos se adquirieron de Sigma Chemicals (USA): solución antibiótica/antimicótica (AbAm, conteniendo penicilina 100 U/mL, estreptomina 100 µg/mL y anfotericina B 250 ng/mL), 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxytolueno (BHT), sulfóxido de dimetilo (DMSO), sales inorgánicas, lipopolisacárido de *Escherichia coli* O111.B4 (LPS), marcador de peso molecular de amplio rango (rango 6.5 a 200 kDa), forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), zymosán A de *Saccharomyces cerevisiae*, L-glutamina, 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB), sulfanilamida, N-(1-Naftil) etilenamina diclorhidrato (NED), bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol thiazolyl (MTT) y adenosín trifosfato (ATP). Se adquirieron de Applichem (Alemania) el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), medio de cultivo RPMI 1640, bromuro de potasio (KBr), bicarbonato de sodio, HEPES, piruvato de sodio, glucosa y ditiotreitolo (DTT). Se adquirió de ThermoFisher el marcador de peso molecular pre-teñido (rango 10 a 180 kDa), mientras que el suero fetal bovino (SFB) se obtuvo de Biowest (USA).

3.2. Material parasitario

Se obtuvieron quistes hidáticos fértiles de *Echinococcus granulosus* s.l. de bovinos infectados naturalmente, sacrificados en mataderos de nuestro país. El LH fértil (LH_f) se extrajo mediante punción aséptica de quistes localizados en hígado o pulmón. Una vez extraído el LH, los PE fueron separados por decantación. Se agregó EDTA 5 mM y BHT 20 µM al LH y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

3.3. Purificación del AgB

Para esta tesina se realizaron tres purificaciones de AgB siguiendo la metodología descrita por Folle et al.⁴², con leves modificaciones. Se partió de un pool de LH_f (entre 1000 y 1700 mL) el cual fue centrifugado a 10.000 g por 20 minutos a 4°C para separar restos celulares provenientes de PE y/o de la pared de los QHs. El sobrenadante se aplicó en una columna de intercambio aniónico Q-Sefarosa (GE Healthcare), equilibrada previamente en tampón conteniendo Na₂HPO₄ 0.02 M, NaCl 0.2 M, EDTA 5 mM y BHT 20 µM, a una velocidad de 1 mL/min. Se lavó la columna con el mismo tampón hasta que la absorbancia a 280 nm a la salida de la columna fuera menor a 0.05 UA y se procedió a la elución aumentando la fuerza iónica a 500 mM de NaCl. Se colectó el pico de elución -fracción Q-Sefarosa positiva (QS+, 36 mL totales)- y se dializó contra PBS conteniendo EDTA 5 mM y BHT 20 µM (tampón PBS_{EB}), diluido 10 veces. Luego se concentró (aproximadamente 10 veces) la fracción QS+ en un rotavapor a 65°C (Speedvac Savant) y el concentrado obtenido fue sometido a tres rondas de ultracentrifugación en gradiente de KBr. Para ello se disolvieron 2 g de KBr en 4 mL de la fracción QS+ concentrada, y posteriormente se colocó la muestra en tubos de ultracentrífuga de 5 mL y se cubrió con una solución conteniendo NaCl 0.15 M y KBr 0.42 M. Los tubos se ultracentrifugaron a 332.000 g y 4°C por 5 horas. Como resultado de este procedimiento se obtuvo una banda de color amarillo/naranja en la zona de baja densidad (fracción de baja densidad, Ld_f) que contiene el AgB, mientras que el resto de las proteínas en la fracción QS+ se

recuperaron en la fracción de alta densidad (Hd_f correspondiente al fondo del tubo). Se recuperó la Ld_f luego de las sucesivas ultracentrifugaciones y se le realizó un cambio de tampón utilizando una columna PD-10 equilibrada en PBS_{EB} para eliminar el KBr y adicionar AbAm (1% v/v) con el fin de conservar adecuadamente la muestra. La fracción obtenida, conteniendo el AgB nativo, se almacenó en frascos de vidrios a 4°C bajo atmósfera de N_2 hasta su uso. Todos los tampones utilizados durante la purificación fueron preparados con agua apirógena y filtrados por 0,22 micras para evitar cualquier tipo de contaminación con PAMPs.

Como ya se mencionó el método previamente descrito fue seguido para purificar el AgB en tres ocasiones. Sin embargo, en cada purificación se realizaron algunas modificaciones con el fin de obtener preparaciones de AgB compatibles con el trabajo con células inmunes. A continuación se detallan dichas modificaciones:

- 3.3.1. Purificación 1.** Luego del paso inicial de centrifugación y como paso previo a la cromatografía sobre Q-Sefarosa, el LH_f se dividió en dos fracciones. Una de ellas fue filtrada por filtros de 2 y 0.45 μm y la otra no se filtró. Luego se continuó con la purificación de ambas fracciones tal como se describió arriba. El AgB obtenido a partir de la fracción de LH_f filtrada se denominó AgB filtrado (AgB_F) y el obtenido a partir de la fracción que no fue filtrada se denominó AgB sin filtrar ($AgB_{S/F}$).
- 3.3.2. Purificación 2.** No se realizó el paso de filtrado del LH. Se buscó reducir la contaminación bacteriana mediante el agregado de AbAm a la fracción QS+ (en una concentración de 1% v/v) y al tampón de diálisis (concentración 0.1% v/v). El AgB obtenido de esta purificación se denominó AgB_{A1} .
- 3.3.3. Purificación 3.** No se realizó el paso de filtrado del LH. Se agregó AbAm directamente en el pool de LH de partida (concentración 1% v/v) y además se repitió el agregado del AbAm a la fracción QS+ y al tampón de diálisis. El AgB obtenido de esta purificación se denominó AgB_{A2} .

3.4. Determinación de proteínas

Para determinar la concentración de proteína en muestra del AgB se utilizó el kit de ensayo de proteínas por BCA (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se dispuso 150 μl de diferentes diluciones del AgB (1/40, 1/80 y 1/300) o de las diluciones del estándar (albúmina sérica bovina -BSA- rango de 2 a 40 $\mu g/mL$) en placa de microtitulación y se le agregó 150 μl de la mezcla de reactivos A, B y C en la relación 50:48:2. Se incubó la placa en baño húmedo a 37°C por 2 horas y posteriormente se midió la absorbancia a 560 nm en un espectrofotómetro de placas. La concentración de proteína del AgB se determinó por interpolación en la curva de la calibración generada con los datos del estándar (Abs_{560nm} vs concentración).

Por otro lado, la determinación de la concentración proteica para las muestras de LH, fracción QS+, fracción Q-Sefarosa negativa (QS-), Ld_f y Hd_f fue realizada mediante la medida de la absorbancia a 280 nm en el equipo NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

3.5. Análisis de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (condiciones desnaturalizantes) se realizó según lo descrito en Laemmli *et al.*⁶². Se prepararon un gel concentrador al 3% (m/v) y un gel separador al 15% (m/v), ambos de 1.5 mm de espesor. Las muestras conteniendo entre 25 y 30 µg (masa proteica) se disolvieron en Tris-HCl 0.35 M, SDS 10% (m/v), DTT 6mM, glicerol 30% (v/v), azul de bromofenol 0.12 mg/mL a una relación 5:1 (v/v), y las soluciones obtenidas se calentaron a 100°C en baño de agua por 5 minutos. Se sembraron en el gel las muestras y un marcador de peso molecular en un volumen máximo de 30 µl. La electroforesis se realizó a una intensidad constante de 30 mA y a temperatura ambiente utilizando el sistema Mini Protean 3 (Bio-Rad, USA). Culminada la electroforesis, se fijó el gel con una solución de etanol 40% (v/v), ácido acético 10% (v/v) en agua destilada por 30 minutos y se dejó tiñendo con Coomassie coloidal toda la noche. Finalmente, se destiñó el gel con agua destilada bajo agitación.

3.6. Determinación del radio hidrodinámico por análisis de dispersión dinámica de la luz (DLS)

El análisis por DLS (del inglés, *Dynamic Light Scattering*) se realizó en la Unidad de Biofísica de Proteínas del Instituto Pasteur de Montevideo en colaboración con el Lic. Federico Carrión. Se colocaron 70 µl de AgB 1 mg/mL en cubeta descartable UVette y se realizaron tres medidas consecutivas a 25 °C en el equipo Zetasizer NanoS (MALVERN, España). El equipo determina la dispersión de la luz dinámica; mide la difusión de partículas en movimiento browniano, y convierte estos valores a una distribución de tamaños utilizando la relación de Stokes-Einstein. Además, mediante diferentes algoritmos se obtienen datos de la distribución de tamaños de la muestra tomando en cuenta sólo la intensidad de dispersión de la luz o corrigiendo esta intensidad por el volumen (ya que las partículas grandes dispersan luz con una intensidad mucho mayor).

3.7. Detección de endotoxinas bacterianas mediante el ensayo del lisado de amebocitos de *Limulus polyphemus* (LAL)

El ensayo del LAL fue realizado por el laboratorio Beltrán Zunino (Montevideo, Uruguay). Para esta determinación se consideró que el LPS afectaría las propiedades de los macrófagos si se encontrara a una concentración igual o superior a 0.01 ng/mL. Como el ensayo disponible sólo determina presencia o ausencia en base a un valor umbral correspondiente a 0.03 unidades de endotoxina (UE)/mL, se facilitó una muestra de AgB (fracción Ld_i) de forma de conocer si las endotoxinas presentes en la preparación de AgB, superarían el límite de 0.01 ng/mL cuando el AgB se utilizó a una concentración final de 10 µg/mL en el cultivo celular.

3.8. Línea celular THP-1 y su diferenciación a macrófagos

Se utilizó la línea celular premonocítica humana THP-1 (ATCC, Código TIB-202). La línea fue mantenida en medio RPMI 1640 suplementado con glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, HEPES 10 mM, bicarbonato de sodio 1.5 g/L y la mezcla de AbAm 1% (medio completo)

suplementado con SFB 10% (v/v), a 37 °C y bajo atmosfera de CO₂ (5%). Se realizaron subcultivos partiendo de cultivos a 0.2x10⁶ cel/mL hasta alcanzar una concentración cercana pero no superior a 1x10⁶ cels/mL, óptima para realizar los ensayos. Todos los ensayos fueron realizados con macrófagos THP-1. Para ello, los premonocitos THP-1 fueron diferenciados a macrófagos con PMA. Se plaquearon 0.2x10⁶ células/pozo en placas de 96 pozos (Eppendorf) con PMA 50 ng/mL en 200 µL de medio completo suplementado con SFB 5%. A las 48 hs se retiró el medio y se dejó a los macrófagos por 24 hs en medio completo conteniendo SFB 5%. A las 24 hs se retiró el medio y se estimularon las células según se detalla en cada ensayo.

3.9. Preparaciones de agonistas de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) para estimulación de los macrófagos

3.9.1. Zymosán

Se resuspendieron 15 mg de zymosán en 1.5 mL de medio completo. Para su activación la suspensión se calentó en baño de agua a 100°C por 30 minutos. Luego, se realizaron 3 lavados, utilizando 1.5 mL de medio completo en cada uno (bajo cámara de flujo laminar) y centrifugando cada vez a 600 g, descartando el sobrenadante. Luego del último lavado se agregaron 1.5 mL de medio completo y se almacenó a -20°C hasta su uso.

3.9.2. LPS

Se preparó una solución stock de LPS a una concentración de 1 mg/mL en medio completo bajo cámara de flujo laminar. Esta solución se almacenó en alícuotas a -20°C hasta su uso.

3.9.3. ATP

Se preparó una solución stock de ATP 50 mM en medio completo bajo cámara de flujo laminar. Esta solución se almacenó a -20°C hasta su uso.

3.10. Estimulación de macrófagos THP-1 con AgB y/o agonistas de PRRs

Para estudiar la capacidad de las preparaciones de AgB de inducir *per se* la secreción de citoquinas proinflamatorias, los macrófagos THP-1 (0.2x10⁶ células/pozo en un volumen final de 200 µl) fueron estimulados con AgB en el rango de concentraciones de 0.01 a 20 µg/mL (masa proteica) o con PBS_{EB} o medio (M) como controles. Para estudiar la capacidad del AgB de modular la respuesta de citoquinas inducidas por agonistas de PRRs, los macrófagos THP-1 fueron estimulados con i) LPS 10 ng/mL en ausencia o presencia del AgB (1, 10 y 20 µg/mL), o ii) zymosán 0.1 mg/mL en ausencia o presencia del AgB (1, 10 y 20 µg/mL). Luego de 24 hs se retiró el sobrenadante de cultivo. También se utilizó como estímulo LPS 250 ng/mL y ATP 5 mM, pero en este último caso, el LPS se adicionó 4 horas antes del agregado del ATP, y se colectó el sobrenadante 1 h luego de esta última estimulación. En este ensayo, el AgB fue agregado a dos concentraciones (1 y 10 µg/mL) junto al estímulo del LPS o junto al ATP. En todos los ensayos, al final de las estimulaciones se colectó el sobrenadante de cultivo en el cual se analizaron los niveles de citoquinas inflamatorias y nitritos según se describe a

continuación. Además, para controlar la posible toxicidad del AgB se determinó la viabilidad celular al tiempo final de los ensayos.

3.11. Evaluación de la viabilidad celular por ensayo MTT

Se evaluó la viabilidad de los macrófagos THP-1 luego de transcurridas las 24 hs de incubación con los diferentes estímulos mediante el ensayo de MTT⁶³. Una vez retirados los sobrenadantes de cultivo, las células se lavaron con PBS estéril, e incubaron con 200 μ L de PBS conteniendo glucosa 0.1% (p/v) y MTT 0.4 mg/mL por 3 hs a 37°C y bajo atmósfera de CO₂ (5%). Al finalizar la incubación se retiró el sobrenadante, se lavó con PBS para eliminar el exceso de MTT, y se adicionaron 200 μ L de DMSO, pipeteando continuamente hasta disolver el precipitado violeta formado. Los sobrenadantes coloreados fueron pasados a una placa de microtitulación para determinar la absorbancia a 560 nm utilizando un espectrofotómetro de placas (Labsystems Multiskan MS). Las absorbancias obtenidas para las distintas muestras fueron comparadas con la condición control (células cultivadas en medio completo) para evaluar si el agregado de los estímulos modificó la viabilidad celular.

3.12. Determinación de nitritos por el método de Greiss

Para evaluar la producción de óxido nítrico por parte de los macrófagos se determinó el nivel de nitritos en el sobrenadante de cultivo inmediatamente luego de su obtención. El método de determinación se basa en la reacción de diazotización de Greiss, que utiliza sulfanilamida y N-(1-Naftil) etilenamina diclorhidrato (NED) bajo condiciones ácidas⁶⁴. Brevemente, se dispusieron 50 μ L de muestra en placas de microtitulación de 96 pozos y se les adicionó 50 μ L de sulfanilamida 1% (m/v) en ácido fosfórico 5% (v/v). La placa se incubó a temperatura ambiente por 5-10 minutos en oscuridad y luego se le agregó a cada pozo 50 μ L de NED 1% (m/v). Luego de 10 minutos de incubación en oscuridad se midió la absorbancia a 560 nm en un espectrofotómetro de placas (Labsystems Multiskan MS). En paralelo se realizó una curva estándar a partir de diluciones de una solución de nitrito de sodio de concentración conocida en el rango de 0 a 100 μ M. La concentración de nitrito en los sobrenadantes de cultivo se determinó por interpolación en la curva de la calibración generada con los datos del estándar (Abs_{560nm} vs concentración).

3.13. Cuantificación de citoquinas por ELISA

La concentración de las citoquinas IL-1 β e IL-6 se determinó mediante ensayos de ELISA de captura o sándwich utilizando kits comerciales de BD OptEIA (BD Biosciences) y siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante. Brevemente, se sensibilizaron placas de 96 pozos con alta capacidad de unión (Maxisorp, Nunc) con el anticuerpo de captura anti-IL-1 β o anti-IL-6 toda la noche a 4°C. El bloqueo se realizó con PBS conteniendo SFB 10%. Luego, se incubaron las correspondientes muestras a distintas diluciones en paralelo a un estándar. Finalmente, se agregó el anticuerpo de detección conjugado a peroxidasa. Para el revelado se utilizó tampón fosfato-citrato conteniendo TMB 0.1 mg/mL y H₂O₂ 0.006% (v/v) y se detuvo la reacción mediante el agregado de H₂SO₄ 1 M. Se midió la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro de placas (Labsystems Multiskan MS). Los niveles de las citoquinas en los

sobrenadantes de cultivo se determinaron por interpolación en la curva de la calibración generada con los datos del estándar (Abs_{450nm} vs concentración).

4. Resultados

Este trabajo pretendió aportar al estudio de la capacidad del AgB nativo de modular las propiedades de las células de la inmunidad innata, particularmente macrófagos. Como primer objetivo se buscó optimizar la obtención de AgB a partir de LH_f realizando modificaciones en el protocolo de purificación ya empleado en el laboratorio, de forma que las preparaciones fueran aptas para realizar ensayos funcionales con células. En conjunto se prepararon tres lotes de AgB en los cuales se caracterizó el componente proteico y el tamaño de las partículas lipoproteicas. Además, se evaluó si las preparaciones de AgB obtenidas fueron capaces de inducir la secreción de citoquinas proinflamatorias en macrófagos. El segundo objetivo apuntó al estudio del potencial inmunomodulador del AgB nativo; esto reviste importancia ya que como se comentó anteriormente gran parte de los efectos inmunomoduladores descriptos para el AgB sobre células de la inmunidad innata se basan en el empleo de preparaciones de AgB cuya purificación incluyó tratamientos que no conservan la estructura nativa de las lipoproteínas (calentamiento a 100°C³⁷, electroelución de geles desnaturalizantes³⁹). De acuerdo con esto, se realizaron estudios utilizando la lipoproteína en su estado nativo, y como modelo inflamatorio la activación por diferentes agonistas de PRRs de macrófagos derivados de la línea celular humana THP-1.

A continuación se describen los resultados obtenidos durante este trabajo.

4.1. Modificaciones en el protocolo de purificación del AgB nativo para su uso en ensayos funcionales

4.1.1. *Obtención y caracterización de preparaciones de AgB obtenidas utilizando un paso de filtración del LH_f*

Como ya se comentó en la introducción nuestro grupo de investigación ha trabajado en la puesta a punto de una metodología para obtener preparaciones de AgB a partir de LH, en condiciones que preservan la estructura nativa de la lipoproteína. El método convencional de preparación consistía en un paso de cromatografía de intercambio aniónico sobre Q-Sepharosa seguido de un paso de cromatografía por inmunoafinidad⁴¹. La pérdida del mAb EB7, utilizado en la cromatografía de inmunoafinidad, condujo a poner a punto una nueva metodología donde se sustituyó este paso por un paso de ultracentrifugación en gradiente de KBr. Sin embargo, las preparaciones obtenidas no reprodujeron los efectos moduladores observados con el AgB inmunopurificado sobre macrófagos estimulados con LPS. La principal diferencia observada fue que la preparación de AgB obtenida mostró una alta capacidad de inducir la producción de IL-1 β y TNF- α . Por esta razón en este trabajo nos planteamos realizar modificaciones en el protocolo de purificación buscando mejorar la calidad de las preparaciones para realizar ensayos funcionales con células y dilucidar qué factores explican las diferencias obtenidas en los resultados con las diferentes preparaciones del AgB nativo. Una primer modificación fue introducir un paso de filtración del LH por membranas de 2 y 0.45 μ m, posterior a la centrifugación y previo a la cromatografía de intercambio aniónico. Este

paso contribuiría a eliminar posibles agregados en la muestra, incluyendo agregados del AgB de alto peso molecular que podrían generarse como consecuencia de su naturaleza lipoproteica y su tendencia a oligomerizar. Se consideró que estos agregados podrían mostrar propiedades biológicas diferentes al AgB nativo, incluyendo una actividad proinflamatoria. Se partió de un pool de LH_f representativo de 20 QHs, que se dividió en dos alícuotas, una se filtró y otra no. Ambas alícuotas se procesaron siguiendo el método de purificación descrito por nuestro grupo. Brevemente, primero se realizó una cromatografía de intercambio aniónico sobre Q-Sefarosa, obteniendo la fracción Q-Sefarosa negativa (QS-), que contiene la mayoría de las proteínas del hospedero, y la fracción QS+ enriquecida en el AgB. Luego se ultracentrifugó la fracción QS+, se separó la fracción obtenida en la zona de baja densidad del gradiente (Ld_f) y se repitió el procedimiento 2 veces sucesivas con la fracción Ld_f, para obtener una fracción de AgB con un alto grado de pureza. Siguiendo esta metodología se obtuvieron 4.5 mg de AgB_{S/F} y AgB_F que representan un rendimiento de 2.7 mg/L de LH.

Con el fin de evaluar la pureza de las preparaciones, se realizó el seguimiento del proceso de purificación por SDS-PAGE (Figura 7). Para ello, se tomaron muestras del pool de LH_f de partida y de las diferentes fracciones provenientes de los dos pasos de la purificación. Las mismas fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones reductoras. En la Figura 7, se muestra un resultado representativo de todo el proceso de fraccionamiento del LH_f. El LH_f presenta varias bandas entre las cuales se destacan por su abundancia dos componentes del hospedero: la albúmina (banda de peso molecular aparente 65 kDa, señalada con una cabeza de flecha grande) e inmunoglobulinas (bandas de peso molecular aparentes 50 y 25 kDa correspondiente a las cadenas pesadas y livianas de IgG que se obtienen en condiciones reductoras, señaladas con flechas simples). Tal como se esperaba, la fracción QS- (que no es retenida en la columna de intercambio aniónico) mostró varias bandas incluyendo la albúmina e inmunoglobulinas del hospedero. El AgB quedó retenido en las perlas de Q-Sefarosa, ya que la fracción QS+ mostró una banda de alrededor de 8 kDa que es compatible con la presencia de las subunidades monoméricas del AgB (AgB8) mientras que esta banda no aparece en la fracción QS-. Además, en la fracción QS+ se observaron bandas regularmente espaciadas, como en una escalera, que resultan compatibles con la presencia del monómero del AgB y sus oligómeros de mayor peso molecular (marcados con cabezas de flecha pequeñas). Como fue previamente mencionado, la fracción QS+ fue sometida a tres rondas sucesivas de ultracentrifugación en un gradiente de KBr; en la Figura 7A se muestra que el AgB (monómero y en sus formas oligoméricas) se recuperó en la Ld_f luego de la ultracentrifugación y que la mayoría de las proteínas presentes en la fracción QS+ quedaron en la fracción de alta densidad (Hd_f). En la Figura 7B, se muestra que si bien luego de una ronda de ultracentrifugación la proteína mayoritaria en la Ld_f es el AgB, al realizar dos ultracentrifugaciones consecutivas se logró eliminar trazas de otras proteínas, aumentando así la pureza del AgB en esta fracción. En el panel 7C se muestra el patrón típico en escalera correspondiente a las muestras de AgB_F y AgB_{S/F} analizadas por SDS-PAGE. Tal como se esperaba, en condiciones desnaturizantes, ambas preparaciones mostraron similares niveles de oligomerización y no se observaron cambios notorios en el contenido de componentes de alto peso molecular.

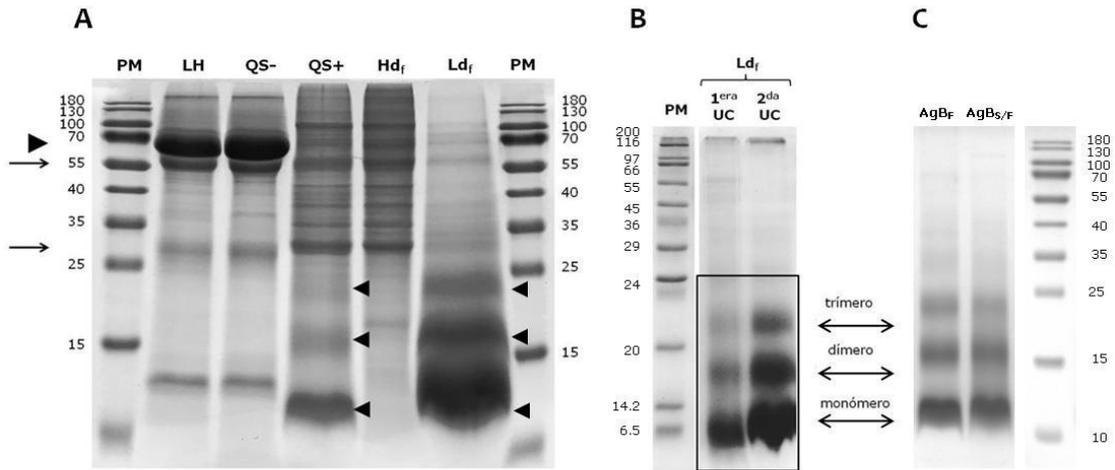


Figura 7: Seguimiento del proceso de purificación por electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). A) Análisis mediante SDS-PAGE de las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico sobre Q-Sefarosa de LH_f y ultracentrifugación posterior en un gradiente de KBr. Se separaron entre 25 y 30 µg de cada fracción en un gel de acrilamida al 15% en condiciones reductoras (DTT 6 mM). Se señala la albúmina (banda de peso molecular aparente de 65 kDa) con una cabeza de flecha grande e inmunoglobulinas del hospedero (bandas con un peso molecular aparente de 50 y 25 kDa correspondientes a las cadenas pesadas y livianas de IgG, respectivamente) indicadas con flechas simples. Además, se indican en QS+ y en Ld_f con cabezas de flecha pequeñas la banda de 8 kDa y las bandas regularmente espaciadas correspondientes al monómero y oligómeros del AgB, respectivamente. B) Análisis de SDS-PAGE de la Ld_f obtenida mediante dos rondas de ultracentrifugación consecutivas (indicadas como 1^{era} UC y 2^{da} UC). Las flechas dobles indican las formas monoméricas y oligoméricas del AgB. C) Análisis por SDS-PAGE de las fracciones obtenidas de AgB_f y AgB_{s/f}. Se muestran con flechas dobles las formas monoméricas y oligoméricas del AgB. **PM:** Marcador de peso molecular, **LH:** Líquido hidático, **QS-:** Fracción Q-Sefarosa negativa, **QS+:** Fracción Q-Sefarosa positiva, **Hd_f:** Fracción de alta densidad, **Ld_f:** Fracción de baja densidad.

Con el objetivo de evaluar el efecto de la incorporación del paso de filtración sobre el tamaño de las partículas lipoproteicas del AgB obtenido, se determinó el radio hidrodinámico (R_H) de las muestras de AgB_{s/f} y AgB_f mediante medidas de la dispersión dinámica de la luz (DLS). Los resultados son presentados en la Figuras 8 y 9. Tanto el AgB_{s/f} como el AgB_f mostraron un perfil polidisperso al ser analizados por DLS. Cuando se analizaron las muestras en función de la intensidad de la luz dispersada se observaron en ambas preparaciones de AgB dos poblaciones mayoritarias (ver Figura 8), con valores promedio de $R_H=6.56\pm 0.31$ nm y $R_H=142.4\pm 16.82$ nm para el AgB_{s/f} y valores promedio de $R_H=6.08\pm 0.13$ nm y $R_H=151.06\pm 10.33$ nm para el AgB_f.

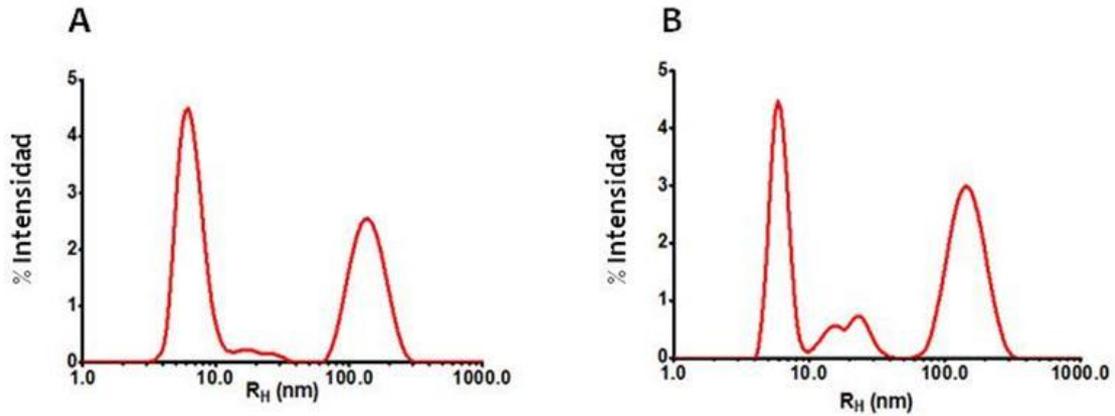


Figura 8: Análisis por DLS del tamaño de las partículas lipoproteicas presentes en el AgB_{S/F} y AgB_F. En el gráfico se muestra la distribución de las poblaciones de partículas presentes en el AgB_{S/F} (A) y AgB_F (B) de acuerdo con el tamaño estimado según la medida de la intensidad (%) de la luz dispersada obtenida por DLS. Los gráficos corresponden al promedio de tres determinaciones de cada muestra realizadas en forma consecutiva.

Sin embargo, al analizar el R_H ajustado por el porcentaje de volumen (Figura 9) se observó un pico ampliamente mayoritario con valores promedio de R_H=5.77±0.25 nm para el AgB_{S/F} y R_H=5.73±0.20 nm para el AgB_F.

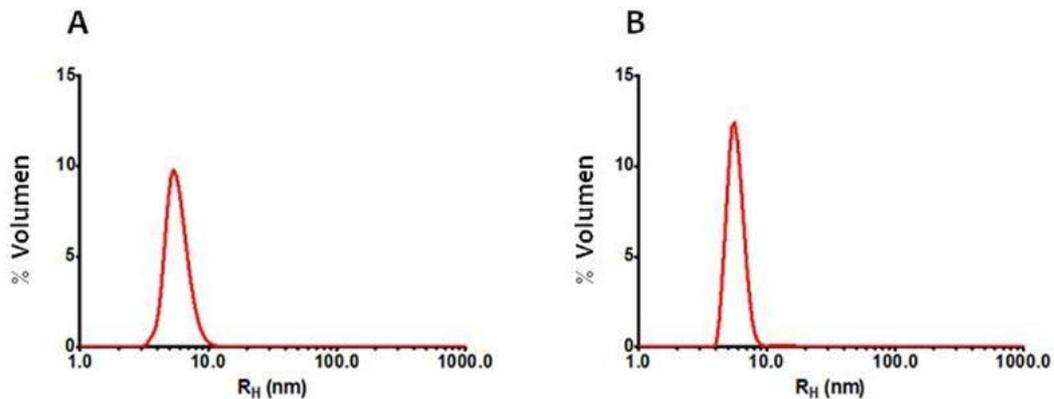


Figura 9: Análisis por DLS del tamaño de las partículas lipoproteicas presentes en el AgB_{S/F} y AgB_F. En el gráfico se muestra la distribución de las poblaciones de partículas presentes en el AgB_{S/F} (A) y AgB_F (B) de acuerdo con el tamaño estimado según la medida de la luz dispersada ajustada por el volumen (%). Los gráficos corresponden al promedio de tres determinaciones de cada muestra realizadas en forma consecutiva.

A partir de las Figuras 8 y 9, se puede señalar que existe cierto grado de agregación en las preparaciones de AgB ya que el DLS arrojó la presencia de partículas en las muestras con un R_H=142.4±16.82 nm para el AgB_{S/F} y R_H=151.06±10.33 para el AgB_F. Sin embargo, se reportó que más del 98 % del volumen de las muestras analizadas presentó un pico mayoritario de 5.7 nm, siendo prácticamente insignificante y similar la proporción de partículas agregadas en las dos muestras obtenidas. Esto indicó que el paso de filtración no influyó en el tamaño de las partículas lipoproteicas obtenidas, ya que ambos preparados presentaron partículas de

diversos tamaños con una población mayoritaria de partículas con similar R_H (valor promedio para las preparaciones de 5.75 ± 0.03 nm).

Por otro lado, se procedió a evaluar el efecto de la filtración sobre la capacidad de las preparaciones del AgB nativo de inducir *per se* señales inflamatorias en macrófagos. Para ello, se incubaron macrófagos THP-1 con $AgB_{S/F}$ y AgB_F a diferentes concentraciones y se midió por ELISA los niveles de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β e IL-6 en el sobrenadante de cultivo. En la Figura 10A se muestra que tanto a concentraciones de 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ el $AgB_{S/F}$ y el AgB_F indujeron la secreción de niveles significativos de IL-1 β de acuerdo a la comparación con el control de PBS_{EB} . Para el caso de la IL-6 (Figura 10B), no se hallaron diferencias significativas según el análisis estadístico cuando se comparó con el control de PBS_{EB} . Sin embargo, en concordancia con lo visto para IL-1 β , concentraciones de AgB de 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mostraron una tendencia a inducir la producción de IL-6.

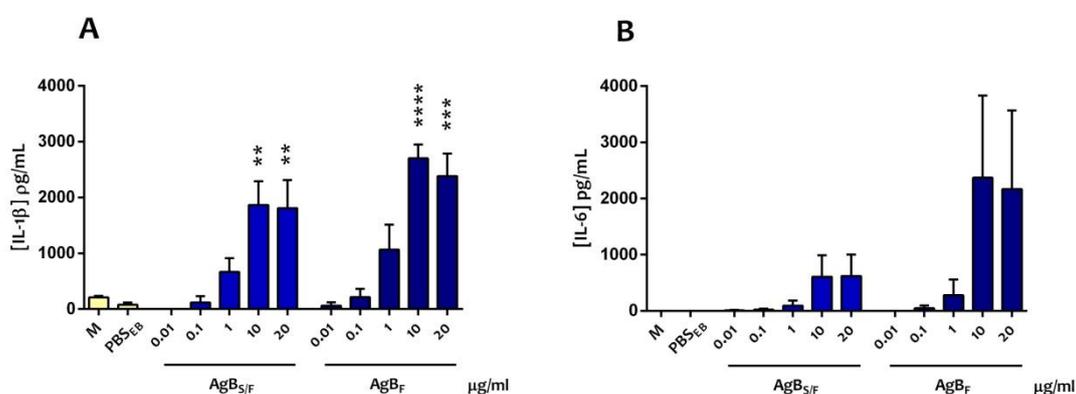


Figura 10: Capacidad de las preparaciones de $AgB_{S/F}$ y AgB_F de inducir *per se* la producción de IL-1 β e IL-6 en macrófagos THP-1. Se incubaron 0.2×10^6 macrófagos con AgB a diferentes concentraciones (0.01, 0.1, 1, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o con medio (M) o PBS_{EB} como controles. A las 24 hs de estimulación se colectó el sobrenadante y se midió la concentración de IL-1 β (A) e IL-6 (B) por ELISA. Se muestra el resultado de tres experimentos independientes expresado como el promedio \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, utilizando el post test de Dunnett. Los asteriscos señalan diferencias significativas respecto al control ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Visto que no se encontraron diferencias significativas en el tamaño de las partículas de las preparaciones de $AgB_{S/F}$ y AgB_F y que la respuesta a nivel de las citoquinas proinflamatorias no varió por la introducción del paso de filtración, optamos por descartar el paso de filtración del protocolo de purificación.

4.1.2. Caracterización de preparaciones de AgB obtenidas con el adición de antibiótico y antimicótico durante su purificación a partir de LH_f

Es importante recordar que, según lo reportado por Silva-Álvarez *et al.*⁴⁰, el AgB inmunopurificado no mostraba actividad proinflamatoria, al menos no a nivel de la inducción de IL-1 β y TNF- α en macrófagos THP-1. Visto que el agregado del paso de filtración -el cual planteamos podría contribuir a la eliminación de partículas lipoproteicas de mayor tamaño con

posible actividad inflamatoria- no modificó el tamaño ni la actividad inflamatoria de las partículas de AgB, pensamos en otros factores que pudieran dar cuenta de los efectos observados. En este sentido, la presencia de productos derivados de contaminación bacteriana podría explicar la actividad proinflamatoria de las preparaciones de AgB_{S/F} y AgB_F. Esta idea surge además por la calidad del material parasitario (las vísceras provenientes de los frigoríficos no son procesadas en forma inmediata a la muerte del animal) y por el hecho que el protocolo de purificación, involucra múltiples pasos con riesgo de contaminación (incluyendo el manejo de grandes volúmenes de LH en los primeros pasos que hacen engorroso un procesamiento rápido de este material). Por esta razón, se intentó mejorar la calidad de las preparaciones de AgB obtenidas mediante el agregado de AbAm. Como fue explicado en la sección materiales y métodos 3.3., en la purificación 2 se agregó AbAm en todas las soluciones utilizadas a partir del paso de elución de la cromatografía de intercambio iónico, obteniéndose una preparación que llamamos AgB_{A1}. En el caso de la purificación 3 todo el procedimiento se realizó en presencia del AbAm ya que se adicionó AbAm al pool inicial de LH y se mantuvo en todos los pasos posteriores del protocolo, obteniendo de esta forma el AgB_{A2}. Siguiendo esta metodología en estas purificaciones se obtuvieron 9.2 y 6.4 mg de AgB_{A1} y AgB_{A2} que representaron entre 5.4 y 6.1 mg/L de LH.

El análisis del AgB_{A1} por DLS se muestra en la Figura 11, en el panel 11A se observa que existen en la preparación dos poblaciones con valores promedio de $R_H=5.93\pm 0.62$ nm y $R_H=78.18\pm 43.05$ nm según el tamaño determinado por la intensidad de dispersión de la luz. En el panel 11B se presenta el R_H corregido por el volumen (%) de cada población de partículas y se observa un único pico (99% del volumen) con un valor de $R_H=5.75\pm 0.62$ nm, valor similar al obtenido con las preparaciones de AgB_{S/F} y AgB_F. En cuanto a la preparación de AgB_{A2}, el análisis por DLS mostró nuevamente la existencia de dos poblaciones, siendo predominante en la muestra aquella población de tamaño similar a las obtenidas en las purificaciones previas (Tabla 1)

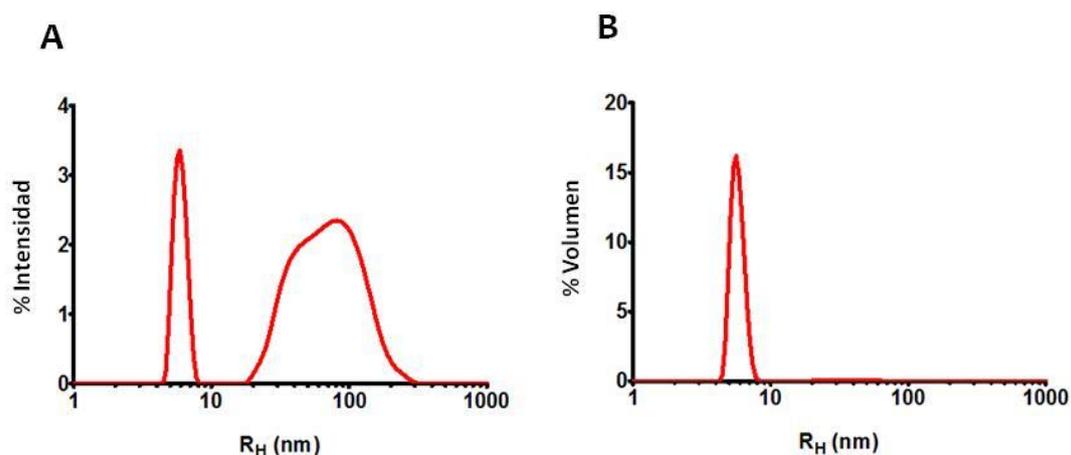


Figura 11: Análisis por DLS del tamaño de las partículas lipoproteicas presentes en el AgB_{A1}. En el gráfico se muestra la distribución de las poblaciones de partículas presentes en el AgB_{A1} de acuerdo con el tamaño estimado según la medida de la luz dispersada por intensidad (A) y su valor ajustado por volumen (B). Los gráficos corresponden al promedio de tres determinaciones de la muestra realizadas en forma consecutiva.

Como fue mencionado, la naturaleza lipoproteica del AgB favorece que se formen agregados. Si bien todas las preparaciones se conservaron a 4°C y en condiciones que previenen su oxidación (atmósfera de N₂ y presencia de BHT), resultó importante controlar en qué medida podría existir agregación luego de transcurridas varias semanas de su preparación. Por esta razón se analizó por DLS el AgB_{A1} luego de transcurridos 55 días del primer análisis. En la Tabla 1 se muestra el valor de R_H promedio (ajustado por el volumen) para todas las muestras de AgB obtenidas. Se observó una tendencia al aumento en el valor del R_H promedio del AgB_{A1} luego de transcurridos 75 días de su obtención, aunque esta tendencia no alcanzó a ser significativa según la aplicación del test estadístico de comparaciones múltiples Holm-Sidak's. Por otro lado, tampoco se observaron diferencias significativas en el tamaño del AgB obtenido en las tres purificaciones realizadas.

Tabla 1: Radio hidrodinámico de las partículas lipoproteicas de AgB determinado por DLS

Muestra	Día post-purificación	R _H promedio (nm) ± desvío estándar
AgB _{S/F}	9	5.77±0.25
AgB _F	9	5.73±0.20
AgB _{A1}	20	5.75±0.62
AgB _{A1}	75	5.98±0.63
AgB _{A2}	20	5.75±0.21

Nota: R_H corresponde al valor obtenido cuando se corrigió la intensidad de dispersión de la luz por el volumen de la muestra.

A continuación se evaluó el efecto de las preparaciones AgB_{A1} y AgB_{A2} sobre los macrófagos THP-1 humanos. Como se observa en la Figura 12 el AgB_{A1}, al igual que el AgB_{S/F} y AgB_F, indujo la secreción de IL-1β pero sólo a la concentración de 20 µg/ml para esta preparación (Figura 12A). Para el caso de la IL-6 (Figura 12B), el AgB_{A1} indujo producción de esta citoquina en macrófagos THP-1 sólo a la concentración de AgB de 20 µg/ml. En el panel 12C se muestra el nivel de IL-1β generado por el AgB_{A2}, observándose una tendencia a la inducción de la producción de IL-1β con el AgB a 10 µg/mL, mayor concentración en que fue analizado. En las mismas condiciones, no se detectó por ELISA producción de IL-6 en respuesta a la estimulación de los macrófagos THP-1 con el AgB_{A2}.

Las variaciones en los niveles de citoquinas inducidos por diferentes preparaciones de AgB examinadas a las mismas concentraciones, sumado a que el uso del AbAm pareció reducir la producción de citoquinas inducida por las preparaciones de AgB *per se*, apoyan la hipótesis de que estos efectos podrían deberse a contaminación bacteriana de la muestra del LH_f de partida. Para evaluar la presencia de LPS, se realizó el test de endotoxina LAL para el AgB_{A2}, ya que fue la muestra que provocó menor inducción de las citoquinas proinflamatorias a la concentración de 10 µg/mL. Este ensayo fue realizado por el laboratorio Beltrán Zunino, ya que en nuestro laboratorio no disponemos de los reactivos. El test da un resultado positivo o negativo según un valor de corte que corresponde a 0.03 UE/mL (1 UE equivale 0.1 ng endotoxina/mL). En función de esto, se analizaron las muestras a una concentración que nos permitiera conocer si una solución de AgB 10 µg/mL contenía una concentración de LPS mayor a 0.01 ng/mL, valor que se considera aceptable para el estudio de la funcionalidad de

macrófagos. El resultado fue positivo, lo que indicó que la muestra analizada contenía niveles de endotoxina que pueden interferir en los estudios funcionales con los macrófagos.

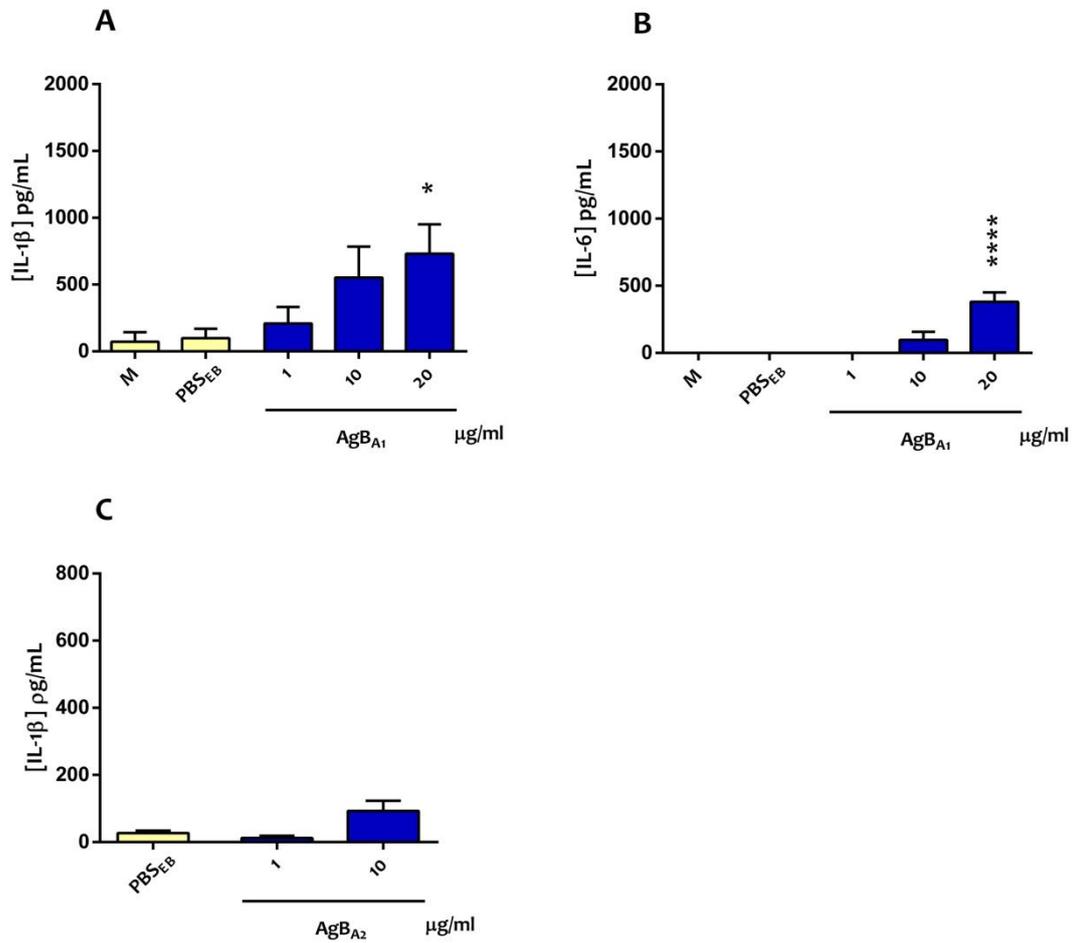


Figura 12: Capacidad de las preparaciones de AgB_{A1} y AgB_{A2} de inducir *per se* la producción de IL-1β e IL-6 en macrófagos THP-1. Se incubaron 0.2×10^6 macrófagos por 24 hs con las preparaciones de AgB a diferentes concentraciones (1, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o con medio (M) o PBS_{EB} como controles. Finalizada la estimulación se determinaron los niveles de citoquinas en el sobrenadante de cultivo por ELISA. Se muestran los niveles de IL-1 β (A) e IL-6 (B) correspondientes al promedio \pm SEM de tres experimentos independientes de estimulación con el AgB_{A1}, donde cada muestra fue analizada por triplicado. En C se muestra los niveles de IL-1 β inducidos por el AgB_{A2} como promedio \pm SEM de un único experimento, en el cual cada muestra fue analizada por triplicado. En el caso del AgB_{A2} no se detectó producción de IL-6 inducida por el AgB_{A2} para las concentraciones de 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, utilizando el post test de Dunnett, y los asteriscos señalan diferencia respecto al PBS (control) siendo * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$.

4.2. Análisis del efecto del AgB sobre la activación de macrófagos frente a la estimulación con agonistas de PRRs

De los estudios realizados surge que ninguna de las preparaciones obtenidas resultó óptima para el trabajo con células dada la sospecha de la presencia de PAMPs (en particular LPS) en las mismas. De todas maneras, intentamos establecer si aún en estas condiciones las preparaciones mostraban efectos inmunomoduladores sobre macrófagos THP-1, de forma similar a lo reportado previamente para otras células mieloides. Con este fin evaluamos aquellas preparaciones que obtuvimos en cada purificación con excepción de la correspondiente al AgB_f que mostró una tendencia a una mayor capacidad de inducir *per se* la producción de citoquinas en comparación con el AgB_{s/f}. En primer lugar, es importante mencionar que a ninguna de las concentraciones ensayadas de las diferentes preparaciones de AgB (1, 10 y 20 µg/mL), así como tampoco a la única concentración de los diferentes agonistas de PRRs (LPS+ATP, zymosán) en presencia o ausencia del AgB se evidenció un efecto tóxico sobre los macrófagos THP-1. En todos los ensayos, una vez finalizado el tiempo de estimulación de las células, las mismas fueron observadas al microscopio óptico sin encontrar cambios en su morfología ni en su propiedad de adherencia a la placa de cultivo. También se realizó el ensayo de MTT, el cual es una medida indirecta de la viabilidad celular, ya que mide la actividad mitocondrial de las células. Acorde a la observación microscópica, este ensayo no mostró una disminución en la actividad mitocondrial de los macrófagos incubados con los diferentes estímulos (AgB, LPS+ATP y zymosán) respecto a las células control incubadas con medio (ver Figura 13).

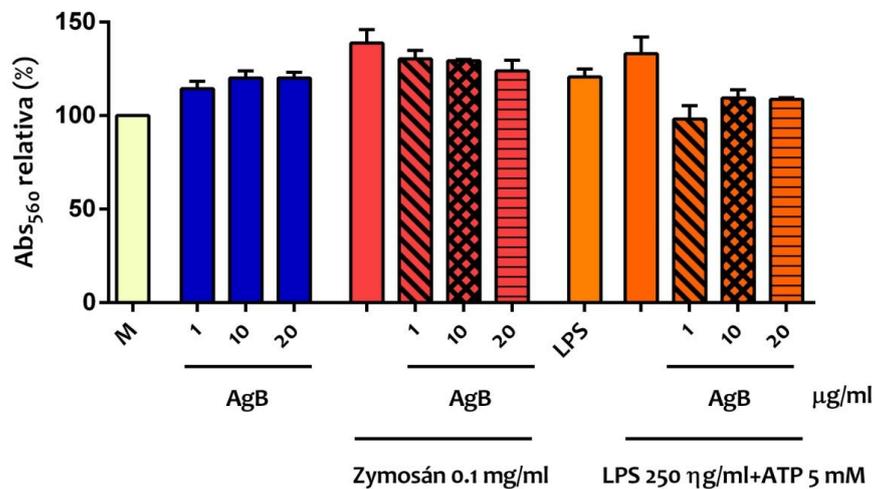


Figura 13: Análisis de la viabilidad de los macrófagos THP-1. Se incubaron 0.2×10^6 macrófagos por 24 hs con i) AgB (1, 10 y 20 µg/mL) y ii) zymosán 0.1 mg/mL en ausencia o presencia de AgB (1, 10 y 20 µg/mL). Por otra parte, se incubaron 0.2×10^6 macrófagos por 5 hs con LPS 250 ng/mL en presencia o ausencia de ATP 5 mM y AgB (1, 10 y 20 µg/mL) según lo detallado en la sección de materiales 3.10.. Se muestra, a modo de ejemplo, el resultado del agregado de AgB en conjunto con ATP, obteniendo un resultado similar cuando el AgB se agregó en conjunto con el LPS. La determinación de la viabilidad de los macrófagos se realizó mediante el ensayo de MTT en el cual se determinó la actividad mitocondrial a través de la medida de la absorbancia a 560 nm del formazán, producto derivado de la reducción del MTT. Se consideró como 100% la absorbancia a 560 nm de la condición control (macrófagos incubados con medio -M-) y se calculó el porcentaje relativo a dicha condición para los triplicados intraexperimento graficando el promedio \pm SEM.

4.2.1. Ensayos utilizando LPS como agonista

En primer lugar se analizó el efecto del AgB sobre la respuesta de los macrófagos frente a un estímulo inflamatorio como es el LPS. Para ello, los macrófagos THP-1 fueron incubados con LPS 10 ng/mL en ausencia o presencia de AgB a diferentes concentraciones (1, 10, 20 µg/mL) y se determinaron los niveles de las citoquinas IL-1β (Figura 14) e IL-6 (Figura 15) por ELISA en el sobrenadante de cultivo.

En el panel 14A se muestra, a modo de ejemplo, el resultado del efecto del AgB_{S/F} sobre la producción de IL-1β en un experimento representativo de tres experimentos independientes donde se ensayaron las muestras por triplicado. En primer lugar, se observa que el LPS a una concentración de 10 ng/mL, indujo un incremento en los niveles de la citoquina respecto a su control (medio). Cuando se estimularon las células con LPS en presencia de AgB, se observó una disminución en la secreción de IL-1β con respecto a los niveles inducidos por LPS. Vale la pena destacar que este efecto inhibitorio se observó a pesar de que el AgB_{S/F} a 20 µg/mL indujo *per se* la secreción de IL-1β, tal como se había observado en los estudios anteriores (Figura 10). En el panel 14B se presenta un experimento similar correspondiente al análisis del AgB_{A1}, donde también se observó que la incubación de los macrófagos con LPS generó una respuesta de IL-1β y en presencia AgB_{A1} esa respuesta mostró una tendencia a disminuir, alcanzando a ser significativa sólo cuando se utilizó el AgB_{A1} a 10 µg/mL. Dado que no se observaron diferencias en el tamaño de las partículas lipoproteicas entre el AgB_{S/F} y el AgB_{A1} y las dos muestras de AgB mostraron efectos similares sobre los macrófagos (paneles 14A y 14B), se realizó también el análisis del conjunto de los datos hallados con el AgB_{S/F} (tres experimentos) y AgB_{A1} (un experimento) con el fin de evaluar la reproducibilidad de los efectos observados en experimentos independientes. En el gráfico del panel 14C se muestra que la presencia del AgB marcó una tendencia a una menor secreción de IL-1β inducida por LPS, en una forma dependiente de la dosis, pero no llegó a ser significativa hecho que podría atribuirse a que hubo una gran variación en los valores absolutos de concentración de IL-1β secretada entre experimentos independientes. Esta variación podría deberse a diferencias en la respuesta de las células, por ejemplo por cambios a lo largo del subcultivo y/o errores inherentes a la manipulación incluyendo posibles diferencias en el número de células plaqueadas por pozo. Debido a esta variabilidad interexperimento los valores se normalizaron dentro de cada experimento según la respuesta del LPS. Considerando la respuesta de LPS como el 100%, se calculó el nivel relativo a dicha respuesta para las muestras incubadas en conjunto con el AgB y se graficó el promedio de los cuatro experimentos (panel 14D). Al realizar esta normalización, se observó que el AgB a 10 y 20 µg/mL provocó una disminución significativa en el nivel de IL-1β inducido por el LPS.

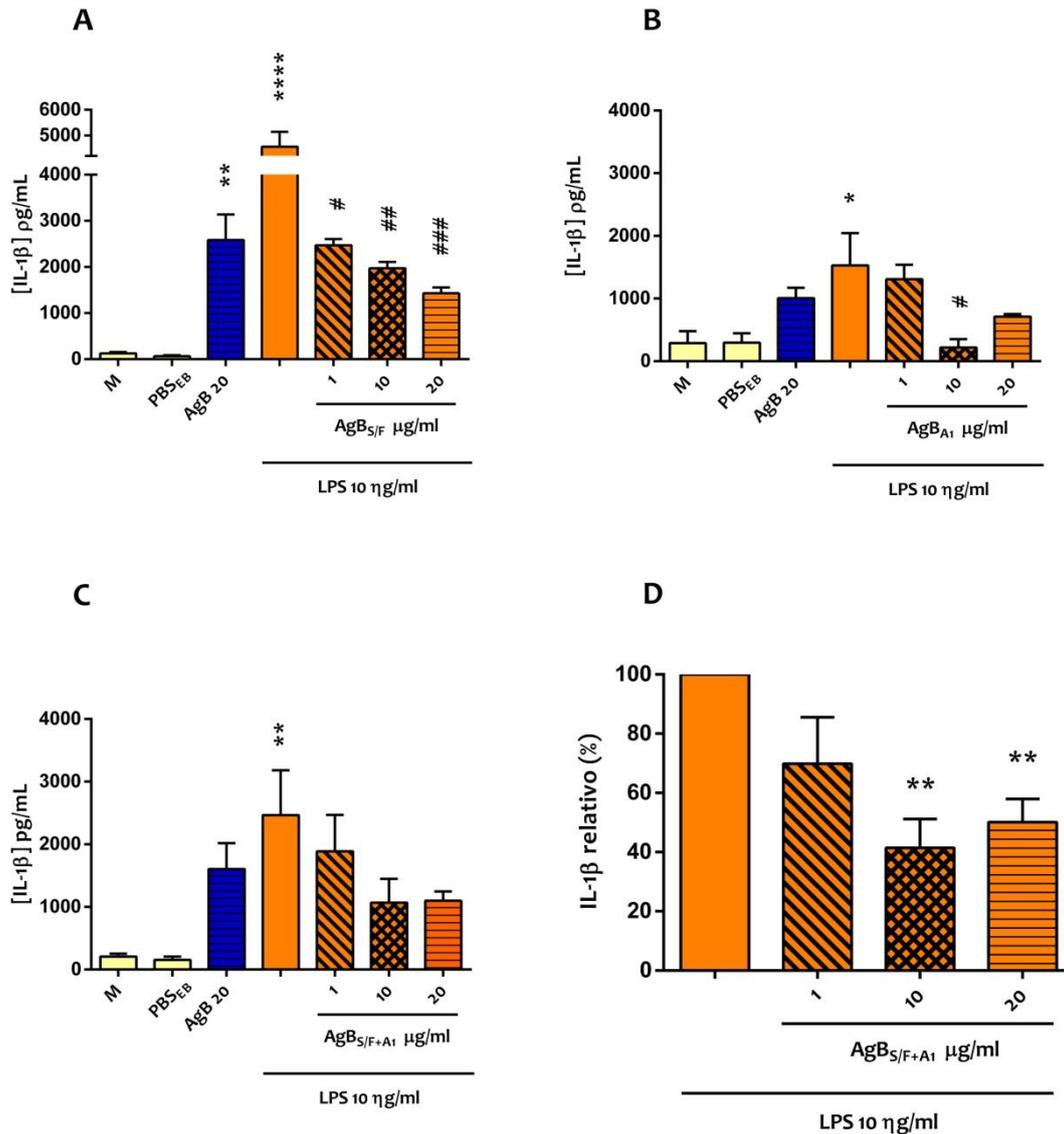


Figura 14: Efecto del AgB sobre la producción de IL-1β inducida por LPS en macrófagos THP-1. Se incubaron 0.2×10^6 macrófagos por 24 hs con LPS 10 ηg/mL en ausencia o presencia de AgB (1, 10 y 20 μg/mL) o con medio (M) o PBS_{EB} como controles. Al finalizar la estimulación, se midió la concentración de IL-1β en el sobrenadante de cultivo por ELISA. En A se muestra el resultado de los niveles de IL-1β (promedio ± SEM de triplicados) obtenidos en un experimento representativo de 3 experimentos independientes donde se analizó el efecto del AgB_{S/F}. En B se muestran los niveles de IL-1β (promedio ± SEM de triplicados) obtenidos en un único experimento utilizando el AgB_{A1}. En C se muestra el promedio ± SEM de los niveles de IL-1β obtenidos a partir de cuatro experimentos independientes utilizando el AgB_{S/F} (tres experimentos) y el AgB_{A1} (un experimento). En D se muestra el nivel de IL-1β, relativo a la concentración inducida por LPS (100%) para cada experimento, expresado como el promedio ± SEM de los cuatro experimentos independientes. El análisis estadístico para A, B y C se realizó mediante ANOVA, utilizando el post test de Tukey. Los asteriscos señalan diferencia significativa del AgB a 20 μg/mL y del LPS a 10 ηg/mL con sus controles (PBS_{EB} y M respectivamente) mientras que los # señalan diferencia significativa con el LPS. En D se realizó la estadística de la columna utilizando One sample T test y los asteriscos en este caso señalan diferencia respecto al valor hipotético de 100%. *(#) P<0.05, ** (##) P<0.01, *** (###) P<0.001, **** (####) P<0.0001.

Además, se analizó la producción de IL-6 en los mismos sobrenadantes de cultivo (Figura 15). En el panel 15A, al igual que en la Figura 14, se muestra el resultado de un único experimento donde cada condición fue analizada por triplicado utilizando el AgB_{S/F}. En dicho experimento, el LPS indujo la producción de IL-6 y se observa que la presencia del AgB_{S/F} durante el estímulo de LPS disminuyó la producción de esta citoquina. En el panel 15B, se muestra el resultado del mismo ensayo pero con el AgB_{A1}, exponiendo una tendencia similar en la cual el AgB_{A1} disminuyó la secreción de IL-6 inducida por LPS. Al igual que para el caso de IL-1 β , al observar tendencias similares, en el panel 15C, se graficó el resultado conjunto de cinco experimentos independientes; tres con el AgB_{S/F} y los restantes con el AgB_{A1}, para poder realizar un análisis estadístico. En el mencionado panel, se observa que a pesar de la producción de IL-6 generada por el AgB *per se* sobre macrófagos, la lipoproteína a las concentraciones de 1, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ interfiere con la secreción de IL-6 inducida por el LPS, disminuyendo significativamente los niveles de la citoquina en el sobrenadante. En el panel 15D se presenta el gráfico de IL-6 relativa (%) a la respuesta al LPS, en donde se mantuvieron los efectos observados en 15C.

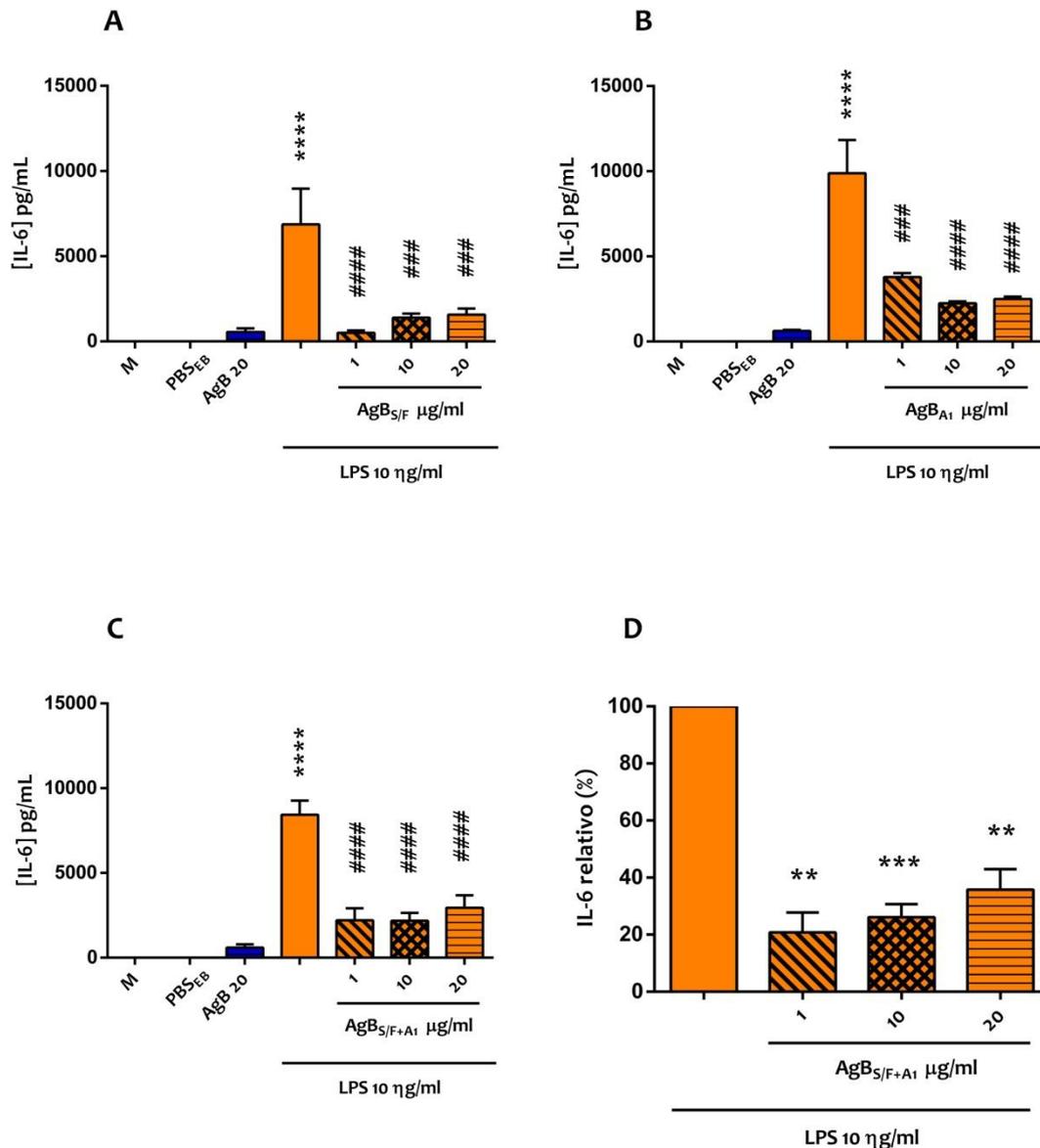


Figura 15: Efecto del AgB sobre la producción de IL-6 inducida por LPS en macrófagos THP-1. Se incubaron 0.2×10^6 macrófagos por 24 hs con LPS $10 \text{ } \eta\text{g/ml}$ en ausencia o presencia de AgB (1, 10 y $20 \text{ } \mu\text{g/ml}$) o con medio (M) o PBS_{EB} como controles. Al finalizar la estimulación, se midió la concentración de IL-6 en el sobrenadante de cultivo por ELISA. En A se muestran los niveles de IL-6 (promedio \pm SEM de triplicados) obtenidos en un experimento representativo de 3 experimentos independientes donde se analizó el efecto del AgB_{S/F}. En B se muestra los niveles de IL-6 (promedio \pm SEM de triplicados) correspondientes al análisis de un único experimento con el AgB_{A1}. En C se muestra el promedio \pm SEM de los niveles de IL-6 obtenidos a partir de cuatro experimentos independientes utilizando el AgB_{S/F} (tres experimentos) y el AgB_{A1} (un experimento). En D se muestra el nivel de IL-6, relativo a la concentración inducida por LPS (100%) para cada experimento, expresado como el promedio \pm SEM de los cuatro experimentos independientes. El análisis estadístico para A, B y C se realizó mediante ANOVA, utilizando el post test de Tukey. Los asteriscos señalan diferencia significativa del AgB a $20 \text{ } \mu\text{g/ml}$ y del LPS a $10 \text{ } \eta\text{g/ml}$ con sus controles (PBS_{EB} y M respectivamente) mientras que los # señalan diferencia significativa con el LPS. En D se realizó la estadística de la columna utilizando One sample T test y los asteriscos en este caso señalan diferencia respecto al valor hipotético de 100%, ** (#) $P < 0.01$, *** (###) $P < 0.001$, **** (####) $P < 0.0001$

En adición a la cuantificación de los niveles de citoquinas en los sobrenadantes, se determinaron los niveles de nitrito por el método de Griess con el fin de evaluar si el AgB es

capaz de modular la producción de nitrito (NO_2) inducida por LPS. Sin embargo, los macrófagos THP-1 no indujeron niveles significativos de NO_2 en respuesta a la concentración de LPS utilizada; los niveles de NO_2 fueron 1.09 ± 1.88 [NO_2] μM y 3.21 ± 0.83 [NO_2] μM en los macrófagos THP-1 incubados con el control (medio) y con LPS, respectivamente. Por lo tanto, en estas condiciones no resultó posible el análisis de un efecto modulador por parte del AgB. En estos ensayos, las preparaciones de AgB no indujeron *per se* la producción de nitrito, ya que los niveles de nitrito en las células incubadas con la lipoproteína a la concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no fueron significativamente diferentes del control a pesar de mostrar cierta tendencia a ser mayores (4.72 ± 2.61 [NO_2] μM).

4.2.2. Ensayo utilizando LPS + ATP como agonista

Dado que el AgB disminuyó la producción de IL-1 β inducida por el LPS (Figura 14), consideramos pertinente realizar un ensayo con LPS y ATP de modo de intentar profundizar en las señales intracelulares que el AgB podría afectar durante la síntesis de esta citoquina en los macrófagos. En particular, buscamos aportar información analizando si los efectos inhibitorios sobre la producción observada involucraron un efecto del AgB sobre las vías implicadas en el “priming” inducido por el LPS o sobre la activación del inflamasoma. Para el ensayo, se estimularon macrófagos THP-1 con LPS 250 ng/mL por 4 horas de forma de permitir la transcripción del gen de IL-1 β . Finalizado este tiempo de estimulación, se agregó ATP para inducir la activación del inflamasoma necesaria para la secreción de la IL-1 β al sobrenadante de cultivo. El AgB_{A1} se agregó a dos concentraciones (1 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en conjunto con el estímulo de LPS o de ATP. El resultado de este experimento se muestra en la Figura 16.

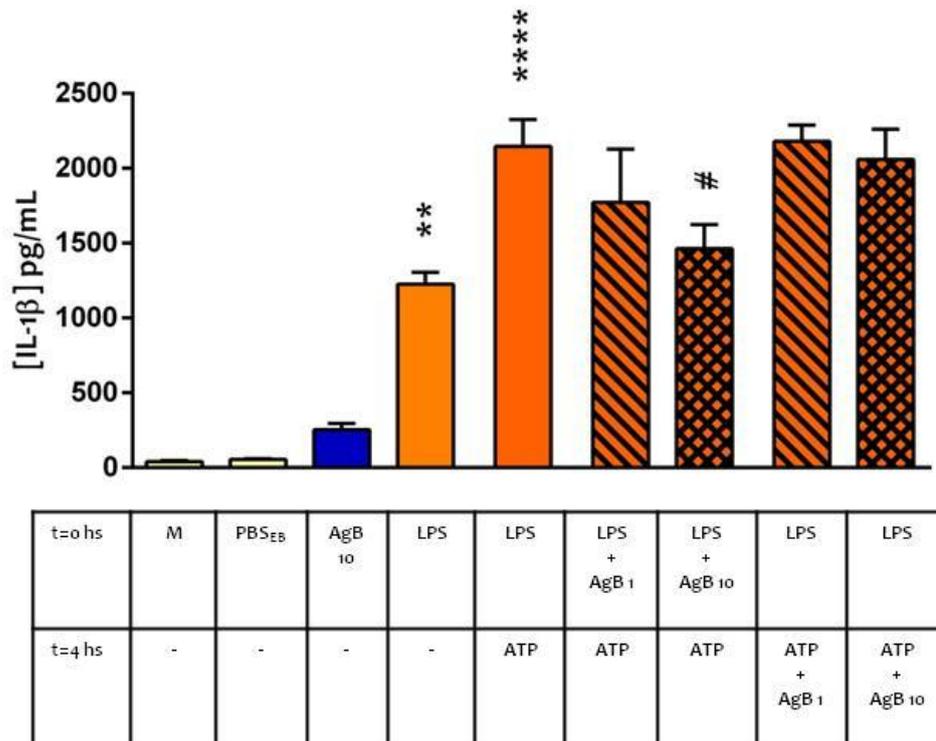


Figura 16: Efecto del AgB sobre la producción de IL-1 β inducida por LPS y ATP en macrófagos THP-1. Para inducir la secreción de IL-1 β , se incubaron 0.2×10^6 macrófagos con LPS 250 ng/mL por 4 hs y posteriormente se adicionó ATP 5 mM. Como controles las células se incubaron con medio (M) o con PBS_{EB}. Luego de una hora, se recogió el sobrenadante de cultivo y se determinaron los niveles de IL-1 β por ELISA. Para evaluar el efecto del AgB, éste se adicionó conjuntamente con el LPS o con el ATP tal como se esquematiza en la tabla. El gráfico muestra el promedio \pm SEM de los niveles de IL-1 β obtenidos a partir de tres experimentos independientes utilizando el AgB_{A1}. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, utilizando el post test de Tukey. Los asteriscos señalan diferencia significativa del LPS y LPS+ATP respecto a su control (M), mientras que los # señalan diferencia significativa respecto al LPS+ATP. * (#) $P < 0.05$, ** (##) $P < 0.01$, **** (####) $P < 0.0001$.

Nuevamente se observó que LPS indujo una respuesta de IL-1 β , pero al agregar ATP se observó una tendencia a incrementar la producción de IL-1 β respecto a la estimulación con LPS solamente. En relación a los efectos del AgB, en forma similar a los resultados descriptos anteriormente, la adición del AgB_{A1} junto con el LPS, mostró un efecto inhibitorio sobre la producción IL-1 β que fue significativo solamente cuando se utilizó una concentración de AgB de 10 μ g/mL. Por otro lado, cuando se agregó el AgB_{A1} en conjunto con el ATP, a cualquiera de las dos concentraciones ensayadas, los niveles de IL-1 β se mantuvieron iguales, sugiriendo que la actividad inhibitoria del AgB se observa sólo cuando se administra junto con el LPS y no implicaría un efecto sobre las señales asociadas a la formación/actividad del inflammasoma. Este resultado indica que el efecto del AgB sobre la producción de la IL-1 β por macrófagos estaría ligado a una modulación de la primera señal (*priming*).

4.2.3. Ensayos utilizando zymosán como agonista

Al observar la modulación generada por el AgB sobre la producción de citoquinas inducidas por el LPS, realizamos ensayos similares con otro agonista de PRRs, con el fin de aportar a la

comprensión de los mecanismos de acción del AgB sobre las células. El agonista de PRRs utilizado fue el zymosán, material que contiene principalmente β -glucanos derivados de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, y que es reconocido por receptores diferentes a los involucrados en el reconocimiento de LPS por parte de la célula. Para determinar la concentración óptima de zymosán, que nos permitiera estudiar la posible modulación mediada por el AgB, se estimularon macrófagos THP-1 con diferentes concentraciones de zymosán (0.01, 0.05, 0.1, 0.5 y 1 mg/mL) por 24 horas y luego se midió la concentración de las citoquinas IL-1 β e IL-6 en el sobrenadante de cultivo. El resultado de este ensayo se muestra en la Figura 17, donde se observa que el zymosán indujo la secreción de forma dosis dependiente de IL-1 β (panel 17A) e IL-6 (panel 17B) por los macrófagos THP-1, observándose saturación de las respuestas a una concentración de 0.1 mg/mL. Tomando en cuenta este resultado se eligió la concentración 0.1 mg/mL de zymosán para realizar los ensayos con el AgB, ya que ésta produjo una respuesta en los macrófagos de buena magnitud, en un rango fuera de la saturación, que nos permitiría evaluar los efectos reguladores del AgB.

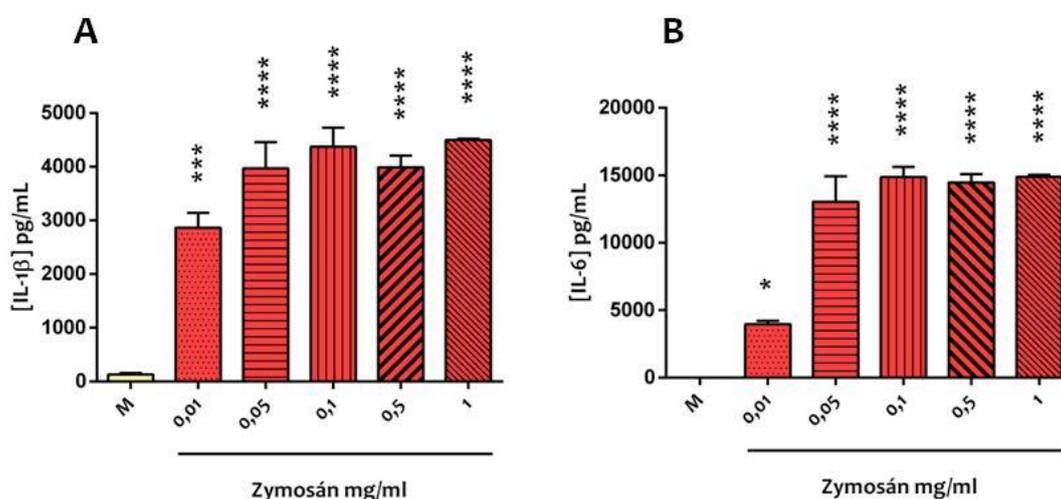


Figura 17: Efecto del zymosán sobre la producción de IL-1 β e IL-6 en macrófagos THP-1. Se incubaron 0.2×10^6 macrófagos por 24 hs con diferentes concentraciones de zymosán (0.01, 0.05, 0.1, 0.5 y 1 mg/mL) o con medio (M) como control. Finalizada la estimulación se recogió el sobrenadante de cultivo y se determinaron los niveles de IL-1 β (A) e IL-6 (B) por ELISA. Se muestra el promedio \pm SEM de los niveles de IL-1 β e IL-6 obtenidos a partir de un único experimento donde las muestras se analizaron por duplicado. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, utilizando el post test de Tukey, los asteriscos señalan diferencia respecto al control (M). * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, **** P<0.0001.

Así, se incubaron los macrófagos THP-1 con zymosán 0.1 mg/mL en ausencia o presencia de AgB_{A1} a diferentes concentraciones (1, 10 y 20 μ g/mL) y se midieron los niveles de citoquinas IL-1 β e IL-6 en el sobrenadante de cultivo. En las Figuras 18 y 19 se expone el resultado de dicho ensayo. En el panel 18A se muestran los niveles de IL-1 β secretados por macrófagos THP-1 y se observa que el zymosán a 0.1 mg/mL indujo un aumento significativo en la secreción de esta citoquina en comparación con el medio (control). Por otra parte, cuando se agregó el AgB_{A1} en conjunto con el zymosán se observó una tendencia a la baja en los niveles de IL-1 β secretados, pero esta tendencia sólo llegó a ser significativa cuando se utilizó AgB a 20 μ g/mL. Del mismo modo que para los ensayos con LPS, los valores obtenidos entre experimento y experimento fueron variables, posiblemente debido a diferencias en la respuesta celular y/o

errores inherentes a la manipulación (incluyendo en este caso que el estímulo es una suspensión y es probable un mayor error durante su administración). Por tal motivo, también se realizó la normalización según el nivel de IL-1 β inducido por el zymosán (100%) para cada experimento y se graficó en B el valor promedio de IL-1 β relativo a la concentración inducida por zymosán de los tres experimentos. Con esta normalización se observa que el AgB a 10 μ g/mL, produjo una reducción significativa en la secreción de IL-1 β inducida por zymosán.

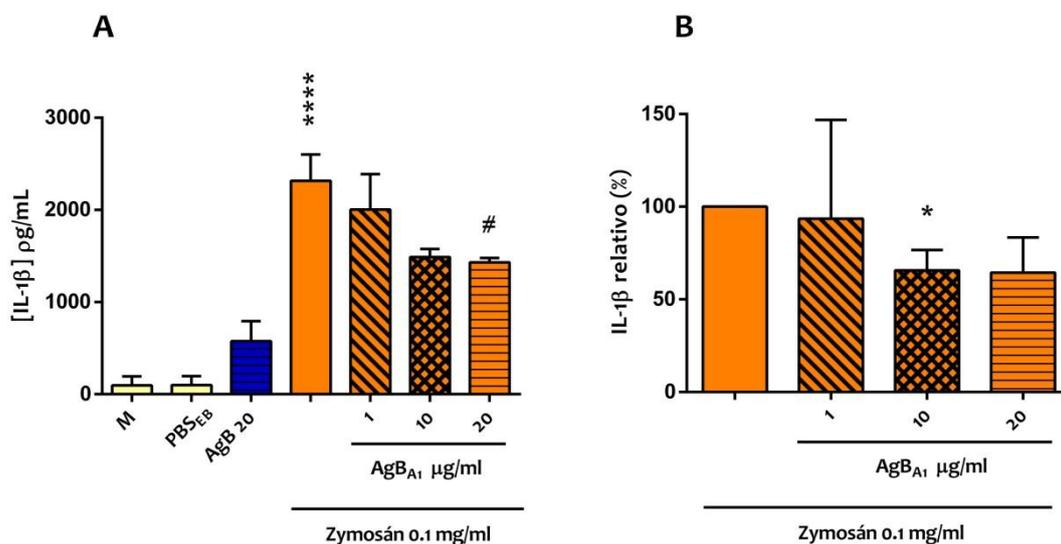


Figura 18: Efecto del AgB sobre la producción de IL-1 β inducida por zymosán en macrófagos THP-1. Se incubaron 0.2×10^6 macrófagos por 24 hs con zymosán 0.1 mg/mL en ausencia o presencia de AgB_{A1} (1, 10 y 20 μ g/mL) o con medio (M) o PBS_{EB} como controles. La concentración de IL-1 β se midió en el sobrenadante de cultivo por ELISA. En A se muestra el promedio \pm SEM de los niveles de IL-1 β obtenidos a partir de tres experimentos independientes. En B se calculó el nivel de IL-1 β relativo a la concentración inducida por zymosán (100%) para cada experimento y se muestra el promedio \pm SEM de los tres experimentos. El análisis estadístico en A se realizó mediante ANOVA, utilizando el post test de Dunnett; los asteriscos señalan diferencia significativa del zymosán respecto al control de M y los # señalan diferencia significativa con el zymosán. En B se realizó la estadística de la columna utilizando One sample T test y los asteriscos en este caso señalan diferencia respecto al valor hipotético de 100%. * (#) P<0.05, *** (####) P<0.0001.

Al evaluar los efectos del AgB sobre la producción de IL-6 inducida por el zymosán (Figura 19), se observa en el panel 19A que el zymosán indujo la secreción de IL-6 y que la presencia de AgB parecería disminuir los niveles de IL-6 inducidos por zymosán de forma dependiente de la dosis. En 19B se muestra el gráfico de los niveles de IL-6 secretados por los macrófagos, expresados en forma relativa al valor de concentración inducido por el zymosán (100%). En este último gráfico se observa que el AgB inhibió significativamente la producción de IL-6 con cualquiera de las concentraciones ensayadas.

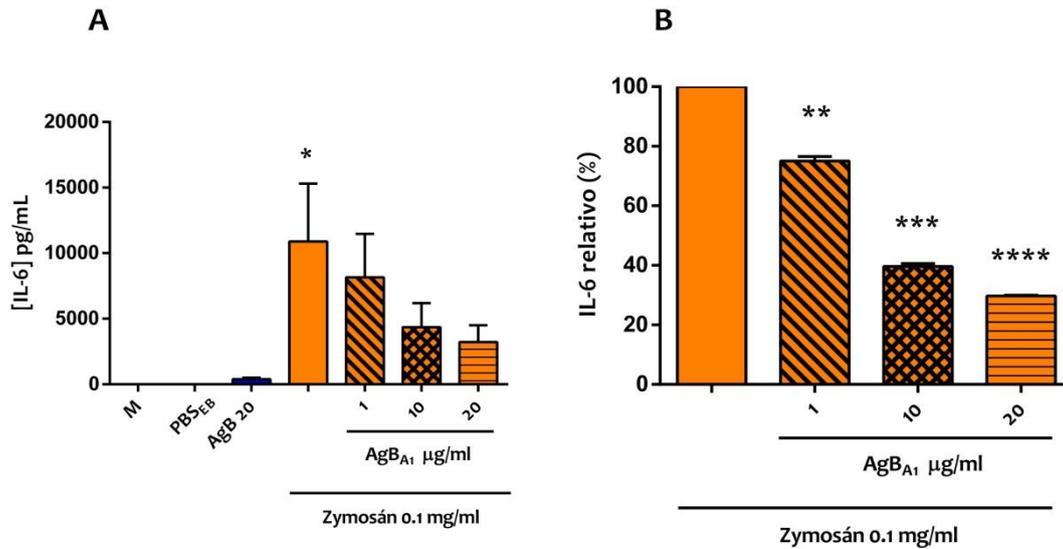


Figura 19: Efecto del AgB sobre la producción de IL-6 inducida por zymosán en macrófagos THP-1. Se incubaron 0.2×10^6 células por 24 hs con zymosán 0.1 mg/mL en ausencia o presencia de AgB (1, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$) o con medio (M) o PBS_{EB} como controles. La concentración de IL-6 fue medida en el sobrenadante de cultivo por ELISA. En A se muestra el promedio \pm SEM de los niveles de IL-6 obtenidos a partir de tres experimentos independientes. En B se calculó el nivel de IL-6 relativo a la concentración inducida por zymosán (100%) para cada experimento y se muestra el promedio \pm SEM de los tres experimentos. El análisis estadístico en A se realizó mediante ANOVA, utilizando el post test de Dunnett, los asteriscos señalan diferencia significativa del zymosán respecto al control (M). No se encontró diferencia significativa entre el AgB a 20 $\mu\text{g/mL}$ y su control (PBS_{EB}) ni entre los niveles inducidos por el zymosán en presencia y ausencia del AgB. En B se realizó la estadística de la columna utilizando el One sample T test y los asteriscos en este caso señalan diferencia respecto al valor hipotético de 100%. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Finalmente, también se determinaron los niveles de nitrito por el método de Griess para valorar si en estas condiciones el zymosán generó una respuesta de óxido nítrico. No se detectaron niveles de nitrito en el sobrenadante por lo que con este agonista tampoco fue factible analizar efectos del sobre esta respuesta.

5. Discusión

Esta tesina de grado buscó ahondar en las funciones moduladoras del AgB del parásito *Echinococcus granulosus* sobre células de la inmunidad innata. En particular se enfocó en el trabajo con macrófagos, células que consideramos importantes porque residen en los tejidos y son claves en el inicio de la inmunidad innata y el desarrollo de la inflamación que contribuye a la eliminación de patógenos. Además los macrófagos participan en los mecanismos de reparación tisular desencadenados luego de la eliminación del patógeno, mecanismos fundamentales que garantizan la homeostasis del tejido.

El primer objetivo específico de esta tesina fue obtener preparaciones del AgB en su forma nativa optimizando la metodología de purificación diseñada en nuestro laboratorio, para que permita el análisis de los efectos de esta lipoproteína sobre células inmunes. Es importante destacar la dificultad que conlleva este objetivo. En primer lugar, el material parasitario es seleccionado y colectado en mataderos del Uruguay, por lo que no podemos controlar con rigurosidad el tiempo y la temperatura a la que quedan expuestas las vísceras durante todo su procesamiento. En segundo lugar, si bien el AgB es la lipoproteína del LH que el parásito produce en forma mayoritaria, su abundancia relativa es baja al considerar la albúmina e inmunoglobulinas del hospedero que están presentes en el LH; esto se verifica en el análisis por SDS-PAGE de las fracciones obtenidas durante la purificación del AgB (Figura 7). Por tal motivo se deben emplear grandes volúmenes de LH (mínimo 1L) para cada ronda de purificación lo cual dificulta el trabajo práctico considerando que no es posible realizar pasos sencillos de concentración de la muestra, por ejemplo por precipitación, ya que contribuirían a la agregación de las lipoproteínas. A su vez, la metodología de purificación del AgB se realiza en varias etapas, que se extienden a lo largo de varios días de trabajo, lo que aumenta las posibles pérdidas de la lipoproteína en cada paso, así como también el riesgo de contaminación, en particular durante los primeros pasos en los que se procesa el LH crudo. En las purificaciones realizadas durante este trabajo se obtuvieron entre 2.7 y 6.1 mg de AgB por litro de LH, cantidades que resultaron suficientes para poder realizar los estudios propuestos en esta tesis. En adición a las dificultades inherentes a la purificación del AgB a partir de LH, la vida útil del AgB es limitada debido a su naturaleza lipoproteica que favorece su oxidación y consecuente agregación⁶⁵. Así, su almacenamiento debe hacerse en frascos de vidrio y en condiciones que inhiban la oxidación incluyendo atmósfera de N₂ y la presencia de antioxidantes como el EDTA y el BHT. Aún llevando a cabo estos cuidados se observa que con el tiempo (entre dos y tres meses en nuestra experiencia) las preparaciones de AgB muestran la formación de agregados. A diferencia del trabajo con proteínas, en este caso no es recomendable congelar las lipoproteínas ya que esto produce alteraciones en la organización de la partícula y se puede perder su estructura nativa. Todos los motivos que se describieron dan cuenta del desafío que representa abordar un estudio funcional del AgB, que implica obtenerlo en su forma nativa. Vale destacar entonces la importancia de este objetivo ya que si bien este componente del parásito se ha caracterizado en forma extensiva en relación con su uso para el inmunodiagnóstico, no se conoce cuál es la función de esta lipoproteína en la biología de *E. granulosus*.

Uno de los objetivos de este trabajo fue la optimización de la metodología de purificación del AgB nativo para obtener preparaciones aptas para realizar ensayos funcionales con macrófagos. Esto fue necesario dada la imposibilidad de obtener actualmente el AgB en base a la cromatografía de inmovilización de anticuerpos con el mAb EB7 (AgB inmunopurificado). Por tal motivo, en este trabajo se buscó introducir modificaciones en el proceso de purificación alternativo desarrollado por nuestro grupo que mejoraran la calidad de las preparaciones (disminuir la presencia de agregados o contaminantes), ya que éstas no reprodujeron los resultados anteriores obtenidos con el AgB inmunopurificado. El método básico de purificación del AgB consistió en realizar una cromatografía de intercambio aniónico sobre Q-Sefarosa seguida de tres rondas de ultracentrifugación bajo un gradiente de densidad (KBr). Mediante la cromatografía de intercambio aniónico sobre Q-Sefarosa se logra remover la mayoría de la albúmina e inmunoglobulinas derivadas del hospedero y concentrar el AgB, purificándolo parcialmente, tal como lo describe González et al.⁴¹ y como logramos reproducir en este trabajo (Figura 7). La ultracentrifugación en gradiente de KBr se utilizó como segundo paso en la purificación del AgB ya que es un método ampliamente utilizado para la purificación de lipoproteínas⁶⁶. Luego de la ultracentrifugación, el AgB aparece en la fracción Ld_f, mientras que el resto de las proteínas de la fracción QS+ se encuentran en la Hd_f. Tal como se muestra en los resultados (Figura 7B), luego de varias ultracentrifugaciones sucesivas se logró obtener preparaciones de AgB de alta pureza (teniendo en cuenta el contenido proteico) y, como ya se mencionó, en cantidades adecuadas para los estudios propuestos.

Se plantearon varias hipótesis para explicar las diferencias observadas entre los efectos biológicos del AgB obtenido por distintos métodos. En primer lugar, el uso del mAb EB7 podría sesgar la purificación hacia la obtención de preparados de AgB enriquecidos en la apolipoproteína AgB8/1. Sin embargo, el análisis de la composición proteica del AgB obtenido por el método alternativo mostró una abundancia de AgB8-1 del 92.2%⁴² lo cual sugiere que independientemente de la metodología de purificación utilizada, el AgB8/1 es la apolipoproteína predominante. En segundo lugar, se planteó que podrían existir diferencias en el tamaño de las partículas lipoproteicas obtenidas por los diferentes métodos dado que para la obtención del AgB inmunopurificado se realizaron pasos de filtración por 0,45 µm que fueron omitidos en el protocolo de purificación basado en la ultracentrifugación para evitar eventuales pérdidas del AgB por adsorción a los filtros. Esta hipótesis pareció razonable porque conocemos que dada la naturaleza lipoproteica, el AgB incluye partículas de tamaños diversos (entre 200 y 400 kDa según la caracterización del AgB inmunopurificado³²). En este sentido, las diferencias en los tamaños de las partículas reflejan probablemente una diferencia en la composición de la lipoproteína. Así, las partículas de mayor tamaño podrían presentar una mayor abundancia de los componentes tanto proteicos como los lipídicos, exponiendo diferente cantidad y/o calidad de moléculas en su superficie que llevaran a desencadenar diferentes señales sobre células de la inmunidad innata. En particular, una mayor cantidad de las apolipoproteínas expuestas en su superficie podrían favorecer interacciones de mayor avidéz con las células, influenciando el tipo de respuesta celular inducida. Por otro lado, el mayor tamaño podría reflejar fenómenos de agregación secundarios a modificaciones oxidativas de los lípidos y/o apolipoproteínas que tendrían influencia sobre los tipos de interacciones lipoproteína-célula que se establecerían. Siguiendo este razonamiento fue que se purificó el AgB_{S/F} y el AgB_F, reintroduciendo en la metodología de purificación de éste último el

filtrado del LH por filtros de 0.45 μm , como paso previo a la cromatografía de intercambio aniónico. El análisis por DLS (Figuras 8 y 9) reveló que no existen diferencias significativas en los tamaños del R_H de las partículas entre el $\text{AgB}_{S/F}$ y el AgB_F . Tomando como parámetro la intensidad de la luz dispersada (ver Figura 8) se observó que ambas preparaciones tenían un perfil polidisperso similar con dos poblaciones mayoritarias, una de 5.75 ± 0.03 nm que corresponde al tamaño esperado de acuerdo al tamaño molecular³² y la densidad³³ reportadas y otra mucho mayor de $R_H = 142.4 \pm 16.82$ nm para el $\text{AgB}_{S/F}$ y de $R_H = 151.06 \pm 10.33$ para el AgB_F . Además, como fue mostrado en la Figura 9, se observó que la mayoría de las partículas en ambas muestras (98% del volumen) poseían un R_H de 5.7 nm, siendo prácticamente insignificante la proporción de partículas de mayor tamaño. Los tamaños hallados en ambas preparaciones de AgB coinciden con los datos obtenidos previamente para el AgB inmunopurificado³² siendo el perfil polidisperso una característica atribuible a las lipoproteínas dado que es posible que las partículas difieran en el contenido de lípidos y/o que exista cierto grado de agregación. En cualquiera de los casos el paso de filtrado no cambió significativamente el tamaño de las partículas de AgB obtenidas. En paralelo al análisis por DLS, se estudió la capacidad de las preparaciones de AgB de inducir *per se* la producción de IL-1 β e IL-6 en macrófagos THP-1. Como fue mostrado en la Figura 10, tanto el $\text{AgB}_{S/F}$ como el AgB_F indujeron la producción de IL-1 β en macrófagos. Para el caso de IL-6, el análisis estadístico no llegó a mostrar una diferencia significativa respecto al control de PBS_{EB} , aunque para ambas preparaciones de AgB a 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se visualizó una tendencia a un aumento. En resumen, los resultados mostraron que los tamaños encontrados en las preparaciones de $\text{AgB}_{S/F}$ y AgB_F fueron similares entre sí y a los previamente hallados con el AgB inmunopurificado, y además ambas preparaciones de $\text{AgB}_{S/F}$ y AgB_F indujeron la producción de citoquinas proinflamatorias en igual medida. Por lo tanto, el conjunto de datos obtenidos mostró que no resultó ser cierta la idea que el tamaño de las lipoproteínas podría explicar las diferencias en los efectos biológicos del AgB purificado por distintos métodos (inmunoadfinidad versus ultracentrifugación).

Al no encontrar diferencias significativas en el tamaño de las partículas entre el $\text{AgB}_{S/F}$ y AgB_F y dado que la respuesta inducida para las citoquinas proinflamatorias no fue distinta entre las preparaciones, se optó por eliminar el paso de filtración. La filtración del LH fue un proceso lento y dificultoso al verse tapados los filtros continuamente, constituyendo un paso adicional que podría contribuir a las pérdidas de AgB por adsorción a los filtros. Además, este paso podría propiciar el crecimiento bacteriano (si existieran bacterias en el LH) ya que a pesar de que fue realizado bajo flujo laminar, es un procedimiento que llevó varias horas de manipulación a temperatura ambiente consecuencia del gran volumen de LH_f de partida.

La segunda hipótesis que nos planteamos al observar los niveles de citoquinas proinflamatorias inducidas por el AgB purificado por ultracentrifugación, fue que las muestras contenían PAMPs derivados de contaminación bacteriana, como ser LPS. Apuntando a disminuir el desarrollo bacteriano y en consecuencia el nivel de PAMPs derivados de éste, se adicionó AbAm. En una primera instancia se adicionó en el proceso de purificación a partir de la fracción QS+ (purificación del AgB_{A1}) y luego desde el comienzo del proceso de purificación (purificación del AgB_{A2}). El análisis por DLS para el AgB_{A1} y AgB_{A2} mostró tamaños de partículas similares a los obtenidos previamente, con la mayoría del volumen de la muestra presentando un R_H de 5.75 nm para ambas muestras (ver tabla 1). El estudio de la inducción de la

producción de las citoquinas IL-1 β e IL-6 por el AgB_{A1} y AgB_{A2} en macrófagos reveló una respuesta dependiente de la dosis de AgB para ambas preparaciones, pero esta pareció ser menor en el caso del AgB_{A2} ya que esta preparación no indujo la secreción de IL-6. Es importante destacar que la capacidad de las diferentes preparaciones de AgB de inducir la secreción de citoquinas proinflamatorias por los macrófagos no pudo ser analizada en un mismo experimento debido a que, como fue previamente mencionado, el AgB tiende a oxidarse y agregarse con el tiempo y las diferentes preparaciones se obtuvieron a lo largo de varios meses de trabajo con un desfase significativo considerando la vida útil del AgB. Por tanto, para comparar las distintas preparaciones de AgB en términos de su capacidad para inducir la secreción de citoquinas, independizándonos de la variación en la respuesta de los macrófagos entre un experimento y otro, se normalizó la respuesta celular tomando como referencia al LPS. En la Tabla 2 se muestra la concentración de IL-1 β e IL-6 inducida por todas las preparaciones de AgB obtenidas a 10 μ g/mL o por el LPS a 10 ng/ml, así como también el valor del cociente entre esas dos respuestas que se tomó como un índice de la actividad normalizada.

Tabla 2. Respuesta de citoquinas inducida por las preparaciones del AgB y por el LPS

		AgB_{S/F}	AgB_{A1}	AgB_{A2}
[IL-1 β] pg/mL	AgB 10 μ g/mL	2314.1	874.2	93.3
	LPS 10 ng/mL	2235,4	1528.1	1368,9
Índice _{IL-1}	AgB/LPS	0.659	0.572	0.068
[IL-6] pg/mL	AgB 10 μ g/mL	1320.8	249.5	0
	LPS 10 ng/mL	6008,3	9885.9	2638,6
Índice _{IL-6}	AgB/LPS	0.220	0.025	0

Como se observa en la Tabla 2, los cocientes de AgB/LPS disminuyen notablemente en las preparaciones donde se adicionó AbAm durante el proceso de purificación, con una disminución aún mayor en el AgB_{A2}, sugiriendo que la adición del AbAm durante el protocolo de purificación contribuyó a disminuir la carga bacteriana y por ende la presencia de PAMPs (posiblemente endotoxina) en las diferentes muestras. De acuerdo con este resultado se realizó el análisis de presencia de endotoxinas por LAL al AgB_{A2} (a la concentración de 10 μ g/mL) obteniendo un resultado positivo, lo que quiere decir que en la muestra analizada existe un nivel de LPS mayor al aceptable para el trabajo con macrófagos (≤ 0.01 ng/mL). Considerando que el resultado fue positivo para esta muestra de AgB que fue la que indujo menores niveles de citoquinas proinflamatorias, es altamente probable que el AgB obtenido en las purificaciones previas AgB_{S/F}, AgB_F y AgB_{A1} también diera un resultado positivo (no fue posible/razonable practicar este análisis a todas muestras de AgB obtenidas por el costo del ensayo). Vale la pena mencionar que la remoción del LPS mediante el uso de polimixina B⁶⁷ no es un método practicable en este caso, ya que en nuestro grupo se ha observado que el AgB se une fuertemente a la polimixina B, siendo muy difícil su elución aún a valores de pH muy bajos (Maite Folle, Cátedra de Inmunología, comunicación personal). Esta observación indica una

posible similitud estructural entre motivos moleculares presentes en el AgB y el lípido A del LPS, con el cual interacciona la polimixina B⁶⁷, razón por la cual podríamos cuestionarnos si el resultado positivo obtenido en el ensayo del LAL se debe a la presencia de LPS o a una actividad que pueda estar imitando el AgB dada su similitud estructural con el LPS. En este sentido es importante destacar que el ensayo del LAL detecta la presencia de LPS a través de su unión al factor C presente en la superficie de los hematocitos de *Limulus ameobocyte*, con la consecuente activación de una cascada de coagulación que produce la transformación de la proteína soluble coagulogéno a su forma insoluble coagulina, producto final detectado en el ensayo⁶⁸. Existe evidencia que muestra que la activación de la cascada de la coagulación requiere de la unión del factor C al lípido A del LPS por lo que el AgB podría imitar esta interacción produciendo un resultado falso positivo. Si bien ésta sería una posibilidad, es un hecho que el agregado de AbAm disminuyó la actividad inmunoestimuladora de las preparaciones de AgB, especialmente en el AgB_{A2} que fue obtenido cuando se adicionó el AbAm en el primer paso de la purificación. Por tanto, estos resultados hacen más probable la hipótesis de que el material parasitario de partida (LH) contiene niveles significativos de bacterias que son la fuente principal de contaminación. Así el agregado de AbAm en el primer paso de la purificación favorece la eliminación de la posible carga bacteriana, pero es posible que exista cierta retención de componentes bacterianos en la muestra (incluyendo las endotoxinas) que podrían ser responsables de la actividad LAL detectada.

A pesar de la actividad proinflamatoria inducida por el AgB en macrófagos igualmente se analizaron los efectos de la lipoproteína sobre la respuesta de citoquinas de estas células estimuladas con agonistas de PRRs. El primer agonista ensayado fue el LPS de *E. coli*. Este ligando interacciona con el TLR-4 y desencadena una vía de señalización intracelular con cascadas de fosforilación que culminan en la degradación del inhibidor del factor NFκB, conduciendo por tanto a la liberación de este factor de transcripción, su translocación al núcleo y la activación de la expresión de los genes que codifican un conjunto de mediadores inflamatorios incluyendo las citoquinas IL-1β e IL-6⁶⁹. Como se describió en los resultados (Figuras 14 y 15), el AgB inhibió la secreción de IL-1β e IL-6 inducidas por LPS en macrófagos, indicando que su presencia interfirió con la producción de dichas citoquinas proinflamatorias, y esto se observó a pesar de la actividad estimuladora mostrada por las preparaciones. Vale la pena mencionar que esta actividad estimuladora podría explicar que la inhibición provocada por el AgB no siempre mostrara un efecto dependiente de la dosis.

Un hecho a tener en cuenta al intentar comprender el mecanismo de acción del AgB, es el mecanismo de secreción de las citoquinas estudiadas. Mientras que la IL-6 es secretada por el mecanismo celular convencional que involucra el transporte a través del aparato de Golgi y finaliza en exocitosis⁷⁰, la secreción de IL-1β depende de la activación de un complejo macromolecular llamado inflamasoma. Tal como se introdujo en la sección 1.3., la secreción de la IL-1β requiere de dos señales. En primer lugar el *priming* mediado por la señalización vía un TLR (en nuestros experimentos el TLR4 que reconoce específicamente el LPS), que induce la transcripción del ARNm de la IL-1β y del NLRP3 así como también modificaciones post-traduccionales en este receptor y en la proteína ASC asociada a la formación del inflamasoma⁵⁸. Esta primera señal termina con la generación de un producto inactivo denominado pro-IL-1β que carece de un péptido señal en la secuencia aminoacídica que dirija su secreción, por lo que permanece en el citosol. En segundo lugar, el reconocimiento de una

“señal de alerta o daño” que active el inflamasoma y conduzca a la activación de la caspasa-1 la cual realiza el corte proteolítico necesario para la maduración de la IL-1 β y su secreción. Es importante aclarar que si bien estas dos señales son necesarias para la secreción de IL-1 β , se ha descrito que en los macrófagos THP-1, la primera señal derivaría en la generación de productos que actúan como segunda señal, por lo cual hay activación del inflamasoma y secreción de IL-1 β ante el estímulo de LPS solamente^{58,71,72}. De todas formas, en esta línea celular, la estimulación por una segunda señal (por ejemplo ATP) amplifica la producción de IL-1 β ⁷². Así, buscando comprender si el efecto del AgB sobre la secreción de IL-1 β inducida por LPS en los macrófagos involucra interferencia a nivel de la primera o segunda señal, realizamos ensayos con LPS y ATP. En estos ensayos se realizó el *priming* con LPS para inducir la expresión del gen de IL-1 β y luego se agregó ATP para activar más eficientemente el inflamasoma. Tal como se mostró en los resultados (Figura 16), el AgB moduló la secreción de IL-1 β cuando se adicionó junto con el LPS, pero no cuando se agregó junto con el ATP, sugiriendo que el mecanismo de modulación de la secreción de IL-1 β por el AgB involucraría una interferencia a nivel del *priming* con LPS y no involucraría una inhibición en el ensamblado y/o actividad del inflamasoma. Considerando que el AgB también inhibió la secreción de IL-6 inducida por LPS, sería factible que el AgB interfiera a nivel de la cascada de señalización inducida por el LPS. De todas maneras no es posible descartar que el AgB afecte mecanismos celulares más generales, que repercutan sobre la estabilidad y/o traducción de los ARNm de estas citoquinas o sobre la estabilidad y degradación de las propias citoquinas.

Otra alternativa para explicar los efectos moduladores del AgB es que actúe inhibiendo la secreción de citoquinas inducidas por LPS a través de la captura de la endotoxina por su porción lipídica. Diversos autores han reportado que las lipoproteínas plasmáticas unen LPS, siendo la HDL la lipoproteína a la cual se une en forma mayoritaria⁷³⁻⁷⁵. Esta unión del LPS a las lipoproteínas se ha relacionado con una modulación de la respuesta al LPS en diversos modelos. Por un lado se reportó que la incubación del LPS con suero normal de conejo produjo una disminución de la densidad del LPS (que se atribuyó a una interacción con las lipoproteínas), y que la inyección intravenosa de este LPS de menor densidad en conejos provocó menor actividad pirogénica, neutropenia y letalidad, respecto al LPS nativo⁷⁶. También se ha observado que el LPS unido a lipoproteínas es de 20 a 1000 veces menos eficiente en inducir la respuesta de IL-1 e IL-6 en monocitos/macrófagos con respecto al LPS libre⁷⁴. Además, en un modelo *in vitro*, la producción de IL-1 inducida por LPS en monocitos humanos se inhibió en presencia de lipoproteínas plasmáticas⁷⁷. Más aún, utilizando la línea celular HEK293 transfectada con un plásmido reportero de TLR4 se observó una disminución en la actividad proinflamatoria mediada por TLR-4 al preincubar el LPS con las lipoproteínas plasmáticas⁷⁸. Por tanto, si el AgB también fuera capaz de unir el LPS, este mecanismo podría explicar la disminución en la producción de citoquinas inducida por LPS.

Una forma de aportar datos para dilucidar el mecanismo de acción del AgB fue examinar si tiene capacidad de modular la respuesta de citoquinas inducida por otro agonista de los receptores TLRs en macrófagos; esto apoyaría la idea de que los efectos moduladores del AgB son producto de una acción directa sobre la señalización vía TLRs en los macrófagos. Con este propósito se eligió como agonista de PRRs el zymosán, (partículas derivadas de la pared de *Saccharomyces cerevisiae*), que es reconocido por el dímero de receptores TLR-2/TLR-6 y por el receptor tipo lectina llamado Dectina-1^{79,80}. Además, se eligió el zymosán porque es un

material particulado de tamaño aproximadamente 1000 veces mayor que el AgB, y rico en motivos hidrofílicos como ser β -1-3 glucanos (polímeros de glucosa), por lo cual en este caso no resultaría factible que el AgB pudiera secuestrar el zymosán evitando su interacción con los macrófagos. Tal como se mostró en las Figuras 18 y 19, se observó que el AgB inhibió la producción de las citoquinas IL-1 β e IL-6 por macrófagos estimulados con zymosán. De acuerdo con este resultado es razonable plantear que el AgB tiene capacidad para interferir con la activación de los macrófagos inducida por algunos PRRs, que incluirían al menos receptores TLRs de membrana plasmática (TLR4 y posiblemente el TLR-2/TLR-6).

Los resultados obtenidos muestran cierta similitud con los resultados descritos por Rigano et al.³⁷, quienes mostraron un efecto inmunomodulador del AgB frente a la estimulación con LPS de DCs que, al igual que los macrófagos, son células innatas de origen mieloide. Por un lado Rigano et al.³⁷ sugirieron que el AgB podría interactuar con las DCs a través de TLRs ya que el AgB, al igual que el LPS, aumentó la fosforilación del factor IRAK y la activación del factor NF κ B. Sin embargo su hipótesis implica que la interacción del AgB con el TLR-4 desencadenaría efectos diferentes a los generados por la unión del LPS, ya que las DCs estimuladas con el AgB aumentaron la expresión del marcador de maduración CD83 y la expresión de la molécula coestimuladora CD40, pero no la expresión de otras moléculas coestimuladoras como CD86, CD80 y HLA-DR. Además, el fenotipo de DCs inducido por el AgB produjo bajos niveles de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-12p70) y fue capaz de promover un perfil de activación del tipo Th2. Considerando la posible similitud estructural del AgB con el LPS, sugerida por la interacción con la polimixina B, no es ilógico plantear que el AgB pueda interactuar con el TLR-4, aunque en una forma diferente que el LPS, de modo de conducir a eventos de transducción de señales distintas que expliquen los efectos observados sobre la disminución de secreción de citoquinas estudiadas. En caso que el AgB interactúe con las células a través del TLR-4, los resultados obtenidos con el zymosán podrían explicarse si la señalización a través del TLR-4 genera una interferencia con la señal transducida por la unión del zymosán al heterodímero TLR2/6. Alternativamente, si el AgB no interactúa con las células a través de TLRs (TLR-4), es posible plantear que la unión del AgB al macrófago activa una vía de señalización que interfiere con las vías transducidas por TLRs, incluyendo al TLR-4 y al heterodímero TLR-2/6. Esto sería factible porque ambos receptores TLR-2/6 y TLR-4 utilizan la molécula adaptadora Myd88 para la transducción de la señal desencadenada por TLRs⁸¹, lo cual significa que comparten mecanismos de señalización ligados a la activación del factor NF κ B con la consecuente expresión de los genes de IL-1 β e IL-6.

Por otra parte si bien estudios en nuestro grupo han demostrado la unión del AgB con los macrófagos con una constante de disociación (Kd) de 3×10^{-7} M⁴⁰ no fue posible identificar un receptor o el tipo de interacción que se estableció. Buscando receptores candidatos que medien efectos moduladores y a la vez cumplan la función de adquirir lípidos esenciales para el parásito, es lógico plantear que el AgB interactúe con receptores celulares utilizados por las lipoproteínas plasmáticas del hospedero. Esta posibilidad además se apoya en resultados de nuestro grupo que mostraron que la unión del AgB a monocitos es inhibida en presencia de la lipoproteína de baja densidad (LDL) y la HDL⁴⁰. Un dato relevante en este sentido es que las HDL de mamíferos interactúan con receptores celulares, incluyendo ABCA1, a través de los cuales estimulan el eflujo de colesterol y activan la vía de señalización de Jak2/STAT3 con efectos antiinflamatorios en los macrófagos⁶¹. También se ha reportado que la interacción de

la HDL con el receptor scavenger de clase B, tipo I (SR-BI) en macrófagos THP-1 disminuyó los niveles de citoquinas inducidos por el LPS (TNF- α e IL-6) a través de una disminución en la actividad del factor NF κ B⁸². Es así que, acorde al modelo estructural propuesto para el AgB en el cual adquiriría una estructura similar a la HDL₃¹³, esta lipoproteína parasitaria podría interactuar de la misma forma que la HDL con el receptor ABCA1 o con el SR-BI y de esta forma explicar los efectos moduladores de la inflamación frente a la estimulación con LPS y zymosán observados en este trabajo. Finalmente, otro mecanismo de inmunomodulación que ha sido descrito para las lipoproteínas plasmáticas y que podría estar involucrado en los efectos del AgB es la alteración por parte de lipoproteínas de los *lipid rafts* como consecuencia de la toma de colesterol⁸³. Este robo del colesterol de membrana afectaría las vías de transducción de señales y por tanto la activación celular⁸³. Una vez más, el AgB podría también ser capaz de interactuar de dicha forma con las células innatas, provocando una disminución en la señalización compatible con la disminución observada de la producción de IL- β e IL-6. Recientemente se ha descrito la existencia de vías de coordinación entre las funciones metabólicas e inmunológicas que aseguran la homeostasis celular, desafiada por cambios en las condiciones del medio externo, incluyendo la presencia de patógenos⁸⁴. La lipoproteína parasitaria podría de este modo tomar lípidos esenciales desde las células del hospedero para el parásito y al mismo tiempo influenciar el fenotipo de las células inmunes en el contexto de la infección, llevando a la regulación de la respuesta inmune local.

6. Conclusiones y perspectivas

El primer objetivo de este trabajo fue la optimización de la metodología de purificación del AgB nativo para obtener preparaciones aptas para realizar ensayos funcionales con macrófagos. En este sentido, las dos modificaciones llevadas a cabo fueron el paso de filtrado del LH y el agregado de AbAm durante la purificación. El paso de filtrado no tuvo efectos sobre el tamaño de las partículas lipoproteicas de AgB ni modificó la respuesta de citoquinas inducida por el AgB *per se*, por lo tanto podemos concluir que este paso no contribuyó a mejorar las preparaciones del AgB para llevar a cabo los estudios funcionales. Por otra parte, el agregado de AbAm constituyó una modificación que disminuyó los niveles de citoquinas inducidos por el AgB *per se*, revelando de esta forma una posible presencia de contaminantes bacterianos en el material de partida. Si bien esta modificación mejoró la calidad de las preparaciones de AgB obtenidas y nos permitió estudiar los efectos de la lipoproteína sobre la funcionalidad de los macrófagos, no fue posible anular por completo la actividad proinflamatoria sobre macrófagos encontrada en las preparaciones del AgB nativo. A pesar de que el trabajo demuestra que la contaminación bacteriana del material parasitario es un factor decisivo en la calidad final de las preparaciones de AgB nativo purificadas a partir de LH, resulta importante corroborar que las actividades proinflamatorias remanentes en el AgB no son efectos intrínsecos del AgB sino que se trata de contaminación por LPS u otros PAMPs. Para ello y como perspectiva a futuro, en el grupo se están llevando adelante dos desarrollos. Por un lado, se está expresando en forma recombinante la subunidad AgB8/1 (rAgB8/1) en un sistema de expresión eucariota. Asumiendo que las apolipoproteínas del AgB pueden reproducir las interacciones con los macrófagos⁴⁰, será útil establecer si la rAgB8/1 induce una respuesta de citoquinas en los macrófagos, ya que no se esperaría tener contaminación con PAMPs en esta preparación. También sería informativo realizar el ensayo de LAL a la preparación (y a preparaciones de otras proteínas recombinantes expresadas con el mismo sistema como control) para establecer si las apolipoproteínas del AgB son capaces de reproducir las interacciones del LPS responsables de la actividad en el ensayo LAL. La expresión de la rAgB8/1 en células de insecto aportará un reactivo muy valioso más allá de que no debemos prescindir del estudio del AgB en su forma nativa. Por otro lado, apuntando a mejorar la metodología de purificación del AgB nativo se está trabajando en colaboración con el Dr. G. González para generar anticuerpos monodominio de llama específicos para el AgB. De esta forma, se espera lograr en un futuro próximo reproducir el método de purificación basado en la cromatografía de inmunoafinidad.

En cuanto al segundo objetivo de este trabajo, hemos determinado que la presencia de AgB durante la estimulación de macrófagos con diferentes agonistas de PRRs, en particular con LPS, LPS+ATP y zymosán, disminuyó la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β e IL-6 inducidas por estos agonistas. Como perspectiva, sería interesante estudiar la capacidad de unión y los efectos del AgB sobre alguna línea celular knockout para el receptor TLR-4, de forma de dilucidar si la lipoproteína parasitaria efectivamente puede utilizar este receptor desencadenando efectos moduladores en células mieloides. Además, considerando la complejidad estructural y composicional del AgB nativo, resulta de interés establecer si es el componente proteico, el lípido o la suma de ambos, los motivos moleculares asociados a los efectos inmunorreguladores del AgB nativo sobre de la secreción de citoquinas proinflamatorias. Esta pregunta será posible de abordar en estudios donde se comparen los

efectos del AgB nativo con aquellos provocados eventualmente por la rAgB8-1 o por los lípidos purificados a partir de la lipoproteína nativa mediante la extracción con solventes orgánicos.

7. Referencias

1. Thompson, R. C. A. The Biology and systematics of Echinococcus. in *Echinococcus and Hydatid Disease* (eds. Thompson, R. C. A. & Lymbery, A. J.) 1–50 (CAB International, 1995).
2. Nakao, M., Lavikainen, A., Yanagida, T. & Ito, A. Phylogenetic systematics of the genus Echinococcus (Cestoda: Taeniidae). *Int. J. Parasitol.* **43**, 1017–1029 (2013).
3. Cucher, M. A. *et al.* Cystic echinococcosis in South America: systematic review of species and genotypes of Echinococcus granulosus sensu lato in humans and natural domestic hosts. *Medline* **21**, 166–175 (2016).
4. Brunetti, E. & Mccloskey, C. Cystic Echinococcosis. **54**, 518–523 (2016).
5. Díaz, Á. Immunology of cystic echinococcosis (hydatid disease). *Br. Med. Bull.* 1–13 (2017). doi:10.1093/bmb/ldx033
6. Thompson, R. C. A. & Jenkins, D. J. Echinococcus as a model system: biology and epidemiology. *Int. J. Parasitol.* **44**, 865–877 (2014).
7. Thompson, R. C. A. The taxonomy, phylogeny and transmission of Echinococcus. *Exp. Parasitol.* **119**, 439–46 (2008).
8. Frayha, G. J. Comparative Chemical Composition of Protoscolices and Hydatid Cyst Fluid of (Cestoda). *Int. J.* **10**, 359–364 (1980).
9. Aziz, A. *et al.* Proteomic characterisation of Echinococcus granulosus hydatid cyst fluid from sheep, cattle and humans. *J. Proteomics* **74**, 1560–1572 (2011).
10. Díaz, A., Casaravilla, C., Allen, J. E., Sim, R. B. & Ferreira, A. M. Understanding the laminated layer of larval Echinococcus II: immunology. *Trends Parasitol.* **27**, 264–273 (2011).
11. Brehm, K. & Koziol, U. Echinococcus–Host Interactions at Cellular and Molecular Levels. *Adv. Parasitol.* **95**, 147–212 (2017).
12. Ferreira, A. M. El metacestodo de Echinococcus granulosus: activación y regulación del complemento del hospedero y su contribución a la defensa frente a la infección. (Universidad de la República Oriental del Uruguay, 2000).
13. Silva-Álvarez, V. *et al.* Echinococcus granulosus antigen B: A Hydrophobic Ligand Binding Protein at the host-parasite interface. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **93**, 17–23 (2015).
14. Siracusano, A., Riganò, R. & Ortona, E. Immunomodulatory mechanisms during Echinococcus granulosus infection. *Exp. Parasitol.* **119**, 483–9 (2008).
15. Díaz, A., Casaravilla, C., Allen, J. E., Sim, R. B. & Ferreira, A. M. Understanding the laminated layer of larval Echinococcus II: immunology. *Trends Parasitol.* **27**, 264–73 (2011).
16. Breijo, M., Anesetti, G., Martínez, L., Sim, R. B. & Ferreira, A. M. Echinococcus granulosus: The establishment of the metacestode is associated with control of complement-mediated early inflammation. *Exp. Parasitol.* **118**, 188–196 (2008).

17. Mourglia-Ettlin, G. *et al.* Early Peritoneal Immune Response during *Echinococcus granulosus* Establishment Displays a Biphasic Behavior. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **5**, e1293 (2011).
18. Díaz, A. & Allen, J. E. Mapping immune response profiles: The emerging scenario from helminth immunology. *Eur. J. Immunol.* **37**, 3319–3326 (2007).
19. Díaz, A., Casaravilla, C., Barrios, A. A. & Ferreira, A. M. Parasite molecules and host responses in cystic echinococcosis. *Parasite Immunol.* **38**, 193–205 (2016).
20. Tuxun, T. *et al.* Th17/Treg imbalance in patients with liver cystic echinococcosis. *Parasite Immunol.* **34**, 520–527 (2012).
21. Wang, J. *et al.* Depletion of FoxP3⁺ Tregs improves control of larval *Echinococcus multilocularis* infection by promoting co-stimulation and Th1/17 immunity. *Immunity, Inflamm. Dis.* **5**, 435–447 (2017).
22. Wang, H. *et al.* *Echinococcus granulosus* infection reduces airway inflammation of mice likely through enhancing IL-10 and down-regulation of IL-5 and IL-17A. *Parasit. Vectors* **7**, 522 (2014).
23. Pan, W. *et al.* Surveillance on the Status of Immune Cells after *Echinococcus granulosus* Protoscoleces Infection in Balb/c Mice. *PLoS One* **8**, 4–11 (2013).
24. Casaravilla, C. *et al.* Unconventional Maturation of Dendritic Cells Induced by Particles from the Laminated Layer of Larval *Echinococcus granulosus*. *Infect. Immun.* **82**, 3164–3176 (2014).
25. Seoane, P. I. *et al.* Particles from the *Echinococcus granulosus* laminated layer inhibit IL-4 and growth factor-driven Akt phosphorylation and proliferative responses in macrophages. *Sci. Rep.* **6**, 1–13 (2016).
26. Peón, A. N., Espinoza-Jiménez, A. & Terrazas, L. I. Immunoregulation by taenia crassiceps and its antigens. *Biomed Res. Int.* **2013**, (2013).
27. Carmena, D., Benito, A. & Eraso, E. Antigens for the immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* infection: An update. *Acta Trop.* **98**, 74–86 (2006).
28. Olson, P. D., Zarowiecki, M., Kiss, F. & Brehm, K. Cestode genomics - progress and prospects for advancing basic and applied aspects of flatworm biology. *Parasite Immunol.* **34**, 130–150 (2012).
29. Zhang, W. *et al.* 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**, (2010).
30. Lightowers, M. W., Liu, D. Y., Haralambous, A. & Rickard, M. D. Subunit composition and specificity of the major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **37**, 171–82 (1989).
31. Lee, E. G. *et al.* A hydrophobic ligand-binding protein of the *Taenia solium* metacestode mediates uptake of the host lipid: Implication for the maintenance of parasitic cellular homeostasis. *Proteomics* **7**, 4016–4030 (2007).
32. Obal, G. *et al.* Characterisation of the native lipid moiety of *Echinococcus granulosus*

- antigen B. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, e1642 (2012).
33. Oriol, C. & Oriol, R. Physiocochemical properties of a lipoprotein antigen of *Echinococcus granulosus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **24**, 96–100 (1975).
 34. Tielens, A. & Hellemond, IJ. Unusual Aspects of Metabolism in Flatworm Parasites. in *Parasitic Flatworms Molecular Biology, Biochemistry, Immunology and Physiology*. (eds. Maule, A. G. & Marks, N. J.) 387–407 (CAB International, 2006).
 35. Siracusano, A. *et al.* Molecular cross-talk in host-parasite relationships: The intriguing immunomodulatory role of *Echinococcus* antigen B in cystic echinococcosis. *Int. J. Parasitol.* **38**, 1371–1376 (2008).
 36. Microbiologia, S. De & Celular, U. D. B. Ultrastructural localization of major hydatid fluid antigens in. (1993).
 37. Riganò, R. *et al.* *Echinococcus granulosus* antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response. *Infect. Immun.* **75**, 1667–1678 (2007).
 38. Virginio, V. G. *et al.* Effects of protoscoleces and AgB from *Echinococcus granulosus* on human neutrophils: Possible implications on the parasite's immune evasion mechanisms. *Parasitol. Res.* **100**, 935–942 (2007).
 39. Riganò, R. *et al.* Modulation of Human Immune Response by *Echinococcus granulosus* Antigen B and Its Possible Role in Evading Host Defenses Modulation of Human Immune Response by *Echinococcus granulosus* Antigen B and Its Possible Role in Evading Host Defenses. *Infect. Immun.* **69**, 288–296 (2001).
 40. Silva-Álvarez, V. *et al.* *Echinococcus granulosus* Antigen B binds to monocytes and macrophages modulating cell response to inflammation. *Parasit. Vectors* **9**, 69 (2016).
 41. González, G. *et al.* Two different 8 kDa monomers are involved in the oligomeric organization of the native *Echinococcus granulosus* antigen B. *Parasite Immunol.* **18**, 587–596 (1996).
 42. Folle, A. M. *et al.* Characterisation of Antigen B Protein Species Present in the Hydatid Cyst Fluid of *Echinococcus canadensis* G7 Genotype. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, e0005250 (2017).
 43. Epelman, S., Lavine, K. J. & Randolph, G. J. Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity* **41**, 21–35 (2014).
 44. Dey, A., Allen, J. & Hankey-Giblin, P. A. Ontogeny and polarization of macrophages in inflammation: Blood monocytes versus tissue macrophages. *Front. Immunol.* **6**, 1–15 (2015).
 45. Murray, P. J. & Wynn, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 723–737 (2011).
 46. Freeman, S. A. Phagocytosis : receptors , signal integration , and the cytoskeleton. 193–215 (2014).
 47. Stein, M., Keshav, S., Harris, N. & Gordon, S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic

- macrophage activation. *J. Exp. Med.* **176**, 287–92 (1992).
48. Jang, J. & Nair, M. Alternatively Activated Macrophages Revisited: New Insights into the Regulation of Immunity, Inflammation and Metabolic Function following Parasite Infection. *Curr. Immunol. Rev.* **9**, 147–156 (2014).
 49. Van Dyken, S. J. & Locksley, R. M. Interleukin-4- and Interleukin-13-Mediated Alternatively Activated Macrophages: Roles in Homeostasis and Disease. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 317–343 (2013).
 50. Helming, L., Winter, J. & Gordon, S. The scavenger receptor CD36 plays a role in cytokine-induced macrophage fusion. *J. Cell Sci.* **122**, 453–9 (2009).
 51. Rutschman, R. *et al.* Cutting edge: Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. *J. Immunol.* **166**, 2173–7 (2001).
 52. Modolell, M. *et al.* Local Suppression of T Cell Responses by Arginase-Induced L-Arginine Depletion in Nonhealing Leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **3**, e480 (2009).
 53. Ash, D. E. Structure and function of arginases. *J. Nutr.* **134**, 2760S–2764S; discussion 2765S–2767S (2004).
 54. O’Neill, L. A. J., Golenbock, D. & Bowie, A. G. The history of Toll-like receptors- redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 453–460 (2013).
 55. Akira, S. & Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 499–511 (2004).
 56. Murphy, K. (Kenneth M. ., Travers, P., Walport, M. & Janeway, C. *Janeway’s immunobiology.* (Garland Science, 2008).
 57. Ferrari, D. *et al.* Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J. Immunol.* **159**, 1451–8 (1997).
 58. Elliott, E. I. & Sutterwala, F. S. Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly. *Immunol. Rev.* **265**, 35–52 (2015).
 59. Arbore, G. & Kemper, C. A novel ‘complement-metabolism-inflammasome axis’ as a key regulator of immune cell effector function. *Eur. J. Immunol.* **46**, 1563–1573 (2016).
 60. Minutti, C. M., Knipper, J. A., Allen, J. E. & Zaiss, D. M. W. Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. *Semin. Cell Dev. Biol.* **61**, 3–11 (2017).
 61. Murphy, A. J., Westerterp, M., Yvan-Charvet, L. & Tall, A. R. Anti-atherogenic mechanisms of high density lipoprotein: Effects on myeloid cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1821**, 513–521 (2012).
 62. LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
 63. Tada, H., Shiho, O., Kuroshima, K., Koyama, M. & Tsukamoto, K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J. Immunol. Methods* **93**, 157–65 (1986).
 64. Sen, N. P. & Donaldson, B. Improved colorimetric method for determining nitrate and nitrite in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **61**, 1389–94 (1978).

65. Lu, M. & Gursky, O. Aggregation and fusion of low-density lipoproteins in vivo and in vitro. *Biomol. Concepts* **4**, 501–518 (2013).
66. Ordovas, J. M. Fast Ultracentrifugation Methods for the Separation of Plasma Lipoproteins. **110**, 1–11 (2007).
67. Issekutz, A. C. Removal of gram-negative endotoxin from solutions by affinity chromatography. *J. Immunol. Methods* **61**, 275–281 (1983).
68. Brandenburg, K., Howe, J., Gutsman, T. & Garidel, P. The expression of endotoxic activity in the Limulus test as compared to cytokine production in immune cells. *Curr. Med. Chem.* **16**, 2653–60 (2009).
69. Chandler, C. E. & Ernst, R. K. Bacterial lipids: powerful modifiers of the innate immune response. *F1000Research* **6**, 1334 (2017).
70. Murray, R. Z. & Stow, J. L. Cytokine secretion in macrophages: SNAREs, Rabs, and membrane trafficking. *Front. Immunol.* **5**, 1–9 (2014).
71. Netea, M. G. *et al.* Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 β in monocytes and macrophages. *Blood* **113**, 2324–2335 (2009).
72. Wang, H., Mao, L. & Meng, G. The NLRP3 inflammasome activation in human or mouse cells, sensitivity causes puzzle. *Protein Cell* **4**, 565–568 (2013).
73. Berbée, J. F. P., Havekes, L. M. & Rensen, P. C. N. Apolipoproteins modulate the inflammatory response to lipopolysaccharide. *J. Endotoxin Res.* **11**, 97–103 (2005).
74. Murch, O., Collin, M., Hinds, C. J. & Thiemermann, C. Lipoproteins in inflammation and sepsis. I. Basic science. *Intensive Care Med.* **33**, 13–24 (2007).
75. von Eckardstein, A. & Kardassis, D. High density lipoproteins: From biological understanding to clinical exploitation. *Handb. Exp. Pharmacol.* **224**, (2015).
76. Ulevitch, R. J. & Johnston, A. R. The modification of biophysical and endotoxic properties of bacterial lipopolysaccharides by serum. *J. Clin. Invest.* **62**, 1313–1324 (1978).
77. Flegel, W. A., Wolpl, A., Mannel, D. N. & Northoff, H. Inhibition of endotoxin-induced activation of human monocytes by human lipoproteins. *Infect. Immun.* **57**, 2237–2245 (1989).
78. van Bergenhenegouwen, J. *et al.* Lipoproteins attenuate TLR2 and TLR4 activation by bacteria and bacterial ligands with differences in affinity and kinetics. *BMC Immunol.* **17**, 42 (2016).
79. Brown, G. D. *et al.* Dectin-1 Is A Major β -Glucan Receptor On Macrophages. *J. Exp. Med.* **196**, 407–412 (2002).
80. Taylor, P. R. *et al.* Dectin-1 is required for β -glucan recognition and control of fungal infection. *Nat. Immunol.* **8**, 31–38 (2007).
81. Underhill, D. M. & Ozinsky, A. Toll-like receptors : key mediators of microbe detection. 103–110 (2002).

82. Jee Song, G. *et al.* SR-BI mediates high density lipoprotein (HDL)-induced anti-inflammatory effect in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **457**, 112–118 (2015).
83. Wang, S. hui, Yuan, S. guang, Peng, D. quan & Zhao, S. ping. HDL and ApoA-I inhibit antigen presentation-mediated T cell activation by disrupting lipid rafts in antigen presenting cells. *Atherosclerosis* **225**, 105–114 (2012).
84. Odegaard, J. I. & Chawla, A. The immune system as a sensor of the metabolic state. *Immunity* **38**, 644–654 (2013).